

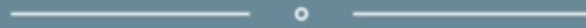


Süleyman Demirel Üniversitesi



Sağlık Bilimleri Dergisi

Süleyman Demirel Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Dergisi
Cilt 14 Sayı 2 Yıl 2023



Suleyman Demirel University
Journal Of Health Sciences
Volume 14 Issue 2 Year 2023



SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ
Cilt 14, Sayı 2, Yıl 2023

SULEYMAN DEMIREL UNIVERSITY
JOURNAL OF HEALTH SCIENCES
Volume 14, Issue 2 Year 2023

İletişim / Contact SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü / İSPARTA
Telefon: 0246 211 87 71/72 Faks: 0246 237 03 63
E-posta: saglikbilimleridergisi@sdu.edu.tr
Web: <http://sdu.dergipark.gov.tr/sdusbed>

Kapak Tasarım/Mizanpaj:
Hüseyincan Şikel

Baskı/Mizanpaj:
Esmâ Selçuk



SAHİBİ

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

BAŞ EDİTÖR

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

EDİTÖR KURULU

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

TEKNİK EDİTÖRLER

Arş. Gör. Tahir KESKİN
Süleyman Demirel Üniversitesi
Arş. Gör. Rumeysa ATEŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Esmâ SELÇUK
Süleyman Demirel Üniversitesi
Hüseyincan ŞİKEL
Süleyman Demirel Üniversitesi

DANIŞMA KURULU

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



Araştırma Makaleleri / Research Articles

Asetilsalisilik Asit ve Salisilik Asitin Paklitaksel ile Eş Uygulamasının Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki Olası Sinerjistik Etkilerinin Otofaji, ER stresi ve Apoptotik Hücre Ölümü ile İlişkisinin Araştırılması <i>Investigation of Possible Synergistic Effects of Co-administration of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid with Paclitaxel on Autophagy, ER stress and Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells</i>	87-99
Yalçın ERZURUMLU, Deniz ÇATAKLI, Hatice Kübra DOĞAN	
Covid-19 Pandemisi Sürecinde Birinci Basamak Sağlık Çalışanlarının Kişilik Özellikleri ve Stres Düzeyleri Arasındaki İlişki <i>The Relationship Between Personality Traits and Stress Levels of Primary Health Care Workers in The Covid-19 Pandemic Process</i>	100-110
Tuğçe SALBUR, Büşra ALTINEL	
Dismenore Durumuna Göre Genç Kadınların Menstrüel Profilleri ve Anksiyete Düzeyleri <i>Menstrual Profiles and Anxiety Levels of Young Women by Dysmenorrhea Status</i>	111-121
Zümrüt BİLGİN	
Evaluation of Geriatric Psychiatric Patients in The Emergency Department <i>Acil Serviste Geriatrik Psikiyatri Hastalarının Değerlendirilmesi</i>	122-129
Habibe Selmin ÖZENSOY, Ahmet Burak ERDEM, Meltem GÜRÜ, Miray TÜMER	
Drug-Excipient Compatibility Studies In Binary Mixtures of Tadalafil by Using DSC, TGA and FTIR <i>İkili Tadalafil Karışımlarında DSC, TGA ve FTIR Kullanılarak İlaç-Yardımcı Madde Geçimlilik Çalışmaları</i>	130-141
Mahmut DOĞANTÜRK, Hale SEÇİLMİŞ	
Vitamin B Kompleksinin Fotodinamik Terapiyle Kolon Kanserine Etkisi <i>Effect of Vitamin B Complex on Colon Cancer by Photodynamic Therapy</i>	142-152
Asiye GÖK YURTTAŞ, Kamil ÇINAR	
Dişlerdeki Renk Değişimine Dehidratasyon Süresinin Etkisi: Bir İn Vitro Çalışma <i>The Efficacy of Dehydration Time on Discoloration of Teeth: An In Vitro Study</i>	153-161
Günseli KATIRCI	
Investigation of Functional Status of Foot/Ankle in Individuals with Rheumatoid Arthritis <i>Romatoid Artrit'li Bireylerde Ayak/Ayak Bileği ile İlgili Fonksiyonel Durumun İncelenmesi</i>	162-169
Elif GÜR KABUL, Sinem BOZCUK, Bilge BAŞAKCI ÇALIK, Sinem KURU, Murat YİĞİT	
Comparison of the plaque removal efficacy of chewable, electric, and manual toothbrushes: A randomized clinical trial <i>Çiğnenebilir, elektrikli ve manuel diş fırçalarının plak uzaklaştırma etkinliklerinin karşılaştırılması: Randomize klinik çalışma</i>	170-177
Tuğba YİĞİT, Fatih KARAASLAN, Umut YİĞİT, Ahu DİKİLİTAŞ	

Bir Yaşlı Popülasyonunda Periodontal Durumun Fiziksel Aktivite, Beslenme ve Yaşam Kalitesi ile İlişkisi <i>The Relationship Between Periodontal Status and Physical Activity, Nutrition and Quality of Life in an Elderly Population</i>	178-188
Erensu UZAR, Kübra ERTAŞ, Özgür KOŞKAN, Zuhâl YETKİN AY	
Hidroksizinin Tablet Formülasyonunda Analizi için Yeni Bir RP-HPLC Tekniği <i>A Novel RP-HPLC Technique for the Analysis of Hydroxyzine in Tablet Formulation</i>	189-197
İkbal Demet NANE	
Evaluation of Depression Level and Antidepressant Use of Faculty of Pharmacy Students <i>Eczacılık Fakültesi Öğrencilerinin Depresyon Düzeyi ve Antidepresan Kullanımının Değerlendirilmesi</i>	198-207
Aslınur ALBAYRAK, İbrahim EREN	
Polifenol Oksidaz Enzim İnce Filminin Bakır Sülfat (CuSO ₄) Sensörü Olarak Kullanılabilirliğinin İncelenmesi <i>Investigation of the Polyphenol Oxidase Enzyme Thin Film as a Copper Sulfate (CuSO₄) Sensor</i>	208-218
Murat EVYAPAN	
Omza Yönelik Ölçek Geliştirme Çalışmasında Kapsam Geçerliliği <i>Content Validity in The Scale Development Study for Shoulder</i>	219-226
Hüsâmettin KOÇAK, Ertuğrul DEMİRDEL	
Yeni Nesil Kozmetik Peptid Argireline (Asetil heksapeptid-8) Molekülünün in vitro Anti-Tirozinaz, Anti-Kollajenaz, Anti-Elastaz ve Anti Hyaluronidaz Etkilerinin Araştırılması <i>Investigation of In vitro Anti-Tyrosinase, Anti-Collagenase, Anti-Elastase and Anti-Hyaluronidase Effects of New Generation Cosmetic Peptide Argireline (Acetyl Hexapeptide-8) Molecule</i>	227-234
Başak GÖKÇE	
Sinus Ritmindeki Hastalarda Ekokardiyografik Aortik Sertlik Parametreleri ile CHA2DS ₂ -VASc Skoru Arasındaki İlişki <i>The Relation Between Echocardiographic Aortic Stiffness Parameters and CHA2DS₂-VASc Score in Patients With Sinus Rhythm</i>	235-243
Fatih AKSOY, Ali BAĞCI, İsmail Barkın IŞIK	
Evaluation of DNA Damage in Lymphocytes in Percutaneous Thoracic Mass Biopsies Performed with Computed Tomography <i>Bilgisayarlı Tomografi İle Yapılan Perkütan Torasik Kitle Biyopsilerinde Lenfositlerdeki DNA Hasarının Değerlendirilmesi</i>	244-252
Veysel Atilla AYYILDIZ, Rahime ASLANKOÇ, Mustafa SAYGIN, Demet GÜNDÜZ	
Synthesis, Theoretical Studies, Cytotoxicity of 2-((4- (Dimethylamino) Benzylidene)Amino)-5-Methylphenol with Potential JNK1 Inhibitory Activity <i>Potansiyel JNK1 İnhibe Edici Aktiviteye Sahip 2-((4- (dimetilamino) benziliden)amino)-5-metilfenol'ün Sentezi, Teorik Çalışmaları, Sitotoksitesisi</i>	253-272
Oğuzhan KARAOSMANOĞLU, Halil BERBER, Ülkü Dilek UYSAL	

Yoğun Bakımda Çalışan Hemşirelerin Yaşlı Ayrımcılığı ile İlgili Görüşlerinin İncelenmesi <i>Examination of the Opinions of Nurses' Working in Intensive Care About Ageism</i>	273-281
Sıddıka ERSOY, Sultan PALANTÖKEN	
İnsan İdrarında Valasiklovirin Tayini için RPLC Yöntemin Geliştirilmesi ve Validasyonu <i>Development and Validation of the RPLC Method for the Determination of Valaciclovir in Human Urine</i>	282-291
Y. Doğan DALDAL	
In vitro Testing to Investigate Effects of Excipients in Drug Formulation <i>Yardımcı Maddelerin İlaç Formülasyonundaki Etkilerini Araştırmak İçin In vitro Testler</i>	292-299
Hülya YILMAZ, Fatma SERTGOZ, Ayse CINKILIC, Mustafa CULHA	



Asetilsalisilik Asit ve Salisilik Asitin Paklitaksel ile Eş Uygulamasının Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki Olası Sinerjistik Etkilerinin Otofaji, ER stresi ve Apoptotik Hücre Ölümü ile İlişkisinin Araştırılması

Investigation of Possible Synergistic Effects of Co-administration of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid with Paclitaxel on Autophagy, ER stress and Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells

Yalçın ERZURUMLU ^{1*}, Deniz ÇATAKLI ², Hatice Kübra DOĞAN ³

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

³ Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sırada yer almaktadır. Kemoterapötikler ve anti-androjenler prostat kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlar olmasına karşın kazanılan ilaç direnci ve gelişen kastrasyona direnç mekanizmaları nedeniyle kullanımları sınırlanmaktadır. Bu nedenle mevcut tedavilere ait yan etkilerin giderilmesi ve hali hazırda kullanılan ajanların terapötik etkinliklerinin geliştirilebilmesi için yeni yaklaşımlara olan ihtiyaç devam etmektedir. Bu çalışma kapsamında, asetilsalisilik asit (ASA) ve salisilik asit (SA)'in tek başına veya kemoterapiye dirençli çeşitli kanser türlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir anti-mitotik ajan olan Paklitaksel ile kombine uygulamalarının prostat kanseri hücrelerinde katlanmamış protein yanıtı (UPR) sinyalinin PERK kolu, otofaji ve apoptotik hücre ölümü aracılı olası etki mekanizmaları incelendi. Bulgularımız, Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombinasyonunun otofaji mekanizmasını uyardığını ve UPR'nin PERK kolu aktivasyonu aracılı CHOP uyarımına ve apoptotik proteinler olan kaspaz-3 ve PARP-1 kesimine neden olarak prostat kanseri hücrelerinde güçlü anti-kanser etkiler sergilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, prostat kanseri tedavisinde ASA ve SA'nın Paklitaksel ile kombinasyonunun Paklitaksel'in anti-kanser etkinliğini geliştirerek etkili bir tedavi yaklaşımı sunabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Asetilsalisilik asit, Katlanmamış protein yanıtı, Salisilik asit, Paklitaksel, Prostat kanseri, Otofaji

Alınış / Received: 11.11.2022 Kabul / Accepted: 05.05.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common type of cancer in men and the fifth leading cause of cancer-related death worldwide. Although chemotherapeutics and anti-androgens are frequently used approaches in the treatment of prostate cancer, their use is limited due to acquired drug resistance and developing castration resistance mechanisms. For this reason, the need for new approaches continues to eliminate the side effects of existing treatments and to improve the therapeutic efficacy of currently used agents. In the present study, we investigated the effect of acetylsalicylic acid (ASA) and salicylic acid (SA) alone or their combination with Paclitaxel which is an anti-mitotic agent frequently used in the treatment of various chemotherapy-resistant cancer types, on the PERK branch of unfolded protein response (UPR) signaling, autophagy and apoptotic cell death in prostate cancer cells. Our findings showed that the combination of Paclitaxel with ASA and SA has strong anti-cancer effects on prostate cancer cells by inducing autophagy, causing CHOP stimulation via the PERK arm of the UPR and activating apoptotic proteins caspase-3 and PARP-1. These results suggest that the combination of ASA and SA with Paclitaxel may offer an effective treatment approach by improving the anti-cancer efficacy of Paclitaxel in the treatment of prostate cancer.

Keywords: Apoptosis, Acetylsalicylic acid, Unfolded Protein Response, Salicylic acid, Paclitaxel, Prostate cancer, Autophagy



1. Giriş

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türü olup, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sırada yer almaktadır [1]. 2023 yılında yaklaşık 288.300 yeni prostat kanseri vakası tespit edileceği ve 34.700 kişinin prostat kanseri nedeniyle yaşamını yitireceği düşünülmektedir [2] Genetik yatkınlık başta olmak üzere, aile öyküsü, ırk/etnik köken, bireysel ve çevresel faktörler hastalığın epidemiyolojisinde önemli rollere sahiptir [3]. Tanıdan sonraki 5 yıl içerisinde prostat kanserli hastaların %10 ile %20'sinde kastrasyona dirençli prostat kanserine dönüşümün gerçekleşebildiği bilinmektedir [4]. Uzun yıllardır kullanılmakta olan tıbbi veya cerrahi kastrasyon yolları aracılı sürdürülen androjen yoksunluğu tedavisi (ADT), metastatik prostat kanserinin birincil tedavisi olmuştur, fakat hastalarda gelişen kastrasyon direnci tedavinin etkinliğini büyük oranda kısıtlamaktadır [5]. Bu sebeple günümüzde prostat kanseri tedavisinde kullanılmakta olan kemoterapötik aracılı ya da hormonal tedavi yaklaşımlarının etkinliğini destekleyen yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına ve karsinogenez sürecinin moleküler mekanizmalarını seçici olarak hedefleyen güçlü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olan ihtiyaç devam etmektedir.

Aspirin®'in birincil metaboliti olan salisilik asit (SA), antik çağ dönemlerinden beri ağrı, ateş ve iltihaplanma için yaygın olarak kullanılmaktadır. Salisin metabolizmasından türetilen SA veya o-hidroksibenzoik asit, akne tedavilerinde kullanılan steroid olmayan anti-inflamatuar etkileri ile bilinmektedir [6]. Kimyasal olarak SA, aromatik bir halka, bir hidroksil grubu ve diğer fonksiyonel türevleri olan geniş bir fenolik bileşik grubuna aittir. SA türevleri kozmetik, gıda endüstrilerinden farmasötik ürünlere kadar çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Asetilsalisilik asit (ASA) ve SA gibi nonsteroidal antiinflamatuar ilaçların (NSAID'ler) kalın bağırsak kanserinde [8] ve insan akciğer adenokarsinomunda [9] apoptozisi indüklediği bildirilmiştir. SA'nın etki mekanizmaları siklooksijenaz-2 (COX-2, cyclooxygenase-2) enzimini hedeflemeyi, DNA onarımını ve tümör protein 53 (TP53, tumor protein 53), siklin bağımlı kinaz 1 (CDKN1, Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) ve Bcl-2-ilişkili X protein (BAX, Bcl-2-associated X protein) gibi tümör baskılayıcı genlerin yukarı düzenlenmesini kapsamaktadır [10].

ASA ve salisin ön ilacını içeren söğüt ağacının özleri, eski Mısırlılar tarafından vücut spazmlarını gidermek için kullanılmıştır [11]. Daha sonra SA'ya asetil grubu eklenerek asetilsalisilat tozu sentezlenmiştir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biri olan Aspirin® (asetilsalisilik asit) ve diğer NSAID'ler, etkili dozlarda COX enzimlerini inhibe ederek araziidonik asidin prostanoidlere dönüşümünü bloke eder [12]. ASA'nın kanserli hücreler üzerindeki etkisinde diğer NSAID'lere benzer olduğu düşünülmektedir [13]. Ayrıca ASA'nın kanser hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisiyle ilişkili trombosit-tümör hücre etkileşiminin azalması, sitokinlerin, kemokinlerin, pro-anjiyojenik ve büyüme faktörlerinin trombosit salınımının azaltılması gibi olası mekanizmalar öne sürülmüştür [14]. Ancak günümüzde halen daha ASA'nın karsinogenez üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Paklitaksel (Taxol®), *Taxus brevifolia*'nın kabuğunda ve iğnelerinde doğal olarak üretilen trisiklik halkaya sahip lipofilik bir diterpenoid bileşiktir. İlk olarak 1963 yılında, Wani ve Wall tarafından Pasifik porsuk ağacı kabuğundan ham özüt olarak elde edilmiştir [15,16]. Paklitaksel kanser hücrelerinde antimitotik etki sergileyerek apoptozu uyarmaktadır [17]. Klinik deneylerde kullanılan ilk taksan sınıfı ilaç olmasıyla birlikte özellikle kemoterapiye direnç gösteren birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajandır [18]. Ancak tümör hücrelerinde henüz mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış taksanlara karşı gelişen direnç nedeniyle kullanımları sınırlanabilmektedir. Bu nedenle prostat kanseri başta olmak üzere kanser tedavilerinde yaşam kalitesinin iyileştirilmesi ve bu yan etkilerin giderilmesi amacıyla yeni anti-kanser bileşiklerin keşfi veya mevcut bileşiklerin sinerjistik etkilerinin araştırılması oldukça önemlidir [19].

Otofaji memeli hücrelerinde ileri düzeyde korunmuş karmaşık fizyolojik mekanizmalardan biridir. Otofaji çift membranla sarılmış keselerin lizozom ile füzyonu aracılı olarak yanlış katlanmış ve kümelenmiş proteinlerin, hücrelerdeki hasarlı organellerin, ribozomların ve hücre içi patojenlerin yıkımından sorumlu olan hücresel homeostazisin korunmasında kritik öneme sahip sofistike bir moleküler mekanizmadır [20]. Bununla birlikte hücrelerde seyreden bazal otofajinin kontrolünün bozulmasına bağlı olarak apoptotik olmayan bir hücre ölüm mekanizması olarak çalışabilmektedir [21]. Bu nedenle hücrelerdeki otofajik aktivitenin hassas bir şekilde regüle edilmesi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar otofajinin otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları, enfeksiyon ve kanser gibi çok sayıdaki hastalığın patofizyolojisinde önemli rollere sahip olduğunu ortaya koymuştur [22,23].

Tümör hücrelerinin büyümelerinde ve adaptasyonunda otofajinin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Ancak otofajinin kanserin aşamalarına bağlı olarak tümör-baskılayıcı veya tümör-destekleyici olarak ikili bir rol oynadığına dair belirsizlik devam etmektedir ve karsinogenez sürecindeki kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır [24]. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan birçok ajanın hücrelerdeki otofajiyi doğrudan etkilediği günümüzde artık daha iyi anlaşılmıştır [25,26]. Bununla birlikte otofaji kemoterapötik ajanlara karşı sağ kalım ve direnç kazanımı mekanizması olarak çalışabilmesine karşın otofaji aracılı hücre ölüm mekanizması olarak antikanser ilaçlarının etkinliğine katkıda da bulunmaktadır. Bu nedenle terapötik yaklaşımlarda otofajinin hedeflenmesi ilaç direncinin aşılması ve antikanser tedavilerin terapötik yararlanımlarının geliştirilmesi için umut verici bir yaklaşım olarak önerilmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, transportu ve katlanması, lipid ve steroid sentezi, kalsiyum homeostazı gibi önemli hücresel süreçleri düzenleyen multi-fonksiyonel bir organdır [27]. Hücresel gereksinimlere bağlı olarak ER'nin kapasitesinin yetersiz kalması ya da ER içersinde devam eden mekanizmaların aksaması ER stresi olarak ifade edilen süreci tetiklemektedir. Hücreler ER'nin fizyolojik gereksinimlere optimum cevap verebilmesi için katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak ifade edilen ileri düzeyde regüle edilen sinyal mekanizmasını aktive etmektedir. UPR, yüksek düzeyde protein sentezi ve katlama kapasitesi ihtiyacı gibi aşırı metabolik faaliyetler altında ökaryotik hücrelerin yeniden programlanmasında önemli bir rol oynar [28]. Ayrıca kanser hücreleri için bir sağ kalım mekanizması gibi çalışabilmekle birlikte ilaç direnci gelişimi ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. UPR sinyalizasyonu ER membranında lokalize üç transmembran proteini olan inositol gerektiren kinaz 1 alfa (IRE1 α , inositol requiring protein-1 α), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6, activating transcription factor-6) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK, PKR-like ER kinase) tarafından düzenlenir [29]. UPR hücreler için bir sağ kalım mekanizması olarak çalışabilmesine karşın UPR sinyalinin uzun süreli uyarımı altındaki hücrelerde programlanmış hücre ölümünün indüklenbildiği bilinmektedir [30].

Bu çalışmada, uzun yıllardır ağırlı hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan ve anti-inflamatuar etkileri olduğu bilinen SA ve ASA bileşikleri ile yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan Paklitaksel'in birlikte kullanımının prostat kanseri hücrelerinde otofaji, ER stresi ve hücre ölümü ile ilgili

proteinler üzerindeki olası sinerjistik etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. *In vitro* deneme sonuçlarımız ASA ve SA'nın Paklitaksel ile eş uygulamasının sinerjistik etkiler sergileyerek Paklitaksel'in prostat kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkilerini geliştirebileceğini önermektedir.

2. Materyal ve Metot

Materyaller: Asetilsalisilik asit (#A5376) ve salisilik asit (#105910) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Paklitaksel (sc-201439) Santacruz Biotechnology, Bafilomycin A1 (#54645) ve Staurosporin (#9953) Cell Signaling Technology firmasından satın alındı. Çalışmalarda kullanılan hücre kültürü plastik malzemeleri Sarstedt firmasından temin edildi. Paklitaksel, asetilsalisilik asit ve salisilik asit Biological Industries firmasından temin edilen steril hücre kültürü grade H₂O'da çözülerek hazırlandı. Bafilomycin A1 ve Staurosporin SERVA firmasından temin edilen moleküler biyoloji grade dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Hücrelere uygulanan DMSO içeriği %0.05'i geçmedi.

Hücre Kültürü: Çalışmalarda kullanılan insan epitelyal prostat karsinoma hücre hattı olan LNCaP hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edildi. Kültür çalışmalarında kullanılan fetal sıgır serumu (FBS), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) besi ortamı ve hücrelerin büyümeleri için gereksinim duyulan diğer yardımcı malzemeler Capricorn Scientific'ten satın alındı. Hücreler %10 FBS ve 2 mM L-glutamin içeren RPMI1640 besi yeri içerisinde konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37 °C ve %5 CO₂ bulunan hücre kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Düzenli aralıklarla hücrelerin mikoplazma içermediği EZ-PCR™ Mikoplazma Tespit Kiti (Biological Industries) kullanılarak doğrulandı.

İmmünoiblottlama: İmmünoiblottlama çalışmaları daha önceki çalışmalarımızda rapor edildiği gibi gerçekleştirilmiştir [31]. LNCaP hücreleri %1 memeli proteaz inhibitörü içeren radyoimmünopresipitasyon testi (RIPA) tamponu ile lizatlandı. Örnekler 4 °C'de 20 dakika boyunca 14.000 r.p.m'de santrifüj edildi ve süpernatant kullanılmak üzere saklandı. İzole edilen proteinlerin total protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla bikinkoninik asit (BCA) (Takara) protein tahlil yöntemi kullanıldı. Çalışmalarda 25-30 µg protein örneği kullanıldı. Protein örnekleri 4x Laemmli tamponu içerisinde 95 °C'de 5 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Örnekler hazırlanan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jeline yüklenerek 2 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu. Takiben protein örnekleri poliviniliden diflorür (PVDF) (Bio-Rad) membranına transfer edildi. Bu işlem sonrasında membran sırasıyla bloklama, birincil antikor uygulanması, yıkama işlemi, HRP-konjuge ikincil antikor uygulanması, yıkama işlemi ve kemiluminesans görüntüleme işlemlerine tabi tutuldu. Protein bantlarının görüntülenmesi için Clarity™ Western ECL substrat (Bio-Rad) solüsyonu kullanıldı ve protein bantları ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) sisteminde görüntüldü.

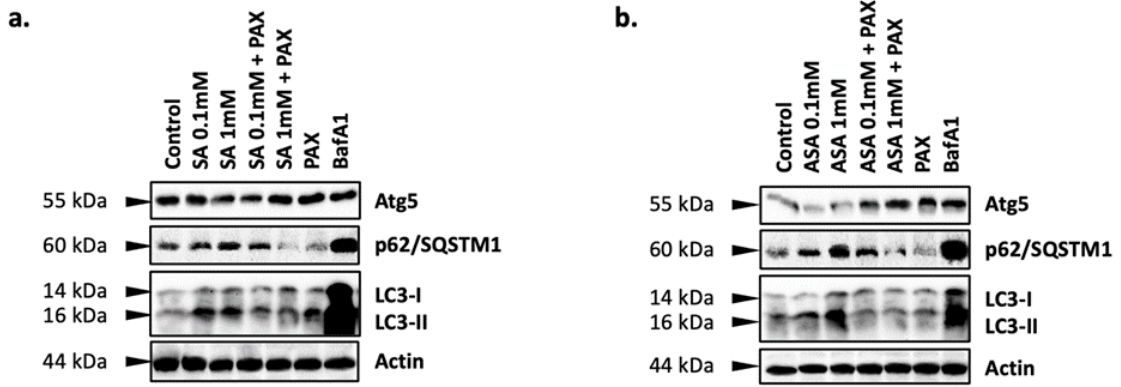
İmmünoiblottlama çalışmalarında kullanılan monoklonal tavşan anti-LC3-I/II (#12741)(1:2000), anti-Atg5 (#12994)(1:2000), poliklonal tavşan anti-p62/SQSTM1(#5114)(1:2500), anti-eIF2α (#9722)(1:3000), anti-phospho (Ser51)-eIF2α (#9721)(1:3000) ve fare monoklonal anti-CHOP (#2895)(1:2000) primer antikorları Cell Signaling firmasından temin edildi. Tavşan poliklonal anti-PERK (#24390-1-AP)(1:2500), anti-Caspase 3 (#19677-1-AP)(1:1000) ve anti-PARP-1 (#13371-1-AP)(1:1500) antikorları Proteintech firmasından sağlandı. Fare monoklonal anti-beta-actin (#A5316)(1:10000) antikorunu Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

3. Bulgular

Paklitaksel'in Salisilik Asit ve Asetilsalisilik Asit ile Kombinasyonu LNCaP Hücrelerinde Otofajiyi İndükler

Çalışmamız kapsamında kullanılan Paklitaksel, ASA ve SA dozları literatür taramaları sonrasında hücreler üzerinde belirlenen IC₅₀ doz değerlerine göre seçilmiştir [32-34]. İlk olarak Paklitaksel'in tek başına ve ASA/SA ile kombine tedavisinin otofaji üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla immünoiblottlama çalışmaları gerçekleştirildi. Bu kapsamda, LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında ASA ve SA, 10 nM Paklitaksel ve ASA, SA ve Paklitaksel'in kombinasyonları uygulandı (Şekil 1a, b). Otofaji ile ilişkili Atg5, p62/SQSTM1 ve LC3-I/II protein ifade düzeyleri incelendi [35]. Yalnız başına Paklitaksel uygulaması Atg5 ve LC3-II düzeylerini kontrol grubuna kıyasla arttırdı. Buna karşın p62/SQSTM1 düzeyleri Paklitaksel uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla azaldı. SA ve ASA uygulamalarının doz bağımlı olarak Atg5 düzeylerini azalttığı belirlendi. LC3-II ve p62/SQSTM1 düzeylerinin ise ASA ve SA uygulamalarına bağlı olarak arttığı saptandı. ASA ve SA'nın

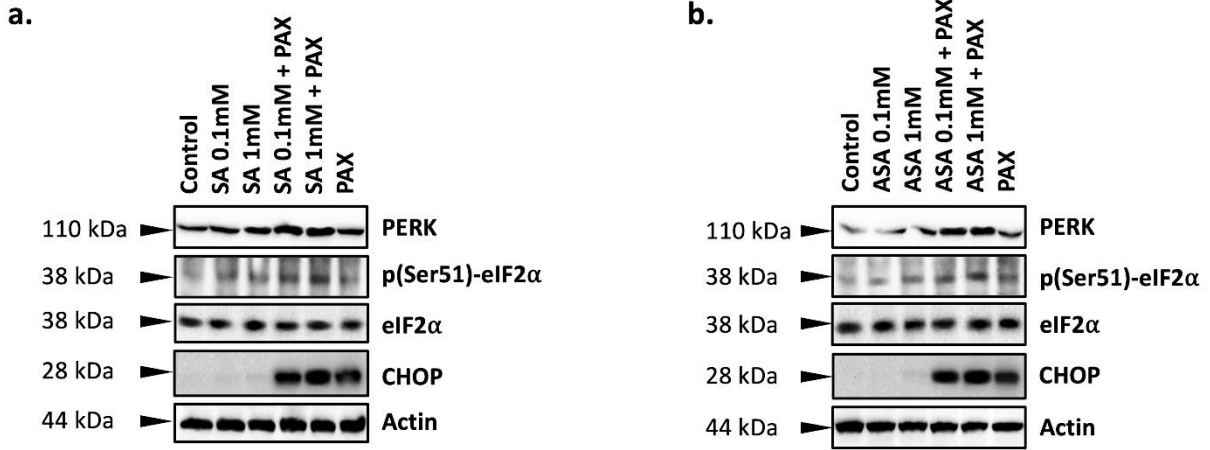
Paklitaksel ile eş uygulaması Atg5 ve LC3-II düzeylerini arttırırken p62/SQSTM1 düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlendi (Şekil 1a, b). Bu deney sisteminde bafilomisin A1 (BafA1) otofajik inhibisyonunun pozitif kontrolü olarak kullanılmıştır [35]. Beklendiği gibi BafA1 uygulaması LC3-I ve özellikle LC3-II ifade düzeylerinde ve p62/SQSTM1 düzeylerinde artışa neden olduğu belirlendi. Toplu olarak bu sonuçlar Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombine uygulamasının Atg5 düzeyini ve LC3 dönüşümünü artırarak ve bir otofajik substrat proteini olan p62/SQSTM1 düzeylerini azaltarak otofajiyi hızlandırdığını göstermiştir.



Şekil 1. Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının otofaji üzerine olan etkisinin incelenmesi. LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1mM ve 1mM konsantrasyonlarında salisilik asit ve asetilsalisilik asit, 10nM Paklitaksel veya salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile eş uygulamaları gerçekleştirildi. 1µM bafilomisin A1 otofaji inhibitörü olarak kullanıldı. Atg5, p62/SQSTM1 ve LC3-I/II protein düzeylerindeki değişimler immünoblotlama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Paklitaksel'in Salisilik Asit ve Asetilsalisilik Asit ile Kombinasyonu LNCaP Hücrelerinde Katlanmamış Protein Yanıtı Sinyalinin PERK Kolunu Uyarır

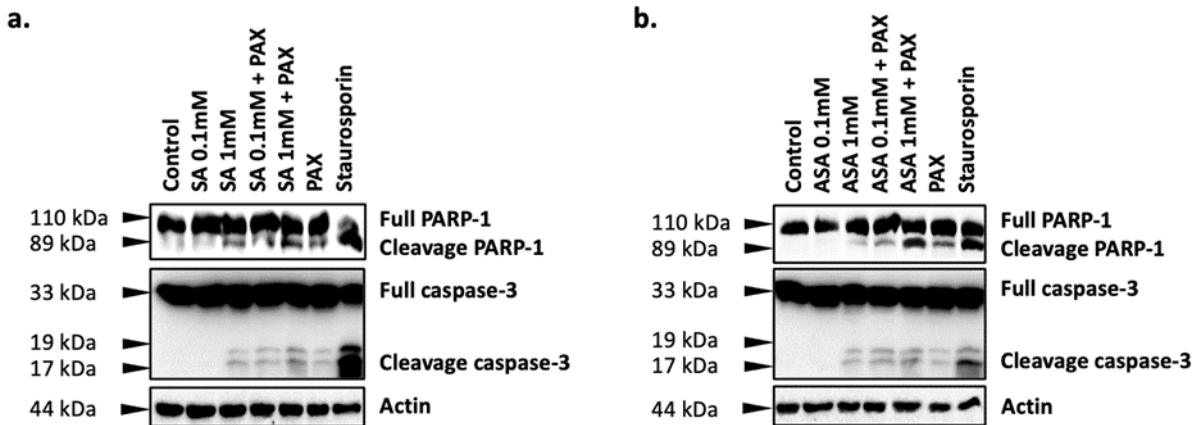
Paklitaksel'in SA ve ASA ile kombine uygulamasının UPR sinyali üzerindeki etkisini test etmek amacıyla PERK proteini ve UPR'nin PERK kolunun aşağı efektörü olan ve UPR indüksiyonu altında serin 51 pozisyonundan fosforilasyona uğradığı bilinen eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) düzeyi ve bu akışın devamındaki efektör proteini olan CHOP (C/EBP Homologous Protein) protein düzeylerine olan etkisini immünoblotlama ile inceledik (Şekil 2a, b). Tek başına Paklitaksel tedavisi kontrol grubuna kıyasla PERK ve p(Ser51)-eIF2 α düzeylerini arttırdığı belirlendi. Yalnızca SA ve ASA uygulamalarının da PERK ve p(Ser51)-eIF2 α düzeylerini arttırdığı saptandı. Paklitaksel'in SA ve ASA ile eş uygulamasının p(Ser51)-eIF2 α düzeylerini yalnızca Paklitaksel, SA ve ASA uygulamalarına kıyasla doz bağımlı olarak daha güçlü bir şekilde arttırdığı belirlendi. Total eIF2 α düzeylerinde ise belirgin bir değişim olmadığı saptandı. CHOP protein düzeylerinin ASA ve SA uygulamasına bağlı olarak etkilenmediği Paklitaksel uygulaması ile arttığı gözlemlendi. ASA ve SA'nın Paklitaksel ile eş uygulamasının Paklitaksel'in neden olduğu artan CHOP düzeylerini güçlendirdiği belirlendi (Şekil 2a, b). Bu sonuçlar Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombine uygulamasının UPR'nin PERK kolunu eş bir şekilde uyararak artan CHOP protein ifade düzeylerine neden olduğunu göstermiştir.



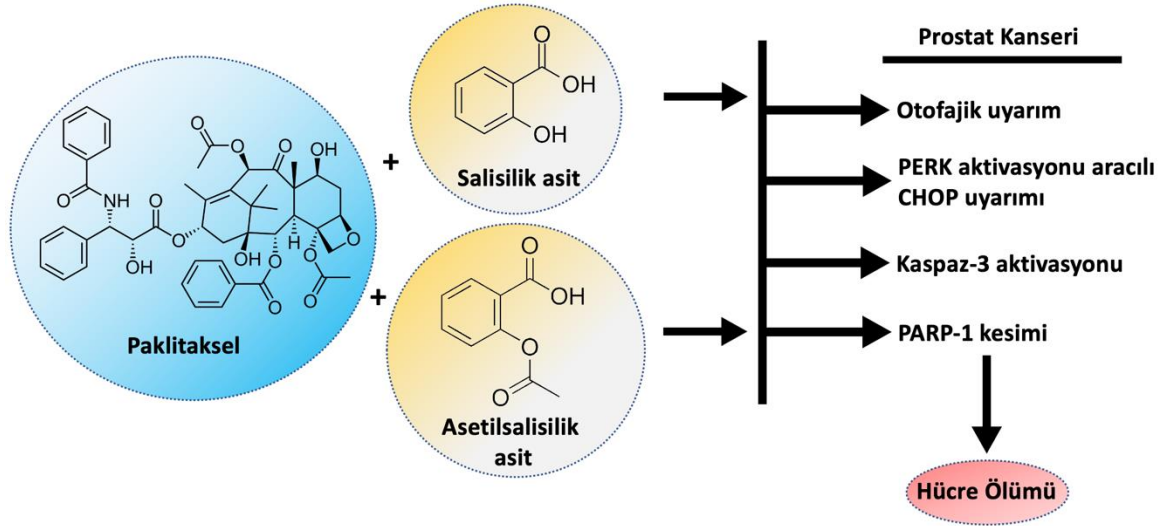
Şekil 2. Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının UPR'nin PERK kolu üzerine olan etkisinin incelenmesi. LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1mM, 1mM konsantrasyonunda salisilik asit ve asetilsalisilik asit 10nM Paklitaksel veya salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile eş uygulamaları gerçekleştirildi. PERK, eIF2α, p(Ser51)-eIF2α ve CHOP protein düzeylerindeki değişimler immünoiblottama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Paklitaksel'in Salisilik Asit ve Asetilsalisilik Asit ile Kombinasyonu LNCaP Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümü ile İlişkili Protein Düzeylerini Artırır

Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombine uygulamasının LNCaP hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla kesime uğramamış poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1, poly [ADP-ribose] polymerase 1) (110kDa) ve kaspaz-3 (33kDa) ile bunların kesim ürünlerinin (PARP-1 için 89kDa, kaspaz-3 için 19, 17kDa) protein düzeyleri immünoiblottama çalışmaları ile incelendi (Şekil 3a, b). Bu çalışmalarda 1µM staurosporin PARP-1 ve kaspaz-3 kesimini uyaran pozitif kontrol olarak kullanıldı. Beklendiği gibi staurosporin uygulaması PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin oluşumunu uyardı. Yalnızca Paklitaksel uygulamasının PARP-1 ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyardığı belirlendi (Şekil 3a, b). ASA ve SA uygulamalarının yalnızca 1mM uygulama dozlarında PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin oluşumunu uyardığı belirlendi. Yalnızca Paklitaksel uygulaması PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin oluşumunu uyardı. Paklitaksel, ASA ve SA ile eş uygulamasının sinerjistik etki göstererek PARP-1 ve kaspaz-3 kesimlerini doz-bağımlı olarak yalnızca Paklitaksel veya ASA ve SA uygulamalarına kıyasla daha güçlü düzeyde uyardığı belirlendi (Şekil 3a, b).



Şekil 3. Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının kaspaz-3 ve PARP-1 kesimi üzerine olan etkisinin incelenmesi. LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1mM, 1mM konsantrasyonunda salisilik asit ve asetilsalisilik asit 10nM Paklitaksel veya salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile eş uygulamaları gerçekleştirildi. 1µM staurosporin apoptotik uyarıcı olarak kullanıldı. PARP-1 ve kaspaz-3 protein düzeylerindeki değişimler immünoiblottama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.



Şekil 4. Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının etki mekanizmasının gösterimi.

4. Tartışma ve Sonuç

Dünya genelinde erkeklerde en sık teşhis edilen malignitelerden biri olan prostat kanserinin önlenmesi ve tedavi edilebilmesine yönelik çok sayıda hedefli tedavi geliştirilmiştir. Ancak kemoterapötiklerin ya da sıklıkla kullanılan anti-androjenlerin prostat kanseri progresyonu üzerinde kısıtlı ölçüde başarı sağladığı bilinmektedir [36]. Prostat kanserinin moleküler patogenezinde pro-inflamatuar sinyal mekanizmalarında yer alan gen ve proteinlerdeki değişikliklerin önemli olduğu ortaya konulmuştur [37]. Elde edilen bulgular, inflammatuar mekanizmaların da prostat kanseri gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar, SA, ASA ve diğer NSAID'lerin prostat kanseri riskini azaltabileceğini göstermiştir [38,39].

Trombositler, homeostazın sürdürülmesinde çok önemli bir role sahiptir ve son kanıtlar, kanser progresyonunda da önemli olduklarını göstermiştir. Ayrıca, son yıllarda aspirin bazlı kemoterapötikler için klinik öneriler oluşturulmuştur [40]. Aspirin® olarak bilinen ASA, analjezik, antipiretik özellikleri ile kardiyovasküler profilaksi için en sık kullanılan anti-platelet ajanlardan biridir [41,42]. *In vitro* çalışmalar, trombositlerin kanser hücrelerinde c-Myc dahil onkogenik proteinlerin aşağı düzenlenmesinin ASA'ya duyarlı olduğunu ortaya koymuştur [14]. Ayrıca, malign tümör mikro çevresinde COX-1 ve COX-2 ekspresyonunun yüksek olduğu ve bunun pro-inflamatuar ve apoptotik belirteç düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [43,44]. Bunun yanı sıra artan COX-2 ekspresyonları baş-boyun, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde görülmüştür [42]. SA, anti-inflamatuar tedavide iyi bilinen farmakolojik bir etkiye sahiptir [46]. ASA ve SA uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan ve kanser hücreleri üzerinde de önemli etkileri olabileceği düşünülen bileşikler olmasına rağmen prostat kanseri üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir [47].

Paklitaksel antimitotik ilaçlar olarak da bilinen mitoz inhibitörleri sınıfındandır. Mitoz inhibitörleri hücre bölünmesi sürecinde olan hücreleri hedefleyen kemoterapötik ilaçlardır [17]. Paklitaksel mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyerek mikrotübül etkinliğinde değişimlere yol açar ve bu yol ile mitoz ve hücre proliferasyonu için gerekli mikrotübül ağının bozulmasına neden olabilir [48]. Yapılan çalışmalar Paklitaksel'in uygulama dozuna bağlı olarak farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Düşük konsantrasyonlarda (5-30 nM) mikrotübül dinamiğini etkileyerek G2/M fazında duraklamaya neden olurken [49], yüksek konsantrasyonlarda (0.2 µM-30 µM) mikrotübül hasarına [50], mitojen ile uyarılmış protein kinazların (MAPK), Raf-1 protein tirozin kinazların, c-JUN kinazların, siklin bağımlı kinazların ve kaspazların gen anlatımlarında değişimlere yol açtığı rapor edilmiştir [51]. Buna karşın Paklitaksel'in bazı hücreler üzerinde etkili olması ancak bazı kanser tiplerinde etkisiz olması biyokimyasal etkilerinin yalnızca mitotik duraklama ile ilişkili olmadığını ve henüz tam olarak anlaşılmamış başka hücrel mekanizmaların da varlığına işaret etmektedir [19]. Bu çalışma kapsamında Paklitaksel'in SA ve ASA ile eş uygulamasının prostat kanseri üzerinde otofaji, UPR ve apoptotik hücre ölümü ile ilişkisi incelenmiştir.

Tip-II hücre ölümü olarak bilinen otofaji uzun ömürlü ve hatalı katlanmış proteinlerin, hasarlı organellerin otofagozomlar aracılığıyla lizozomlara yönlendirilmesinden ve bu yol ile yıkımından sorumlu ileri düzeyde korunmuş sofistike bir mekanizmasıdır. Ayrıca otofaji protein geri dönüşümü için hücrelerde çalışan en etkili mekanizmalardan birisidir [52]. Radyasyon, metabolik stres, ER stresi ve kemoterapötikler gibi çeşitli faktörlerin otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [53]. Otofajinin karsinogenezin farklı aşamalarında dinamik bir rolü olduğu, tümör baskılayıcı veya destekleyici rolleri üstlendiği bilinmektedir [54]. Kemoterapötiklerin ve birçok doğal ürünün doğrudan otofaji üzerinde düzenleyici etkileri olduğu belirlenmiştir [55-58]. Hücrelerdeki artan otofajik aktivitenin hücre ölümüne neden olabilmektedir. Buna karşın yavaşlayan otofaji hücrenin ihtiyaç duyduğu besin gereksinimlerinin sağlanmasında kısıtlayıcı bir etkiye sebep olabildiğinden hücreler üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir. Bu nedenle çalışmalarımızda Paklitaksel ile SA ve ASA'nın eş uygulamasının otofaji üzerine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca Paklitaksel klinikte sıklıkla tercih edilen, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmakta olan anti-mikrotübül bir ajandır ve kaspaz-3, kaspaz-9 ve PARP aktivasyonuna yol açarak intrinsik otofajiyi indüklediği bilinmektedir [59].

Hücrelerde otofajinin takibinde otofaji proteinlerinin düzeylerindeki değişimler, bir ubiquitin reseptörü olan ve otofajik yol ile yıkıma uğradığı bilinen substrat proteini p62/SQSTM1'in düzeylerindeki değişimler ve LC3-II'nin lipidasyonu ile oluşan LC3-II düzeylerinin incelenmesi gibi yaklaşımlardan faydalanılmaktadır [60]. Otofaji sırasında LC3-I, Atg7 ve Atg3'ünde yer aldığı ubiquitin benzeri bir sistem tarafından lipidasyon yoluyla LC3-II'ye dönüştürülür. LC3-II'nin otofagozomal membran oluşumunda yer aldığı bilinmektedir [61]. Atg5 fagoforik membran yapısının uzatılmasında anahtar rol oynayan bir proteindir [62]. p62/SQSTM1 turnover'ı otofajik aktivitenin takibinde hücre düzeyindeki çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. p62/SQSTM1 otofagozomal membran proteini LC3/Atg8'i bağlayarak p62/SQSTM1 içeren protein birikimlerini otofagozoma taşımaktadır. Otolizozomlar aracılı kargo proteinlerinin bozunması sırasında p62/SQSTM1 düzeylerinde azalma görülmektedir. Aksine otofajik blokasyon ise p62/SQSTM1 düzeylerinde artışa yol açmaktadır [63]. Sonuçlarımıza göre ASA ve SA'nın LNCaP hücrelerinde Atg5 düzeylerinde azalmaya, p62/SQSTM1 ve LC3-II düzeylerinde ise artışa neden olduğu belirlendi. Bununla birlikte yalnızca Paklitaksel uygulamasının ise LC3-II düzeylerinde düşük düzeyde artışa yol açtığı, p62/SQSTM1 düzeylerinde ise dikkat çekici bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Atg5 düzeyleri ise Paklitaksel uygulaması ile artış gösterdi. Eş uygulama denemelerimizde SA ve ASA'nın Paklitaksel ile birlikte uygulaması p62/SQSTM1 düzeylerinde doz bağımlı düşüğe, Atg5 düzeylerinde ise artışa neden oldu. LC3-II düzeylerinde ise yalnızca SA ve ASA uygulamalarına kıyasla LC3-II düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlendi. Toplu olarak bu sonuçlar SA ve ASA'nın hücrelerdeki otofajik aktiviteyi yavaşlattığını buna karşı yalnızca Paklitaksel uygulamasının otofajiyi uyardığını göstermektedir. Eş uygulama denemeleri ise kombine tedavinin prostat kanseri hücrelerinde otofajik aktivitede daha güçlü bir artışına neden olduğunu işaret etmektedir (Şekil 1a, b).

ER stresi başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patofizyolojisinin altında yatan önemli mekanizmalardan birisidir. ER hücrelerde protein sentezi, modifikasyonu, kalite-kontrolü ve selektif olarak yıkıma yönlendirilmesinde başlıca rol oynayan organeldir [64]. Kanser hücreleri artan metabolik gereksinimlerini karşılayabilmek için ER stresi indüksiyonu yolu ile UPR sinyalini aktive etmektedir. UPR, ER'nin yeniden programlanmasında protein kalite kontrol süreci ile ilişkili protein gruplarının düzeylerinin arttırılmasında ve ER'nin kapasitesinin genişletilmesinde rol oynayan başlıca mekanizmadır [65]. Ayrıca kanser hücrelerinin ilaç direnci geliştirmesinde ER stresi ile ilişkili mekanizmalardan faydalandığı günümüzde daha iyi anlaşılmıştır. Buna karşın ER stresinin aşırı uyarımı programlanmış hücre ölümünü uyarabilmektedir [66]. Bu nedenle kansere yönelik geliştirilen terapilerde ER stresinin aşırı uyarımı temel hedefler arasında yer almaktadır. UPR sistemi ER membranında lokalize 3 transmembran proteini olan IRE1 α , ATF6 ve PERK aracılı olarak kontrol edilmektedir. Günümüzde PERK sinyalinin aşırı uyarımının hücre ölümündeki rolü iyi anlaşılmıştır [53]. PERK aktivasyonu, PERK'in aşağı efektör proteini olan protein translasyonunda görevli eIF2 α 'nın fosforilasyonunun indüksiyonuna neden olarak hücrelerdeki global translasyonun duraksamasına ve seçici olarak UPR hedef proteinlerinin translasyonuna izin vermektedir. Uzun süreli UPR aktivasyonunun pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörü olan CHOP düzeylerinde artışa neden olarak ekstrinsik apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir [67]. Bulgularımız, SA ve ASA uygulamasının PERK düzeylerinde artışa ve eIF2 α fosforilasyonuna neden olduğunu ancak hücrelerde yüksek düzeyde ER stresi uyarımı gerçekleşmediğinden CHOP aktivasyonunu uyarmadığını göstermektedir. Buna karşın Paklitaksel uygulamasının ER stresini güçlü bir şekilde uyardığı ve CHOP aktivasyonuna neden olduğu belirlendi. SA ve ASA'nın Paklitaksel ile eş uygulamasının yalnızca Paklitaksel uygulamasına kıyasla doza bağlı olarak CHOP uyarımını daha güçlü bir şekilde uyardığını göstermiştir (Şekil 2a, b). Bu sonuçlar Paklitaksel, ASA ve SA kombine tedavisinin

sinerjistik olarak ER stresinin yol açtığı PERK aktivasyonu aracılı olarak pro-apoptotik protein olan CHOP düzeyini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Son olarak SA ve ASA'nın Paklitaksel'in hücreler üzerindeki apoptotik etkilerine olan olası katkılarını incelemek amacıyla hücrelerdeki apoptotik etkilerin incelenmesinde sıklıkla test edilen kaspaz-3 ve PARP-1'in kesim ürünlerinin düzeylerini inceledik [68]. Kaspaz-3; PARP-1 gibi birçok anahtar proteinin proteolitik kesiminden sorumlu olan önemli bir apoptotik aktivatördür ve aktivasyonu sırasında proteolitik olarak kesime uğramaktadır. Kaspaz-3'ün 17 ve 19 kDa'luk fragmentleri kaspaz-3 aktivasyonunun takibinde kullanılmaktadır [69]. PARP-1 hücrel streslerin neden olduğu DNA hasarlarının tamirinde rol oynamaktadır. Aşırı DNA hasarı PARP-1'in hiper aktivasyonuna yol açarak kaspaz enzimi aracılı olarak kesime uğramasına yol açmakta ve bu yol ile DNA'nın fragmentasyonuna ve hücrel parçalanmaya destek vermektedir. Bu nedenle 89 kDa'luk PARP-1 fragmanı apoptotik hücre ölümünün takibinde sıklıkla kullanılmaktadır [70,71]. SA ve ASA uygulamalarının kaspaz-3 ve PARP-1 kesimlerini yalnızca en yüksek dozlarında uyardığı belirlendi. Paklitaksel uygulamasının ise literatür ile uyumlu bir şekilde PARP-1 ve kaspaz-3 aktivasyonunu gerçekleştirdiği doğrulandı. Eş uygulama sonuçlarımız, 0.1mM SA ve ASA ile Paklitaksel eş uygulamalarında yalnız başına Paklitaksel uygulamasının neden olduğu PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin düzeylerine kıyasla bir değişime yol açmadığını, 1mM SA ve ASA ile Paklitaksel eş uygulamalarının ise kaspaz-3 ve PARP-1 kesim ürünlerinin düzeylerini etkili bir şekilde arttırdığı saptandı (Şekil 3a, b). Bu sonuçlar 1mM SA ve ASA'nın Paklitaksel ile eş uygulamanın apoptotik proteinler üzerinde sinerjistik bir etki sergilediğini önermektedir.

Toplu olarak sonuçlarımız Paklitaksel'in SA ve ASA kombinasyonunun otofajik aktivasyona, UPR'nin PERK kolunun aktivasyonu aracılı CHOP uyarımına, apoptotik proteinler olan kaspaz-3 ve PARP-1 aktivasyonuna yol açarak prostat kanseri hücrelerinde güçlü etkilere sahip olduğunu önermektedir (Şekil 4). Bulgularımız Paklitaksel'in, SA ve ASA kombinasyonunun prostat kanseri hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonuna yol açarak Paklitaksel'in terapötik etkinliğinin güçlendirilmesinde alternatif bir yaklaşım sunabileceğini düşündürmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmadaki bazı analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan ekipmanların erişimine izin verdiğinden dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (YETEM)'ne teşekkür ederiz. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesinde Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen (TSG-2021-8302, TAB-2020-8253) projemiz kapsamındaki bütçeden faydalanılmıştır.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 71(3), 209-249.
- [2] Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 73(1), 17-48.
- [3] Brookman-May, S. D., Campi, R., Henríquez, J. D. S., Klatte, T., Langenhuisen, J. F., Brausi, M., Linares-Espinós, E., Volpe, A., Marszalek, M., Akdogan, B., Roll, C., Stief, C. G., Rodríguez-Faba, O., & Minervini, A. 2019. Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU). European Urology Focus
- [4] Crawford, E. D., Petrylak, D., & Sartor, O. 2017. Navigating the evolving therapeutic landscape in advanced prostate cancer. Urologic Oncology, 35S, S1-S13.

- [5] Patrikidou, A., Lorient, Y., Eymard, J.-C., Albiges, L., Massard, C., Ileana, E., Di Palma, M., Escudier, B., & Fizazi, K. 2014. Who dies from prostate cancer? *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 17(4), 348–352.
- [6] Simić, A., Manojlović, D., Segan, D., & Todorović, M. 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12(10), 2327–2340.
- [7] Ekinci, D., Sentürk, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. 2011. Salicylic acid derivatives: synthesis, features and usage as therapeutic tools. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(12), 1831–1841.
- [8] Dachineni, R., Ramesh Kumar, D., Callegari, E., Kesharwani, S. S., Sankaranarayanan, R., Seefeldt, T., Jayarama Bhat, G. 2017. Salicylic acid metabolites and derivatives inhibit CDK activity: Novel insights into aspirin's chemopreventive effects against colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 51(6), 1661-1673.
- [9] Veyselova, D., & Kutlu, H. M. 2015. Inhibitory effects of salicylic acid on A549 human lung adenocarcinoma cell viability. *Turkish Journal of Biology = Turk Biyoloji Dergisi / the Scientific and Technical Research Council of Turkey*, 39(1), 1–5.
- [10] Mahdi, J. G., Alkarrawi, M. A., Mahdi, A. J., Bowen, I. D., & Humam, D. 2006. Calcium salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cell Proliferation*. 39(4), 249-60.
- [11] Fuster, V., & Sweeny, J. M. 2011. Response to Letter Regarding Article, "Aspirin: A Historical and Contemporary Therapeutic Overview". *Circulation*. 124(12).
- [12] Vane, J. R., & Botting, R. M. 1996. The history of anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *New Targets in Inflammation*.
- [13] Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Pittman, B., & Reddy, B. S. 2006. Adenocarcinoma of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. *The Prostate*, 66(3), 257–265.
- [14] Mitrugno, A., Sylman, J. L., Ngo, A. T. P., Pang, J., Sears, R. C., Williams, C. D., & McCarty, O. J. T. 2017. Aspirin therapy reduces the ability of platelets to promote colon and pancreatic cancer cell proliferation: Implications for the oncoprotein c-MYC. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 312(2), C176–C189.
- [15] Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. 1971. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327.
- [16] Wall, M. E., & Wani, M. C. 1995. Camptothecin and taxol: discovery to clinic—thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, 55(4), 753–760.
- [17] Matson, D. R., & Stukenberg, P. T. 2011. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Molecular Interventions*, 11(2), 141–150.
- [18] Surapaneni, M. S., Das, S. K., & Das, N. G. 2012. Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. *ISRN Pharmacology*, 2012, 623139.
- [19] Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. 2009. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science*, 122(Pt 15), 2579–2585.
- [20] Denton, D., & Kumar, S. 2018. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*, 26(4), 605–616.
- [21] Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3.
- [22] Mizushima, N. 2005. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation*, 12 Suppl 2, 1535–1541.
- [23] Kundu, M., & Thompson, C. B. (2008). Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 3, 427-55.
- [24] Li, X., He, S., & Ma, B. 2020. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*. 19(12).
- [25] Sheng, J., Qin, H., Zhang, K., Li, B., & Zhang, X. 2018. Targeting autophagy in chemotherapy-resistant of hepatocellular carcinoma. *American Journal of Cancer Research*, 8(3), 354–365

- [26] Castoldi, F., Vacchelli, E., Zitvogel, L., Maiuri, M. C., Pietrocola, F., & Kroemer, G. 2019. Systemic autophagy in the therapeutic response to anthracycline-based chemotherapy. *Oncoimmunology*, 8(1), e1498285.
- [27] Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13(2), 89-102.
- [28] Tabas, I., & Ron, D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*. 13(3), 184-90.
- [29] Sidrauski, C., & Walter, P. 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), 1031–1039.
- [30] Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M., & Piacentini, M. 2017. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Frontiers in Oncology*. 7:78.
- [31] Erzurumlu, Y., & Ballar, P. 2017. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 7, 40719.
- [32] Viljoen, T.C., van Aswegen, C.H., du Plessis, D.J., 1995. Influence of acetylsalicylic acid and metabolites on DU-145 prostatic cancer cell proliferation. *Oncology*, 52(6), 465-9.
- [33] Tolba, M. F., Esmat, A., Al-Abd, A. M., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Mosli, H. A., Abdel-Rahman, S. Z., & Abdel-Naim, A. B. 2013. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances docetaxel and paclitaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. *IUBMB Life*, 65(8), 716-29.
- [34] Ho, C.-C., Yang, X. W., Lee, T.-L., Liao, P.-H., Yang, S.-H., Tsai, C.-H., & Chou, M.-Y. 2003. Activation of p53 signalling in acetylsalicylic acid-induced apoptosis in OC2 human oral cancer cells. *Eur J Clin Invest*.
- [35] Yoshii, S. R., & Mizushima, N. 2017. Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
- [36] Thompson, I. M., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Miller, G. J., Ford, L. G., Lieber, M. M., Cespedes, R. D., Atkins, J. N., Lippman, S. M., Carlin, S. M., Ryan, A., Szczepanek, C. M., Crowley, J. J., & Coltman, C. A., Jr. 2003. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 349(3), 215–224.
- [37] Palapattu, G. S., Sutcliffe, S., Bastian, P. J., Platz, E. A., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. 2005. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*, 26(7), 1170–1181.
- [38] Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Pittman, B., & Reddy, B. S. 2006. Adenocarcinoma of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. *The Prostate*, 66(3), 257–265.
- [39] Dennis, L. K., Lynch, C. F., & Torner, J. C. 2002. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*. 60(1), 78-83.
- [40] Tao, D. L., Tassi Yunga, S., Williams, C. D., & McCarty, O. J. T. 2021. Aspirin and antiplatelet treatments in cancer. *Blood*, 137(23), 3201–3211.
- [41] Maclagan, T. 1876. The Treatment Of Acute Rheumatism By Salicin. *The Lancet*. 29(6), 1321-3.
- [42] Drew, D. A., Cao, Y., & Chan, A. T. 2016. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nature Reviews. Cancer*, 16(3), 173–186.
- [43] Negi, R. R., Rana, S. V., Gupta, V., Gupta, R., Chadha, V. D., Prasad, K. K., & Dhawan, D. K. 2019. Over-Expression of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(6), 1675–1681.
- [44] Wilson, A. J., Fadare, O., Beeghly-Fadiel, A., Son, D.-S., Liu, Q., Zhao, S., Saskowski, J., Uddin, M. J., Daniel, C., Crews, B., Lehmann, B. D., Pietenpol, J. A., Crispens, M. A., Marnett, L. J., & Khabele, D. 2015. Aberrant over-expression of COX-1 intersects multiple pro-tumorigenic pathways in high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 6(25), 21353–21368.
- [45] Sangha, S. 2005. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer prevention. *Postgraduate Medical Journal*. 106(7), 1340-1350.

- [46] Vergne, P., Bertin, P., & Trèves, R. 2000. Aspirine, douleurs et inflammation [Aspirin, pain and inflammation]. *La Revue de medecine interne*, 21, 89–96.
- [47] Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Mur, L. A. J., & Morgan, G. 2009. Aspirin, salicylates, and cancer. *The Lancet*, 373(9671), 1301–1309.
- [48] Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., & Wilson, L. 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20), 9552–9556.
- [49] Wang, J., Lou, P., Lesniewski, R., & Henkin, J. 2003. Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anti-Cancer Drugs*, 14(1), 13–19.
- [50] Pulkkinen, J. O., Elomaa, L., Joensuu, H., Martikainen, P., Servomaa, K., & Grenman, R. 1996. Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(4), 214–218.
- [51] Stone, A. A., & Chambers, T. C. 2000. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 254(1), 110–119.
- [52] Dupont, N., Leroy, C., Hamaï, A., & Codogno, P. 2017. Long-Lived Protein Degradation During Autophagy. *Methods in Enzymology*. 588, 31-40.
- [53] Yoshida, G. J. 2017. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 67.
- [54] Chun, Y., & Kim, J. 2018. Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells*, 7(12).
- [55] Wang, K., Liu, X., Liu, Q., Ho, I. H., Wei, X., Yin, T., Zhan, Y., Zhang, W., Zhang, W., Chen, B., Gu, J., Tan, Y., Zhang, L., Chan, M. T., Wu, W. K., Du, B., & Xiao, J. 2020. Hederagenin potentiated cisplatin- and paclitaxel-mediated cytotoxicity by impairing autophagy in lung cancer cells. *Cell Death & Disease*, 11(8), 611.
- [56] Lin, J., Chen, S., Lu, C., Lin, J., & Yen, G. 2020. Ursolic acid promotes apoptosis, autophagy, and chemosensitivity in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer cells. *Phytotherapy Research*. 34(8), 2053-2066.
- [57] Wang, Y., Xie, W., Humeau, J., Chen, G., Liu, P., Pol, J., Zhang, Z., Kepp, O., & Kroemer, G. 2020. Autophagy induction by thiostrepton improves the efficacy of immunogenic chemotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1).
- [58] Erzurumlu, Y., Dogan, H. K., Catakli, D., & Aydogdu, E. 2022. Tarantula cubensis Extract Induces Cell Death in Prostate Cancer by Promoting Autophagic Flux/ER Stress Responses and Decreased Epithelial-Mesenchymal Transition. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 32, 575-582.
- [59] Khing, T. M., Choi, W. S., Kim, D. M., Po, W. W., Thein, W., Shin, C. Y., & Sohn, U. D. 2021. The effect of paclitaxel on apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe in AGS cells. *Scientific Reports*, 11(1), 23490.
- [60] Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W. M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antony, B., & Melia, T. J. 2014. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nature Cell Biology*, 16(5), 415–424.
- [61] Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811).
- [62] Arakawa, S., Honda, S., Yamaguchi, H., & Shimizu, S. 2017. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 93(6), 378.
- [63] Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology*, 452.
- [64] Schröder, M., & Kaufman, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 739–789.

- [65] Almanza, A., Carlesso, A., Chinthia, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleruche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., A. M., Healy, S., Kozlov, A., Muñoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E., & Samali, A. 2019. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*; 286: 241–278.
- [66] Bahar, E., Kim, J.-Y., & Yoon, H. 2019. Chemotherapy Resistance Explained through Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Signaling. *Cancers*, 11(3).
- [67] Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., & Majsterek, I. 2016. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current Molecular Medicine*. 16(6), 533-44.
- [68] Soldani, C., Lazzè, M. C., Bottone, M. G., Tognon, G., Biggiogera, M., Pellicciari, C. E., & Ivana Scovassi, A. 2001. Poly(ADP-ribose) Polymerase Cleavage during Apoptosis: When and Where? *Experimental Cell Research*. 296(2), 193-201.
- [69] Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., & Lazebnik, Y. A. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535).
- [70] Weaver, A. N., & Yang, E. S. 2013. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 290.
- [71] Oliver, F. J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M. C., de Murcia, G., & Murcia, J. M. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(50).

Covid-19 Pandemisi Sürecinde Birinci Basamak Sağlık Çalışanlarının Kişilik Özellikleri ve Stres Düzeyleri Arasındaki İlişki

The Relationship Between Personality Traits and Stress Levels of Primary Health Care Workers in The Covid-19 Pandemic Process

Tuğçe SALBUR ^{1*}, Büşra ALTINEL ²

¹ Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Hemşireliği, Konya, Türkiye
² Selçuk Üniversitesi, Hemşirelik Fakültesi, Konya, Türkiye



Ö Z

Amaç: Bu çalışma Covid-19 pandemi sürecinde birinci basamak sağlık çalışanlarının kişilik özellikleri ile stres düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal-Metot: Tanımlayıcı ilişki arayıcı tipteki bu araştırma Haziran 2021-Eylül 2021 tarihleri arasında, Konya il ve ilçelerinde çalışan 256 birinci basamak sağlık çalışanı ile yürütülmüştür. Veriler "Tanıtıcı Bilgi Formu", "Algılanan Stres Ölçeği" ve "Büyük Beş Kişilik Testi-50" ile online ortamda toplanmıştır. Veriler sayı, yüzde, ortalama, t testi, ANOVA ve pearson korelasyon testi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada sağlık çalışanlarının Büyük Beş Kişilik Testi-50 Dışa Dönüklük alt boyutu puan ortalaması 32,93±7,13; Uyumluluk-Yumuşak Başlılık alt boyutu puan ortalaması 39,77±4,51; Sorumluluk-Özdenetim alt boyutu puan ortalaması 41,35±5,45; Duygusal Dengelilik alt boyut puan ortalaması 30,33±7,51 ve Zeka/Hayal Gücü alt boyut puan ortalaması 39,00±4,66, Algılanan Stres Ölçeği puan ortalaması ise 27,97±6,95 olarak bulunmuştur. Çalışmaya katılan birinci basamak sağlık çalışanlarının cinsiyeti, eğitim durumu ve Covid-19 pozitif hastayla teması ile Algılanan Stres Ölçeği puan ortalaması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0,05). Algılanan Stres Ölçeği puan ortalaması ile Büyük Beş Kişilik Testi-50 alt boyutlarından Uyumluluk-Yumuşak Başlılık alt boyut puan ortalaması ile negatif yönde zayıf düzeyde ve Duygusal Dengelilik alt boyut puan ortalaması ile negatif yönde orta düzeyde bir ilişki olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

Sonuçlar: Sağlık çalışanlarının desteklenmesinin, motive edici aktivitelerin ve stresle baş etme eğitimlerinin düzenlenmesi pandemi gibi süreçlerde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, Kişilik, Sağlık çalışanları, Stres

Alınış / Received: 12.05.2022 Kabul / Accepted: 10.05.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Objective: This study was conducted to examine the relationship between the personality traits and stress levels of primary health care workers during the Covid-19 pandemic process.

Material-Method: This descriptive research was conducted with 256 primary health care workers working in Konya between May 2021 and March 2022. The data were collected online with the "Descriptive Information Form", "Perceived Stress Scale" and "Big Five Questionnaire". Data were evaluated with number, percentage, mean, t test, ANOVA and pearson correlation test.

Results: In this study, the mean score of the Big Five Questionnaire Extraversion sub-dimension of healthcare professionals was 32.93 ± 7.13 ; Agreeableness-Softness sub-dimension mean score was 39.77 ± 4.51 ; The mean score of the Responsibility-Self-Control sub-dimension was 41.35 ± 5.45 ; Emotional Stability sub-dimension mean score was 30.33 ± 7.51 , Intelligence/Imagination sub-dimension mean score was 39.00 ± 4.66 , and Perceived Stress Scale mean score was 27.97 ± 6.95 . A statistically significant difference was found between the gender, educational status and contact with Covid-positive patients of the primary health care workers participating in the study, and the Perceived Stress Scale mean score ($p < 0,05$). It was determined that there was a weak negative correlation with the Perceived Stress Scale mean score and the Agreeableness-Softness sub-dimension mean score, which is one of the Big Five Questionnaire sub-dimensions, and a moderate negative relationship with the Emotional Stability sub-dimension mean score ($p < 0.001$).

Conclusion: It is thought that supporting health workers, organizing motivating activities and stress coping trainings will be beneficial in processes such as pandemics.

It is thought that supporting health workers, organizing motivating activities and stress coping trainings will be beneficial in processes such as pandemics.

Keywords: COVID-19, Personality, Stress, Health workers



1. Giriş

Stres, bireylerin iyi oluşluklarını, başa çıkma becerilerini, fiziksel güvenliklerini ve iç huzurlarını tehdit eden önemli bir durumdur. Ani yaşam değişikliklerinin olması, engellenme, çatışma ve baskı bireylerde stres oluşumuna sebep olabilmektedir [1]. Stres sistemik, fizyolojik, sosyal ve psikolojik olmakla birlikte, stresörler fiziksel, zihinsel, ruhsal, duygusal, sosyal ya da ekonomik olabilmektedir [2]. Stresörlerin birey üzerindeki kısa ve uzun dönem etkileri de farklılık göstermektedir. Fizyolojik stresörler kısa dönemde kas gerginliği, kalp atışında artış ve unutkanlık gibi sorunlara yol açarken; uzun dönemde baş ağrısı, anksiyete, depresyon, uyku bozukluklarına ve obsesif düşüncelere yol açabilmektedir [3].

Stres, sosyo-demografik değişkenler açısından ele alındığında yaş [4], cinsiyet [5], gelir düzeyi, eğitim düzeyi [6], medeni durum [7], sosyo-ekonomik düzey [8,9] ile ilişkilidir. Bireylerin stres düzeyleri ve başa çıkma süreçlerine bakıldığında ise kişilik özelliği ön plana çıkmaktadır [2]. Kişilik bireyin kendisi kaynaklı tutarlı davranış kalıpları ve kişilik içi süreçler olarak ifade edilmektedir [10]. Kişilikle ilgili yapılan çalışmalar kişiliği farklı özellikleri yönünden ele almışlardır. McCrea ve Costa Beş Faktör Kişilik Kuramında kişiliği Dışadönüklük, Deneyime Açıklık, Uyumluluk, Sorumluluk ve Nevrotiklik boyutlarıyla açıklamışlardır. Dışa dönük bireyler sosyal, neşeli, atılgan davranışlar gösterirken; uyumlu bireyler uyum sağlamaya istekli, sakin ve rahat davranışlar göstermektedirler. Sorumlu bireylerde ise başarı gayreti, baskın amaç duygusu ve yüksek istek düzeyi görülmektedir. Nevrotik bireyler üzüntü, umutsuzluk,

suçluluk, anksiyete gibi deneyimlere yatkındırlar. Deneyime açık bireylerin ise hayal güçleri gelişmiş, ilgi alanları geniş ve cesur davranış göstermektedirler [11].

Stresi ortaya çıkaran en önemli faktörlerden birinin iş hayatı olduğu ve özellikle sağlık çalışanlarında işe bağlı olarak stresin ortaya çıkabileceği görülmektedir [12]. Hastalar tarafından yapılan fiziksel ve sözel istismar, iş ortamında maruz kalınan zorbalık, verilen hizmet sebebi ile dava edilme riski, kaynak yetersizliği, yönetici ya da üst desteğinin olmaması, ağır iş yükü, hasta beklentileri, vardiyalı çalışma sistemi, diğer meslek grupları ile olan rol çatışmaları sağlık çalışanları için iş yerinde ortaya çıkan stres nedenleridir [13]. Gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde sağlık sektöründe stres her zaman ön planda olmakla birlikte sağlık çalışanlarının stres düzeyi artmaktadır [14]. Sağlık çalışanları diğer meslek gruplarına göre daha çok depresyon, stres ve stresle ilişkili sağlık sorunları yaşamaktadırlar [15]. Sağlık çalışanlarında klinik taleplerin artması ile birlikte, iş ortamındaki bazı olumsuz durumlar (uzun çalışma saatleri, üst ve meslektaş desteği eksikliği gibi) işe devamsızlığa, bazı ruhsal sorunlara ve somatik bozukluklara neden olabilmektedir [16]. İş stresi, işin niteliğini ve çalışma hayatının kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir [17]. Sağlık çalışanlarındaki yüksek stres varlığı sağlık hizmetlerinin sağlanmasında toplumsal yönde birçok olumsuz sonuç ortaya çıkarmaktadır [18].

Salgınla teması en fazla olan sağlık çalışanları psikolojik açıdan daha riskli bir konuma gelmişlerdir. Pandemi sürecinde uzun çalışma saatleri, koruyucu ekipmanların neden olduğu sınırlılık, virüse yakalanma riskinin yüksek olması ve bu virüsü ailelerine taşıma riski, artan iş yüküne bağlı fiziksel yorgunluk, yalnızlık ve ailelerinden ayrı kalma gibi nedenler sağlık çalışanlarının stresini daha da artırmıştır [19]. Pandemi sürecinde birinci basamak, salgınla mücadelenin ilk basamağıdır. Temel sağlık hizmetleri kapsamında birinci basamak sağlık hizmetleri değişime uğrayarak kapsamı değişmektedir [20]. Hastaların evlerinde yönetilmesi, halk sağlığı ile ilgili mesajların iletilmesi ve hastaneye yatırılacak hastaların belirlenmesini birinci basamak sağlık çalışanları gerçekleştirmektedir. Covid-19 pandemisinde maske kullanımı, hijyen kurallarına uyulması, sosyal ve fiziksel mesafenin sağlanması, şüpheli vakaların tespit edilip karantinaya alınması, temaslı takibinin yapılması, Covid-19 testlerinin yapılması, teletıp kullanılması ve kronik hasta takibi birinci basamak sağlık çalışanları tarafından takip edilmiştir. Bütün bu değişen roller çalışanlarda ayrıca strese sebep olmaktadır. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında birinci basamakta çalışan sağlık çalışanları da pandemi kaynaklı strese maruz kalmışlardır [21].

Literatüre bakıldığında sağlık çalışanlarının çalışma şartları ve iş kaynaklı stresin yüksek olduğunu ortaya koyarken var olan stresin pandemi sürecinde daha da arttığını göstermektedir [22,23]. Bireylerin kişilik özellikleri ile iş stresi algıları arasında da yakın bir ilişki olduğu belirtilmektedir [24]. Literatürde sağlık çalışanlarının kişilik özellikleri ile iş stresi arasında ilişkinin direk incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma Covid-19 pandemi sürecinde birinci basamak sağlık çalışanlarının kişilik özellikleri ile stres düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılmıştır.

Araştırma Soruları:

- Birinci basamak sağlık çalışanlarında stres düzeyleri ve kişilik özellikleri nasıldır?
- Birinci basamak sağlık çalışanlarının temel özelliklerine göre stres düzeyleri değişmekte midir?
- Birinci basamak sağlık çalışanlarının kişilik özellikleri ile stres düzeyi arasında ilişki var mıdır?

2. Materyal ve Metot

Araştırmanın Tipi

Tanımlayıcı ilişki arayıcı tipteki bu araştırma Haziran 2021- Eylül 2021 tarihleri arasında, Konya il ve ilçelerinde çalışan birinci basamak sağlık çalışanlarıyla yürütülmüştür.

Araştırmanın Evreni ve Örnekleme

Çalışmanın evreni Konya merkez ve ilçelerinde bulunan 31 ilçe sağlık müdürlüğü ve 702 aile hekimliği biriminde çalışan doktor, hemşire, ebe, sağlık memuru vb. 4505 birinci basamak sağlık çalışanıdır. Cohen'in evreni bilinen gruplarda örnek büyüklüğü hesaplamasına göre %90 güven aralığı %5 hata payına göre alınması gereken minimum örnek sayısı 256 olarak hesaplanmıştır [25]. Çalışma, olasılıksız

örnek seçim yöntemlerinden gelişigüzel örnek seçim yöntemi kullanılarak ulaşılan 256 birinci basamak sağlık çalışanı ile tamamlanmıştır.

Dahil Edilme Kriterleri

- Pandemi sürecinde birinci basamak sağlık hizmetlerinde aktif olarak çalışmak
- Çalışmaya katılmaya gönüllü olmak

Dışlama Kriterleri

- Psikolojik tanı almış olma

Veri Toplama Araçları

Verilerin toplanmasında, “Tanıtıcı Bilgi Formu”, “Algılanan Stres Ölçeği” ve “Büyük Beş Kişilik Testi-50 (B5KT-50)” kullanılmıştır.

Tanıtıcı Bilgi Formu

Araştırmacılar tarafından literatür doğrultusunda [4,26] hazırlanan “tanıtıcı bilgi formu”; birinci basamak sağlık çalışanlarının temel özelliklerine (yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, meslek, medeni durum, çocuk sahibi olma durumu, meslek yılı, kalınan yer, kronik rahatsızlık olma durumu, Covid-19’lu hastayla doğrudan temas durumu, bireyin yada ailesinin Covid-19 geçirme durumu) ilişkin 12 sorudan oluşmaktadır.

Büyük Beş Kişilik Testi-50 (B5KT-50)

‘Büyük Beş Testi’ temel alınarak Goldberg (1992) tarafından geliştirilmiş olan Büyük Beş Kişilik Testi-50 (B5KT-50) Türkçe’ye Tatar (2017) tarafından çevrilmiştir [27]. Alt boyutları I-Dışa dönüklük, II-Uyumluluk, III-Sorumluluk, IV-Duygusal dengelilik ve V-Zeka/hayal gücü olarak adlandırılmıştır. Her bir alt boyutunda 10 madde bulunan ölçek, ‘1-hiç uygun değil’ ile ‘5-çok uygun’ arasında beşli likert puanlanan toplam 50 maddeden oluşmaktadır. Ölçeğin her alt boyutunda alınabilecek en düşük puan 10 iken en yüksek puan 50’dir. Her bir alt boyut için 10-23 puan düşük, 23-36 puan orta ve 36-50 puan yüksek olarak belirlenmiştir. Türkçe’ye çeviri çalışmasında iç tutarlılık güvenirlik katsayılarının 0,65-0,79 değerleri arasında olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada ise ölçek alt boyutlarının Cronbach’s alpha değerleri 0,73-0,86 arasında bulunmuştur.

Algılanan Stres Ölçeği (ASÖ)

Cohen, Kamarck ve Mermelstein (1983) tarafından geliştirilen ASÖ Türkçe’ye Eskin vd. (2013) tarafından çevrilmiştir [28]. ASÖ “0- Hiçbir zaman” ile “4- Çok sık” arasında değişen 5’li Likert tipinde ve toplam 14 maddeden oluşmaktadır. Olumlu ifade içeren 7 madde ters puanlanmaktadır. Ölçekten alınabilecek minimum puan 0, maximum puan 54’tür ve yüksek puan bireyin yaşadığı stres algısının yüksek olduğunu göstermektedir. Ölçeğin iç tutarlık katsayısı 0.84 ve test-tekrar-test güvenirliği 0.87 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Cronbach’s alpha değeri 0,85 olarak hesaplanmıştır.

Veri Toplama Tekniği

Veri toplama araçları online anket tasarımına göre düzenlenmiş ve araştırma verileri online anket aracılığıyla (whatsapp, sosyal medya) toplanmıştır.

Verilerin Analizi

Veriler SPSS paket programında değerlendirilmiştir. Veriler sayı, yüzde ve ortalama, standart sapma şeklinde özetlenmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogrov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş, normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında t testi, ANOVA testi, pearson korelasyon testi kullanılmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir [29].

Çalışmanın Etik Yönü

Çalışmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik onay (Karar no:2021/54) alınmıştır. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bilimsel Araştırma Çalışmalarından yazılı olarak onay alınmıştır. Çalışma grubuna araştırmacının amacı hakkında bilgi verilerek onamları alınmıştır.

3. Bulgular

Tablo 1. Birinci Basamak Sağlık Çalışanlarının B5KT-50 ve ASÖ Puan Ortalamaları

	Ort±SS	Min-Max
Dışa Dönüklük	32,93±7,13	12,00 – 49,00
Uyumluluk – Yumuşak Başlılık	39,77±4,51	26,00 – 50,00
Sorumluluk - Özdenetim	41,35±5,45	22,00 – 50,00
Duygusal Dengelilik	30,33±7,51	11,00 – 47,00
Zeka / Hayal Gücü	39,00±4,66	27,00 – 50,00
ASÖ	27,97±6,95	6,00 -48,00

Tablo 1'de Birinci basamak sağlık çalışanlarının B5KT-50 ve ASÖ puan ortalamalarına yer verilmiştir. Bu çalışmada sağlık çalışanlarının B5KT-50 Dışa Dönüklük alt boyutu puan ortalaması 32,93±7,13; Uyumluluk-Yumuşak Başlılık alt boyutu puan ortalaması 39,77±4,51; Sorumluluk-Özdenetim alt boyutu puan ortalaması 41,35±5,45; Duygusal Dengelilik alt boyut puan ortalaması 30,33±7,51 ve Zeka/Hayal Gücü alt boyut puan ortalaması 39,00±4,66 olarak belirlenmiştir. Ayrıca sağlık çalışanlarının ASÖ puan ortalaması 27,97±6,95 olarak bulunmuştur.

Tablo 2. Birinci Basamak Sağlık Çalışanlarının Temel Özelliklerine Göre ASÖ Puan Ortalaması Dağılımı

Değişkenler	Sayı	%	Ort±ss	Test değeri	
				p	
Yaş			34,84±8,46	r: -0,031 p: 0,626	
Meslek Yılı			11,62±8,66	r: -0,015 p: 0,809	
Cinsiyet	Kadın	190	74,2	28,48±6,70	t: 2,010
	Erkek	66	25,8	26,50±7,47	p: 0,046
Eğitim Durumu	Lise	21	8,2	25,95±6,42	F: 3,279
	Lisans	206	80,5	28,51±6,90*	p: 0,039
	Lisansüstü	29	11,3	25,58±7,07	
Meslek	Doktor	34	13,3	27,61±7,13	F: 0,404

	Hemşire/Ebe	149	58,2	28,30±6,64	p: 0,668
	Diğer	73	28,5	27,97±6,95	
Medeni Durum	Evli	157	61,3	27,85±7,49	t: -0,362
	Bekar	99	38,7	28,16±6,03	p: 0,718
Çocuk Varlığı	Var	147	57,4	27,72±7,64	t: -0,679
	Yok	109	42,6	28,30±5,90	p: 0,498
Birlikte Yaşadığı Birey	Tek	50	19,5	27,38±6,67	t: -0,671
	Aile ile	206	80,5	28,11±7,02	p: 0,503
Kronik Hastalık Varlığı	Var	48	18,8	27,79±8,10	t: -0,200
	Yok	208	81,3	28,01±6,67	p: 0,842
Covid-19'lu Hastayla Temas	Evet	220	85,9	28,35±7,07	t: 2,162
	Hayır	36	14,1	25,66±5,70	P: 0,032
Covid-19 Geçirme Durumu	Evet	89	34,8	27,96±7,01	t: -0,011
	Hayır	167	65,2	27,97±6,93	p: 0,991
Ailede Covid-19 Geçiren Varlığı	Evet	118	46,1	27,73±7,16	t: -0,500
	Hayır	138	53,9	28,17±6,78	p: 0,617

t: Bağımsız gruplarda t testi; F: Anova; r: Pearson korelasyon

Tablo 2'de çalışmaya katılan birinci basamak sağlık çalışanlarının temel özelliklerine göre ASÖ puan ortalaması dağılımına yer verilmiştir. Sağlık çalışanlarının yaş ortalaması 34,84±8,46 olup %74,2'si kadındır. Birinci basamak sağlık çalışanlarının %80,5'i lisans mezunu, %58,2'si hemşire ve çalışma yılı ortalaması 11,62±8,66'yıldır. Sağlık çalışanlarının %61,3'ünün evli ve %57,4'ünün çocuk sahibi olduğu belirlenmiştir. Pandemi sürecinde sağlık çalışanlarının %85,9'u Covid-19'lu hasta ile temas etmiş olup %65,2'si Covid-19 geçirmemiş ve %53,9'unun ailesinde de Covid-19 geçiren olmamıştır.

Birinci basamak sağlık çalışanlarının temel özelliklerine göre ASÖ puan ortalamasının dağılımı incelendiğinde; meslek, medeni durum, çocuk sahibi olma durumu, birlikte yaşadığı birey/bireyler kronik hastalık varlığı, Covid-19 geçirme durumu ve aile üyelerinden herhangi birinin Covid-19 geçirme durumuna göre ASÖ puan ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). ASÖ puan ortalaması ile yaş ve çalışma yılı arasındaki korelasyon incelendiğinde ise sağlık çalışanlarının ASÖ puan ortalaması ile yaş ve çalışma yılı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). Çalışmaya katılan birinci basamak sağlık çalışanlarının cinsiyeti ile ASÖ puan ortalaması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$); bu fark kadın sağlık çalışanlarından kaynaklanmaktadır. Sağlık çalışanlarının eğitim durumu ile ASÖ puan ortalaması arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) ve farkın lisans mezunu sağlık çalışanlarından kaynaklandığı görülmüştür. Birinci basamak sağlık çalışanlarının Covid-19 pozitif hastayla teması ile ASÖ puan ortalaması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 3. Birinci basamak sağlık çalışanlarının B5KT-50 alt boyut puan ortalamaları ile ASÖ toplam puan ortalaması arasındaki ilişki

Değişkenler	1	2	3	4	5	6
Dışa Dönüklük	1					
Uyumluluk – Yumuşak Başlılık	0,317**	1				
Sorumluluk - Özdenetim	0,099	0,376**	1			
Duygusal Dengelilik	0,396**	0,063	0,089	1		
Zeka / Hayal Gücü	0,507**	0,376**	0,264**	0,224**	1	
ASÖ	0,004	-0,174**	-0,116	-0,438**	0,021	1

r: Pearson korelasyon, *p<0,001

Birinci basamak sağlık çalışanlarının B5KT-50 alt boyut puan ortalamaları ile ASÖ puan ortalamaları karşılaştırıldığında; ASÖ puan ortalaması ile B5KT-50 Uyumluluk-Yumuşak Başlılık alt boyut puan ortalaması ile negatif yönde zayıf düzeyde ve Duygusal Dengelilik alt boyut puan ortalaması ile negatif yönde orta düzeyde bir ilişki olduğu belirlenmiştir. ASÖ toplam puan ortalaması arttıkça B5KT-50 Uyumluluk-Yumuşak Başlılık ve Duygusal Dengelilik alt boyut puan ortalamaları azalmaktadır (p<0,001). B5KT-50 Dışa dönüklük alt boyut puan ortalaması ile Uyumluluk-Yumuşak Başlılık, Duygusal Dengelilik ve Zeka/Hayal Gücü arasında pozitif yönde zayıf düzeyde düzeyde bir ilişki olduğu belirlenmiştir (p<0,001) (Tablo 3).

4. Tartışma ve Sonuç

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de sağlık çalışanları, Covid-19 salgını ile mücadelede artan iş yükü ve enfekte olma riski ile birlikte hastalarına sağlık hizmeti vermeye devam etmişlerdir. Enfeksiyöz salgınların ön saflarında görev almak ve sağlık hizmeti sağlamak sağlık çalışanlarında kısa ve uzun vadede ruhsal problemleri geliştirme riskini artırmaktadır [30]. Yapılan çalışmalarda salgın döneminde veya sonrasında her altı sağlık çalışanından birinde çok ciddi stres belirtileri görüldüğü belirtilmektedir [31]. Bu çalışmada Covid-19 pandemi sürecinde birinci basamak sağlık çalışanlarının kişilik özellikleri ile stres düzeyleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

Bu çalışma sonuçlarına göre çalışma kapsamına alınan birinci basamak sağlık çalışanlarının Dışa Dönüklük ve Duygusal Dengelilik düzeyleri orta, Uyumluluk-Yumuşak Başlılık, Sorumluluk-Öz Denetim ve Zeka/Hayal Gücü düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Literatürde sağlık çalışanlarının kişilik özelliklerinin değerlendirildiği sınırlı çalışma bulunmaktadır. Özdemir (2019)’in çalışmasında 112 çalışanlarının kişilik özelliklerinden yeniliklere açık olma puanları en yüksek iken, duygusal denge puanları en düşük olarak belirlenmiştir [32]. Toplumla iç içe çalışan birinci basamak sağlık çalışanlarının diğer bireylerle kolay iletişim kurabilen, uyumlu, empati yapabilen, sorumluluk sahibi ve karşılaştığı sorunları kolayca çözebilen bireyler olmasının sağlık hizmetinin sunulmasında olumlu katkıları olacaktır.

Bu çalışmada birinci basamak sağlık çalışanlarının orta düzeyde strese sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 1). Literatüre bakıldığında Covid-19 pandemisi sırasında yapılan çalışmalarda sağlık çalışanlarının stres düzeylerinin yüksek [22,32,34] ve orta düzeyde olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur [35]. Stres düzeyi yüksek olarak bulunan çalışmaların pandemi başında, ikinci ve üçüncü basamakta sağlık çalışanları ile yapılmış olması bu farklılığın nedeni olabilir. İkinci ve üçüncü basamakta sağlık çalışanları daha fazla hasta ile temas etmektedir. Bu durum sağlık çalışanlarının stresini daha çok artırabilmektedir.

Birinci basamak sağlık çalışanlarının temel özellikleri (meslek, medeni durum, çocuk sahibi olma durumu, birlikte yaşadığı birey/bireyler, kronik hastalık varlığı, Covid-19 geçirme durumu ve aile üyelerinden herhangi birinin Covid-19 geçirme durumu) ile stres düzeyleri arasında ilişki bulunamamıştır (Tablo 2). Literatüre bakıldığında bazı çalışmalarda mesleğin stres üzerinde etkisi olmadığı görülürken [32,34]; bazı çalışmalarda ise hemşirelerin daha yüksek stres düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir [26,36,38]. Bu farklılığının çalışma pozisyonundan kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca literatürde bu

çalışma ile benzer şekilde medeni durumun stres üzerine etkisi olmadığı görülmüştür [26,32]. Fakat bazı çalışmalarda medeni durumu bekar olan sağlık çalışanlarının stres düzeyinin daha yüksek olduğu da görülmektedir [38]. Bu farkın bekar olan sağlık personelinin pandemi sürecinde yalnız olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamına alınan birinci basamak sağlık çalışanlarının yaş ve çalışma yılı ile stres düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 2). Literatüre bakıldığında genç ve mesleki tecrübesi az olan sağlık personelinin stres düzeylerinin daha yüksek olduğu çalışmalar mevcuttur [32,34,37,39]. Bazı çalışmalarda ise yaşı büyük olan sağlık çalışanlarının gençlere göre stres düzeyinin daha yüksek olduğu görülmektedir [40,41]. Bir çalışmada ise bu çalışmaya benzer şekilde yaşın strese etkisinin olmadığı bulunmuştur [26]. ASÖ ve yaş arasındaki ilişki literatürde farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu fark sağlık çalışanlarının çalıştığı birimlere göre tecrübenin öneminden kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada kadınların erkeklere göre daha yüksek stres düzeyine sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Yapılmış olan diğer araştırma sonuçlarında da kadınların stres düzeyi erkeklere göre daha yüksektir [23,32,34]. Kadın sağlık çalışanlarının bakım sorumlulukları ve ailelerini koruma endişesi nedeniyle daha fazla strese maruz kaldıkları düşünülmektedir. Sağlık çalışanlarının eğitim durumu ile ASÖ puan ortalaması arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş ve lisans mezunlarının en yüksek stres seviyesine sahip oldukları görülmüştür (Tablo 2). Yapılan çalışmalarda da lisans mezunu sağlık çalışanlarının stres düzeyi daha yüksektir [36,37]. Çalışma kapsamına alınan birinci basamak sağlık çalışanlarından Covid-19 pozitif hastayla teması olanların stres düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Literatürde Covid-19 pozitif hastayla temasının sağlık çalışanlarının stres düzeyini artırdığı belirlenmiştir [32,42]. Covid-19 pozitif hasta temasının bireyin kendisine ve ailesine virüsü bulaştırma riski taşıdığı için stres düzeyini artırdığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada birinci basamak sağlık çalışanlarının uyumlu-yumuşak başlı ve duygusal dengeyi sağlayabilmesi stres düzeylerini azalttığını göstermektedir. Aynı zamanda dışa dönük, sorumluluk-özdenetim ve zeka-hayal gücü özelliklerinin ise stres düzeyi ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo 3). Covid-19 döneminde sağlık çalışanları üzerinde yapılan bir çalışmada olumsuz duygulanım ve sosyal ketleme özelliklerine sahip olan bireylerin stres düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur [43]. Sağlık kurumları yöneticileri ile yapılan bir çalışma rekabetçi, başarıya ihtiyaç duyan, sinirli, hızlı çalışan, hareketli, sabırsız, zaman baskısı hisseden, hızlı sinirlenen bireylerin daha çok stres yaşadıklarını gösterirken [44]; çalışan kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise bu özelliklere sahip olan kadınların daha az stres yaşadıklarını göstermiştir [45].

Yumuşak başlılık/uyumluluk alt boyutu, dürüstlük, cömertlik, hoşgörülülük, kibarlık, fedakarlık, uyumluluk, merhametlilik, alçak gönüllülük ile yani bir anlamda ahlaki değerleri yansıtan bir faktör olarak tanımlanmıştır. Uyumlu olanların sakin ve heyecandan uzak durma eğiliminde olduklarını bildirilmiştir. Duygusal dengesizlik alt boyutu, depresif, endişeli, kaygılı, öfkeli, kırılgan, dürtüsel, kendine güvensiz ve sinirli gibi özellikler içermektedir ve nörotik bir yapıya işaret etmektedir [11]. Stres düzeyi artan sağlık çalışanlarının uyumlu olma ve duygusal dengelilik özelliklerinin azaldığı söylenebilir. ASÖ puan ortalaması ile B5KT-50 Dışa Dönüklük, Sorumluluk-Özdenetim, Zeka/Hayal Gücü alt puan ortalamaları arasında ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). Sağlık personelinin stres düzeyinin de bu belirtilen özellikler üzerinde etkisinin olmadığı söylenebilir. Sorumluluk/ Öz-Denetim alt boyutunun sorumlu, düzenli, azimli, kurallara bağlı, başarı kazanma güdüsü olan, öz disiplinli, sabırlı, vicdanlı, planlı ve programlı, dikkatli, temiz, tutumlu, tedbirli ve çalışkan olma gibi özelliklerinin olduğu söylenmiştir. Zeka/Hayal gücü faktörü bağımsız, analitik, meraklı, yaratıcı, geleneksel olmayan, değişikliği seven, doğal, sanatsal düşünen, hayal gücü kuvvetli, açık fikirli, kendine özgü, ilgileri geniş, cesur, hareketli, kültürlü, estetik bakış açısına sahip ve zeki olarak tanımlanmıştır [11]. Sağlık personelinin mesleki sorumlulukları gereği stres düzeylerine göre bu özelliklerinin etkilenmediği söylenebilir.

Bu çalışmada; birinci basamak sağlık çalışanlarının orta düzeyde strese sahip oldukları ve Uyumluluk-Yumuşak Başlılık ve Duygusal Dengelilik özellikleri yüksek olan sağlık personelinin stres düzeylerinin düşük olduğu bulunmuştur. Kadın, üniversite mezunu ve Covid-19'lu hastayla temas eden sağlık çalışanlarının stres düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda birinci basamak sağlık çalışanlarının Covid-19 pandemisi karşısında strese maruz kaldıkları ortadadır. Sağlık çalışanlarının desteklenmesinin, motive edici aktivitelerin ve stresle baş etme eğitimlerinin pandemi vb süreçlerde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Etik Beyanı

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

Çalışmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik onay (Karar no:2021/54) alınmıştır.

Kaynakça

- [1] Weiten, W. 2007. Psychology; Themes and Variations. Thompson Wadsworth, Fifth Edition.
- [2] Sarıcı Bulut S. 2017. Beş Faktör Kişilik Özellikleri, Stresle Başa Çıkma ve Depresyon Arasındaki ilişkiler: Gazi Eğitim Fakültesi Örneği. Uluslararası Türkçe Edebiyat Kültür Eğitim Dergisi, 6(2), 1205- 1221.
- [3] Baltaş Z, Baltaş A. 2012. Stres ve Başaçıkma Yolları, İstanbul:Remzi Kitabevi.
- [4] Kocalevent RD, Levenstein S, Fliege H, Schmid G, Hinz A, Brähler E, Klapp B. 2007. Contribution to the construct validity of the Perceived Stress Questionnaire from a population-based survey. Journal of Psychosomatic Research, 63(1), 71-81.
- [5] Hall NC, Chipperfield JG, Perry RP, Ruthig JC, Goetz T. 2006. Primary and secondary control in academic development: gender-specific implications for stress and health in college students. Anxiety, Stress, and Coping, 19(2), 189-210.
- [6] Gallo LC, Matthews KA. 2003. Understanding the association between socioeconomic status and physical health: do negative emotions play a role?. Psychological Bulletin 129(1), 10-51.
- [7] Michael G, Anastasios S, Hele, K, Catherine K, Christine K. 2009. Gender differences in experiencing occupational stress: the role of age, education and marital status. Stress and Health: Journal of the International Society for the Investigation of Stress, 25(5), 397-404.
- [8] Finkelstein DM, Kubzansky LD, Capitman J, Goodman E. 2007. Socioeconomic differences in adolescent stress: the role of psychological resources. Journal of Adolescent Health, 40(2), 127-134.
- [9] Goodman E, McEwen BS, Dolan LM, Schafer-Kalkhoff T, Adler NE. 2005. Social disadvantage and adolescent stress. Journal of Adolescent Health, 37(6), 484-492.
- [10] Burger J. 2006. Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970–2005. Environmental Bioindicators, 1(2), 136-144.
- [11] McCRAE RR, Costa PT. 1999. Handbook of Personality, Second Edition, (Edited by Lawrence Pervin, Oliver P. John), USA: The Guilford Publications
- [12] Amole BB, Adebisi SO, Dakare O. 2018. Multi-criteria decision analysis of occupational stress among healthcare professionals in Nigeria. Progress in Health Sciences, 8(1), 113-125.
- [13] Fiabane E, Giorgi I, Musian D, Sguazzin C, Argentero P. 2012. Occupational stress and job satisfaction of healthcare staff in rehabilitation units. La Medicina del Lavro, 103(6), 482-492.
- [14] Yang S, Meredith P, Khan A. 2015. Stress and burnout among healthcare professionals working in a mental health setting in Singapore. Asian Journal of Psychiatry, 15, 15-20.
- [15] Yehya A, Sankaranarayanan A, Alkhal A, Alnoimi H, Almeer N, Khan A, Ghuloum S. 2020. Job satisfaction and stress among healthcare workers in public hospitals in Qatar. Archives of Environmental and Occupational Health, 75(1), 10-17.
- [16] Gibb J, Cameron IM, Hamilton R, Murphy E, Naji S. 2010. Mental health nurses' and allied health professionals' perceptions of the role of the Occupational Health Service in the management of work at related stress: how do they self-care?. Journal of Psychiatric and Mental Health Nursing, 17(9), 838-845.
- [17] Lua PL., Imilia I. 2011. Work-related stress among healthcare providers of various sectors in peninsular Malaysia. Malaysian Journal of Psychiatry, 20(2), 1-15

- [18] Baker L. 2014. Stress management: health workers. In W. C. Cockerham, R. Dingwall, & S. R. Quah (Eds.), *The wiley blackwell encyclopedia of health, illness, behavior, and society* (pp. 2304-2307). Chichester: Wiley-Blackwell.
- [19] Kang L, Li Y, Hu S, Chen M. 2020. The mental health of medical workers in Wuhan, China dealing with the 2019 novel coronavirus. *Lancet Psychiatry*, 7(3), 14.
- [20] İşsever H, İşsever T, Öztan G. 2020. COVID-19 epidemiyolojisi. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 3(S1), 1-13.
- [21] Krist AH, DeVoe JE, Cheng A, Ehrlich T, Jones SM. 2020. Redesigning primary care to address the COVID-19 pandemic in the midst of the pandemic. *Annals Fam Med*, 18(4):349- 354.
- [22] Orhan S, Gümüş M. 2021. Covid-19 Pandemi Sürecinde Sağlık Çalışanlarının Bilgi, Uygulama ve Stres Düzeylerinin İncelenmesi. *International Anatolia Academic Online Journal Social Sciences Journal*, 7(2), 70-77.
- [23] Polat Ö, Coşkun F. 2020. COVID-19 Salgınında Sağlık Çalışanlarının Kişisel Koruyucu Ekipman Kullanımları ile Depresyon, Anksiyete, Stres Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi, *Batı Karadeniz Tıp Dergisi*, 4(2):51-58.
- [24] Aktaş AM. 2001. Bir kamu kuruluşunun üst düzey yöneticilerinin iş stresi ve kişilik özellikleri. *Ankara Üniversitesi SBF Dergisi*, 56(04).
- [25] Daniel WW, Cross CL. 2018. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. Wiley
- [26] Çamkerten S, Tatar A, Saltukoğlu G. 2020. Sağlık Çalışanlarının Stres Düzeylerinin İncelenmesi. *Sağlık Akademisyenleri Dergisi*. 7(4). 257-265.
- [27] Tatar A. 2017. Büyük Beş-50 Kişilik Testinin Türkçeye çevirisi ve Beş Faktör Kişilik Envanteri Kısa Formu ile karşılaştırılması. *Anadolu Psikiyatri Derg.* 18(1):51-61.
- [28] Eskin M, Harlak H, Demirkıran F, Dereboy Ç. 2013. Algılanan Stres Ölçeğinin Türkçeye Uyarlanması: Güvenirlik ve Geçerlik Analizi, *New/Yeni Symposium Journal*. 51, 134.
- [29] IBM Corp. Released 2016. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- [30] Tuncay FE, Koyuncu E, Özel ŞA. 2020. Review Of Protective And Risk Factors Affecting Psychosocial Health Of Healthcare Workers In Pandemics. *Ankara Med J*, 2:488-501.
- [31] Bozkurt A, Karakoç B, Sönmez E. 2020. Sağlık Çalışanlarının Ruh Sağlığının Korunması İçin Sağlık Kurumu Yöneticilerine Öneriler, *Kaknüs Yayınları*.
- [32] Badahdah A, Khamis F, Al Mahiyari N, et al. (2020), The mental health of health care workers in Oman during the COVID-19 pandemic. *Int J Soc Psychiatry*.
- [33] Özdemir, A. 2019. Şiddete maruz kalma durumunun beş faktör kişilik özelliği ve duygusal zekâ boyutu ile 112 çalışanları üzerinde değerlendirilmesi (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- [34] Rossi R, Soggi V, Pacitti F, et al. (2020) Mental Health Outcomes Among Frontline and Second-Line Health Care Workers During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in Italy. *JAMA Netw open* 2020;3.
- [35] Çelik A, Mertoğlu S. 2022. COVID-19 Pandemisi Nedeniyle Sağlık Çalışanlarının Algıladıkları Stres Durumunun Belirlenmesi: İzmir Örneği. *Forbes Journal of Medicine*, 3(1).
- [36] Atasoy A, Yorgun S. 2013. Sağlık çalışanlarında iş gerilimi ve iş stres düzeyinin değerlendirilmesi. *Sağlıkta Performans ve Kalite Dergisi*, 6(2), 71-88.
- [37] Eriş H, Havlioğlu S. 2019. Suriyeli Sığınmacı Kamplarının Bulunduğu İlçelerde Çalışan Sağlık Personelinin İş Stresi Seviyesi: Şanlıurfa Örneği. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(3):435-442.
- [38] Afşar F, Erdoğan H, İbrahimoglu Ö, Şaylan B, Köksal Ö. 2021, COVID-19 Sürecinde Sağlık Çalışanlarının İş Stresi Ve Örgütsel Destek Algıları, *Gevher Nesibe Dergisi*, 6/14, 89-96.
- [39] Şahin LA. 2017. Sağlık çalışanın iş sağlığı güvenliği ve iş stresi (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- [40] Erşan, E. E., Yıldırım, G., Doğan, O., & Doğan, S. (2013). Sağlık çalışanlarının iş doyum ve algılanan iş stresi ile aralarındaki ilişkinin incelenmesi. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 14(2), 115-121.

- [41] Jones MC, Wells M, Gao C, Cassidy B, Davie J. 2013. Work stress and well-being in oncology settings: a multidisciplinary study of health care professionals. *Psycho-Oncology*, 22(1), 46-53
- [42] Çelik A, Mertoğlu S. 2022. COVID-19 Pandemisi Nedeniyle Sağlık Çalışanlarının Algıladıkları Stres Durumunun Belirlenmesi: İzmir Örneği, *Forbes J Med* 2022;3(1):51-58.
- [43] Tuman TC. 2022. The effect of type D personality on anxiety, depression and fear of COVID-19 disease in healthcare workers. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 77(3), 177-184.
- [44] Torun N, Tekin PŞ. 2014. Ankara ilinde çalışan sağlık kurumları yöneticilerinin iş stresi ve kişilik özellikleri açısından değerlendirilmesi. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 13(1), 45-56
- [45] Öztürk M, Şahverdioğlu H. 2019. Çalışan Kadınların Kişilik Özellikleri ile İş Stresi Ve İşten Ayrılma Niyeti Arasındaki İlişki: Isparta İlinde Bulunan Özel Hastaneler Üzerine Bir Uygulama. *Süleyman Demirel Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 24(3), 679-702.

Dismenore Durumuna Göre Genç Kadınların Menstrüel Profilleri ve Anksiyete Düzeyleri

Menstrual Profiles and Anxiety Levels of Young Women by Dysmenorrhea Status

Zümrüt BİLGİN^{1*} 

¹ Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, İstanbul, Türkiye



Ö Z

Amaç: Bu çalışma, dismenore durumlarına göre menstrüel profillerini ve anksiyete düzeylerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal-Metot: Tanımlayıcı ve karşılaştırmalı tipteki araştırma 04 Nisan - 31 Mayıs 2022 tarihleri arasında bir üniversitenin sağlık bilimleri fakültesinde yapılmıştır. Çalışmaya 18-45 yaş arasında 247 dismenoresi olan, 91 dismenoresi olmayan toplam 338 kadın öğrenci katılmıştır. Veriler "Tanıtıcı Bilgi Formu" ve "Sürekli Kaygı Envanteri" kullanılarak toplanmıştır.

Bulgular: Araştırmaya katılan kadın öğrencilerin yaş ortalaması 21,11±2,76'yıdır. Öğrencilerin %69,5'inin vücut kitle indeksi 18,5-24,9 aralığında olduğu, %70,1'inin kaygılı biri kişiliğe sahip olduğu, %73,1'inin dismenoresi olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kadın öğrencilerin dismenore durumuna göre adet ağrısı yaşama sıklığı, adet ağrısının başlama zamanı, adet dönemindeki ağrının şiddeti, ailede dismenore öyküsü arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Dismenoresi olan ve olmayan grupların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Bu çalışmanın sonucunda dismenoresi olan ve olmayan grupların menstrüasyon profilleri farklılık gösterirken, sürekli kaygı envanteri puan ortalaması açısından gruplar benzerlik göstermiştir. Kadınlara, menstrüel döneme özgü semptomlara yönelik danışmanlık desteği verilmesi önerilir.

Anahtar Kelimeler: Menstruasyon, Dismenore, Menstruel Profil, Ağrı, Anksiyete

Alınış / Received: 12.08.2022 Kabul / Accepted: 05.06.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Objective: This study was conducted to determine the menstrual profiles and anxiety levels of young women according to their dysmenorrhea status.

Material-Method: The descriptive and comparative study was carried out between 04 April - 31 May 2022 in a university's faculty of health sciences. A total of 338 female students between the ages of 18-45, 247 with dysmenorrhea and 91 without dysmenorrhea, participated in the study. Data were collected online on the Web using the "Descriptive Information Form" and "Trait Anxiety Inventory".

Results: The mean age of the female students participating in the study was 21.11±2.76 years. It was determined that 69.5% of the students had a body mass index in the range of 18.5-24.9, 70.1% had an anxious personality, and 73.1% had dysmenorrhea. In the study, a significant difference was found between the frequency of experiencing menstrual pain, the onset of menstrual pain, the severity of menstrual pain, and the family history of dysmenorrhea according to the dysmenorrhea status of female students ($p<0.05$). There was no difference between the trait anxiety inventory mean scores of the groups with and without dysmenorrhea ($p>0.05$).

Conclusion: As a result of this study, while the menstrual profiles of the groups with and without dysmenorrhea differed, the groups showed similarity in terms of trait anxiety inventory mean score. Counseling support for menstrual-specific symptoms is recommended for women.

Keywords: Menstruation, Dysmenorrhea, Menstrual Profile, Pain, Anxiety



1. Giriş

Üreme çağındaki kadınların menstrüel profilleri değişmektedir. Kadınların menstrüel profillerini etkileyen faktörlerden biri dismenore'dir. Dismenore primer ve sekonder dismenore olarak sınıflandırılır. Primer dismenore, tanımlanabilir bir organik patoloji olmaksızın menstrüasyon öncesinde ve/veya sırasında alt karın bölgesinde ağrı veya krampları ifade eder. Buna karşılık, sekonder dismenore, endometriozis gibi anatomik ve/veya belirgin pelvik patolojiden kaynaklanan menstrüel ağrıya işaret eder [1-3]. Kadınların menstrüel profilleri ve dismenoreden kaynaklanan ağrı kadınların duygu durumlarını ve günlük yaşam aktivitelerini etkiler.

Primer dismenoreye bağlı menstrüel ağrı üreme çağındaki kadınların en sık yaşadığı sorunlardan biridir. Menstrüel ağrı, adet ilk veya ikinci gününde ağrılı kramplarla karakterizedir. Menstrüel ağrıya başka semptomlarda eşlik eder, bu semptomlar sıklıkla baş dönmesi, kusma, yorgunluk ve uykusuzluk olarak sıralanabilir. Dünyada menstrüasyon gören adolesan kızların yaklaşık %90'ının, menstrüasyon gören kadınların ise %50'sinden fazlasının dismenoreden yakındığı belirtilmektedir [4,5,6]. Ülkemizdeki durum incelendiğinde dismenore prevalansının %28 ile %87,7 arasında değiştiği ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda üniversite öğrencilerinin yaklaşık %67,4 - %89,5'inin dismenore sorunu yaşadığı belirtilmektedir [7-9].

Kadınların dismenore durumu ve menstrüel profili pek çok faktörle ilişkilidir. Birçok çalışmada, dismenorenin genç yaşla, doğum yapmama, ailede dismenore öyküsü, uzun menstrüel süre, fazla

adet kanaması, psikoloji ve sigara içme alışkanlıkları gibi faktörlerle ilişkili olduğu ifade edilmektedir [10,11]. Dismenore ve menstrüel profile bağlı gelişen semptomlar kadınların günlük yaşamını ve günlük aktivitelerini etkileyerek kesintiye uğratabilmektedir. Yapılan bir araştırmada dismenore yaşayan kadınların %15'inin günlük aktivitelerinin kısıtlandığı, okul süreci ve başarısının etkilendiği bildirilmektedir [8]. Başka çalışmalarda ise dismenore nedeni ile kızların %10-%52'sinin okula devam etmediği ve günlük aktivitelerinin negatif yönde etkilendiği belirtilmektedir [12,13]. İran'da yapılan bir çalışmada öğrencilerin %15'inin yılda 1-7 gün aralığında dismenore nedeniyle okula devam etmedikleri bildirilmektedir [14]. Bu nedenlerle dismenore ve menstrüel profile bağlı gelişen semptomların hafifletilmesi için medikal tedaviler (nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, hormonal kontraseptifler vb.), medikal olmayan tedaviler (ısı uygulaması, egzersiz vb.) önerilmektedir [15].

Dismenore ve menstrüel profile bağlı gelişen semptomların yaygınlığına, şiddetine ve süresine bağlı olarak kadınlar duygu durum değişiklikleri, anksiyete, depresyon, iştahsızlık ve bulantı gibi sorunlar yaşayabilmektedir [13,15]. Özellikle ağrıya bağlı anksiyete ve depresyon kadın öğrencilerin sağlığını ve akademik başarılarını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenlerle dismenore durumu ile menstrüel profil ve anksiyete arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, menstrüel semptomların hafifletilmesi için kullanılacak yöntemlerin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Menstrüasyon dönemindeki ağrı ve menstrüel semptomlara bağlı kaygısının azaltılmasına yönelik sağlık profesyonellerinin önerileri kadınların duygusal anlamada kendilerini iyi hissetmelerine katkı sağlayacaktır. Ancak şimdiye kadar ülkemizde kadın üniversite öğrencileri arasında menstrüel profil ve anksiyete ilişkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır.

Araştırmanın Amacı ve Araştırma Soruları

Bu çalışmada dismenore durumuna göre genç kadınların menstrüel profilleri ve anksiyete düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma soruları:

Genç kadınların dismenore durumu ile menstrüel profilleri arasında fark var mıdır?
Genç kadınların dismenore durumu ile sürekli kaygı puanları arasında fark var mıdır?

2. Materyal ve Metot

Tanımlayıcı ve karşılaştırmalı tipte olan araştırma bir üniversitenin sağlık bilimleri fakültesinde 04 Nisan -31 Mayıs 2022 tarihleri arasında yürütülmüştür.

Evren Örneklem

Araştırmanın evrenini, bir üniversitenin sağlık bilimleri fakültesinde öğrenim gören kadın öğrenciler, örneklemini ise dismenore yakınması olan ve dismenore yakınması olmayan araştırmayı katılmayı kabul eden 338 kadın öğrenci oluşturmuştur.

Araştırmaya Alınma Kriterleri: Çalışmanın yapıldığı üniversitenin ebeklik ve bölümünde öğrenim gören, 18-45 yaş aralığında olan, menopoza girmemiş, primer dismenore tanısı alan, internet erişimi olan çalışmaya katılmaya gönüllü olan kadın öğrencilerdir.

Araştırmaya Alınmama Kriterleri: Sekonder dismenoresi olan, psikiyatrik hastalık tanısı ve hormon tedavisi alanlar çalışmaya alınmamıştır. Araştırma, 338 kadın öğrencinin gönüllü katılımı ile tamamlanmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce G*Power 3.1.9.2 ile örneklem büyüklüğü hesaplanmıştır. Analizde etki büyüklüğü (effect size: 0,5), I. Tip hata miktarı alfa ($\alpha=0,05$), testin gücü 1-beta (power: 0,95), alternatif hipotez (H1) iki yönlü olarak belirlendiğinde, örneklem büyüklüğü toplam 210 kişi olarak hesaplanmıştır. Veri kaybı (%10) gözünüdü bulundurulurken daha fazla kişiye ulaşılması hedeflenmiş 338 kadın öğrencinin katılımı ile çalışma tamamlanmıştır.

Verilerin Toplanması

Araştırmanın verileri "Tanıtıcı Bilgi Formu" ve "Sürekli Kaygı Envanteri-SKE" kullanılarak toplanmıştır. Literatür doğrultusunda hazırlanan tanıtıcı bilgi formu ve ölçek araştırmacı tarafından hazırlanarak,

web ortamına yüklenmiştir. Daha sonra Whatsapp web üzerinden ebelik ve hemşirelik bölümleri sınıf temsilcileri ile iletişime geçilip, çalışmanın linki öğrencilerle paylaşılmıştır. Çevrimiçi web ortamından, bu bölümlerde öğrenim gören tüm kadın öğrenciler çalışmaya katılmaya davet edilmiştir. Çalışmaya katılmayı onaylayan ve formları öz bildirimle dayalı olarak yanıtlayan öğrencilerin verileri çevrimiçi olarak Google formda ortamında toplanmıştır. Katılımcıların cevapları, veri değerlendirme programına aktarılmıştır. Araştırma için Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul oluru (26/12/2019/180 tarih ve sayılı), kurumdan sözlü ve yazılı izin ve araştırmaya katılanlardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Tanıtıcı Bilgi Formu: Kadın öğrencilerin sosyodemografik (yaş, boy, kilo, sigara kullanma vb.) ve menstrüasyon özellikleri (dismenoresinin olup olmadığı, ağrı durumu, ağrı şiddeti vb.) kaygıya ve depresyona ilişkin soruları içeren ilgili literatür doğrultusunda araştırmacı tarafından literatür doğrultusunda geliştirilen 25 soru içeren tanıtıcı bilgi formudur [9,13].

Durumluk-Süreklilik Kaygı Envanteri: Spielberger ve arkadaşları tarafından 1970'te geliştirilmiş olup, 14 yaş üzerindeki bireylerde kaygıyı düzeyini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Ölçeğin Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması Öner ve Le Compte [16] tarafından yapılmıştır. "*Durumluk-Süreklilik Kaygı Envanteri, yirmişer madde olmak üzere Durumluk Kaygı Envanteri ve Süreklilik Kaygı Envanteri*" şeklinde toplam kırk maddeden oluşmaktadır. "*Durumluk Kaygı Envanteri, bireyin belirli bir zamanda ve koşullarda kendini nasıl hissettiğini tanımlamasını, Süreklilik Kaygı Envanteri ise bireyin içinde bulunduğu durum ve koşullardan bağımsız olarak kendini nasıl hissettiğini*" belirtir. Bireylerin kendileri tarafından doldurulabilecekleri bir testtir. Bu çalışmada *Süreklilik Kaygı Envanteri kullanılmıştır. Süreklilik Kaygı Ölçeği* maddeleri "*duygu ya da davranışlar ise sıklık derecesine göre (1)hemen hiçbir zaman, (2)bazen, (3)çok zaman ve (4)hemen her zaman*" olarak işaretlenir. Envanterde yanıtlanması gereken seçenek sayısı dörder adettir ve her seçeneğin ağırlık değeri 1 ile 4 arasındadır. Envanterlerin her biri 20'şer maddeden oluştuğundan dolayı her envanterden alınabilecek toplam puan 20-80 aralığındadır. *Süreklilik Kaygı Envanterindeki maddeler "(1)doğrudan ya da düz ve (2)tersine dönmüş maddeler"* başlığında incelenir. Doğrudan maddelerde "*(4) değerindeki yanıtlar kaygının yüksek olduğunu*" açıklar. Tersine dönmüş başlığında ise, "*(1)değerindeki yanıtlar yüksek kaygıyı, (4) değerindekiler düşük kaygıyı*" ifade eder. *Süreklilik Kaygı Envanterinde tersine dönmüş maddeler yedi tanedir (21, 26, 27, 30, 33, 36, 39. maddeler). Puanlar "20 ile 80 arasında değişmektedir, 36 ve daha düşük puan kaygının olmadığını, 37-42 hafif kaygıyı, 43 ve üstü puan ise yüksek kaygıyı"* gösterir. Süreklilik kaygı puanlarının yüksek olması, yüksek anksiyete düzeyi olduğunu göstermekte olup, 60 puanın üstünde olan bireylerin profesyonel yardım ihtiyacı olduğu ifade edilmektedir. Bu araştırmada kullanılan bu ölçek ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalarda kullanılmıştır [17].

Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 21.0 demo programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bulgular, sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma şeklinde sunulmuştur. Kategorik verilerin analizinde ki kare testi, süreklilik ve normal dağılım gösteren verilerin analizinde student t-test ve Oneway ANOVA testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ dikkate alınmıştır.

3. Bulgular

Araştırmaya katılanların %96,2'i 18-24 yaş aralığında, %69,5'inin vücut kitle indeksi (VKİ) 18,5-24,9 aralığında, %87'i çekirdek ailede yaşamakta, %63,9'inin ailesinin geliri giderden az, %10,9'u sigara kullanmakta, %70,1 kaygılı bir kişiliğe sahip olduğunu düşünmektedir (**Tablo 1**).

Tablo 1. Katılımcıların Dismenore Durumuna Göre Tanımlayıcı Özellikleri

Tanıtıcı Özellikler	Dismenore				Toplam		X^2 ve p değeri
	Var (n:247)		Yok (n:91)		n	%	
	n	%	n	%			
Yaş (Yıl) (21,11±2,76)							
18-24	239	70,7	86	25,4	325	96,2	0,347
≥ 25	8	2,4	5	1,5	13	3,8	0,254
VKİ (22,13 ±3,64)							
<18,5	37	10,9	5	1,5	42	12,4	5,581
18,5-24,9	166	49,1	69	20,4	235	69,5	0,134
25-29,9	37	10,9	14	4,1	51	15,1	
≥30	7	2,1	3	0,9	10	3,0	
Aile tipi							
Çekirdek aile	220	89,1	74	81,3	294	87,0	2,876
Geniş aile	27	10,9	17	18,7	44	13,0	0,090
Ailesinin gelir durumu							
Gelir gıderden az	161	65,2	55	60,4	216	63,9	4,486
Gelir gıdere eşit	65	26,3	21	23,1	86	25,4	0,106
Gelir gıderden fazla	21	8,5	15	16,5	36	10,7	
Sigara kullanma							
Evet	27	10,9	6	6,6	33	9,8	1,420
Hayır	220	89,1	85	93,4	305	90,2	0,233
Kaygılı bir kişiliğe sahip olduğunu düşünme							
Evet	176	71,3	61	67,0	237	70,1	0,566
Hayır	71	28,7	30	33,0	101	29,9	0,452

* X^2 : Ki-kare analizi, $p < 0,05$

Çalışmada katılımcıların dismenore durumu ile adet ağrısı yaşama sıklığı, adet ağrısının başlama zamanı, adet dönemindeki ağrının şiddeti, adet ağrısı için ilaç kullanma, adet ağrısı için ilaç dışı yöntem kullanma ve ailede dismenore öykü durumu arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 2).

Katılımcıların dismenore durumu ile menarş yaşı, adetlerin düzenli olma durumu, adet döngüsü aralığı, adet kanama süresi arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p<0,05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Katılımcıların Dismenore Durumuna Göre Menstrüasyon Profillerinin Karşılaştırılması

Değişkenler	Dismenore				Toplam		X^2 ve p değeri
	Var (n:247)		Yok (n:91)		n	%	
	n	%	n	%			
Menarş yaşı							
≤11	28	11,3	7	7,8	35	10,4	0,556
>12	219	88,7	83	92,2	302	89,6	0,456
Adetlerin düzenli olma durumu							
Evet	182	73,7	68	74,7	250	74,0	0,003
Hayır	65	26,3	23	25,3	88	26,0	0,957
Adet döngüsü aralığı (Gün)							
≤21 gün	10	4,0	5	5,5	15	4,4	0,513
22-35 gün	211	85,4	78	85,7	289	85,5	0,774
≥36 gün	26	10,5	8	8,8	34	10,1	
Adet kanama süresi (Gün)							
2-7 gün	214	86,6	83	91,2	297	87,9	0,909
≥7 gün	33	13,4	8	8,8	41	12,1	0,340
Adet ağrısı yaşama sıklığı							
^a Ağrı yok	0	0,0	13	14,3	13	3,8	111,605

^b Arasıra	87	35,2	73	80,2	160	47,3	0,000
^c Her adette	160	64,8	5	5,5	165	48,8	>c,b;> b,a
Adet ağrısının başlama zamanı							
Ağrı yok	2	0,8	16	17,6	18	5,3	39,227
Adet öncesinde	116	47,0	28	30,8	144	42,6	0,000
Adet sırasında	129	52,2	47	51,6	176	52,1	>b,a
Adet dönemindeki ağrının şiddeti							
Ağrı yok	1	0,4	18	19,8	19	5,6	120,437
Hafif	91	36,8	71	78,0	162	47,9	0,000
Çok şiddetli	155	62,8	2	2,2	157	46,4	>c,b;>b,a
Adet ağrısı için ilaç kullanma							
Evet	129	52,2	10	11,0	139	41,1	46,706
Hayır	118	47,8	81	89,0	199	58,9	0,000
Adet ağrısı için ilaç dışı yöntem kullanma							
Evet	174	70,4	38	41,8	212	62,7	23,406
Hayır	73	29,6	53	58,2	126	37,3	0,000
Ailede dismenore öyküsü (Anne, kız kardeş vb.)							
Evet	175	51,8	51	15,1	226	66,9	6,580
Hayır	72	21,3	40	11,8	112	33,1	0,010

*X² : Ki-kare analizi, p < 0,05

Çalışmada dismerosi olan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması ile adet ağrısının başlama zamanı, kaygılı bir kişiliğe sahip olduğunu düşünme ve adet döneminde kendini depresif hissetme durumu arasında fark bulunmuştur (p<0,05) (**Tablo 3**).

Çalışmada dismerosi olmayan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması ile adet ağrısı için ilaç dışı yöntem kullanma, kaygılı bir kişiliğe sahip olduğunu düşünme ve adet döneminde kendini depresif hissetme durumu arasında fark gözlenmiştir (p<0,05) (**Tablo 3**).

Ancak hem dismerosi olan ve hem de dismenoreesi olmayan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması ile adetlerin düzenli olma durumu, adet ağrısı için ilaç kullanma ve adet döneminde uyuma isteğinde artma durumu arasında fark bulunmamıştır (p>0,05) (**Tablo 3**).

Ayrıca dismenoreesi olan ve dismenoreesi olmayan grupların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması arasında fark gözlenmemiştir (p>0,05) (**Tablo 3**).

Çalışmada hem dismerosi olan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması 48,92±8,35 (min-mak: 31-73), dismerosi olmayan katılımcıların ise 48,19±7,25 (min-mak: 30-70) olarak saptanmıştır.

Tablo 3. Katılımcıların Sürekli Kaygı Envanteri Puanı İle Menstrüasyon Özelliklerinin Karşılaştırılması

Değişkenler	Dismenore					
	Var			Yok		
	(n:247)	Ort±SS	*t/F ve p değeri	(n:91)	Ort±SS	*t/F ve p değeri
Adetlerin düzenli olma durumu						
Evet	182	48,45±8,31	-1,473	68	47,76±7,06	-0,979
Hayır	65	50,23±8,39	0,142	23	49,47±7,81	0,330
Adet ağrısının başlama zamanı						
Ağrı yok	2	51,00±2,82	3,433	16	46,06±7,76	1,349
Adet öncesinde	116	50,35±8,64	0,034	28	47,57±6,36	0,265
Adet sırasında	129	47,60±7,95		47	49,29±7,51	
Adet ağrısı için ilaç kullanma						
Evet	129	48,61±8,11	-0,610	10	52,40±9,60	1,973
Hayır	118	49,26±8,63	0,542	81	47,67±6,80	0,052
Adet ağrısı için ilaç dışı yöntem kullanma						
Evet	174	48,32±8,56	-1,753	38	46,21±7,62	-2,263
Hayır	73	50,35±7,70	0,081	53	49,62±6,68	0,026

Kaygılı bir kişiliğe sahip olduğunu düşünme						
Evet	176	50,92±8,09	6,394	61	50,01±7,38	3,635
Hayır	71	43,95±6,82	0,000	30	44,50±5,40	0,000
Adet döneminde kendini depresif hissetme						
Evet	225	49,55±8,19	3,913	75	49,20±7,11	2,976
Hayır	22	42,45±7,28	0,000	16	43,50±6,08	0,004
Adet döneminde uyuma isteğinde artma						
Evet	210	49,24±8,48	1,457	68	48,73±6,86	1,219
Hayır	37	47,08±7,45	0,146	23	46,60±8,25	0,226
Dismenore durumuna göre grupların kaygı ortalamaları						
Var	247	48,92±8,35	Yok	91	48,19±7,25	0,782
						0,435

t: Independent Samples Test, F: One-Way Anova test, p < 0,05

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, genç kadınların dismenore durumlarına göre menstrüel profillerini ve kaygı düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmanın bulguları ilgili literatür eşliğinde tartışılmıştır [7,18,19].

Dismenore, genç kadınlarda en yaygın görülen jinekolojik sorunlardan biridir [18,19]. Literatürde primer dismenorenin 15-17 yaşlarında başladığı ve 20-24 yaşlarında maksimuma ulaştığı belirtilmektedir [20]. Çalışmaya katılan kadın öğrencilerin yaş ortalaması 21,11±2,76 olarak bulunmuştur (**Tablo 1**). Türkiye’de dismenore ile ilgili yapılan benzer çalışmalara bakıldığında yaş ortalaması mevcut çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermiştir [9,19].

Dismenore genç kadınlarda yaygın olarak görülen jinekolojik problemlerden biridir [21]. Bu çalışmadaki kadın öğrencilerin %73,1’i dismenoreden muzdaripti (**Tablo 1**). Çeşitli araştırmalarda dünya genelinde dismenore prevalansının %50 ile %90 arasında olduğu bildirilmiştir [4,5,6]. Ülkemizde ise dismenore prevalansının %28 ile %87,7 arasında değiştiği belirtilmiştir [7,9]. Mevcut çalışmanın dismenore prevalansı literatürde belirtilen prevalans aralığında yer aldığı gözlenmiştir. Prevalans değişikliği kişinin ağrı algısından ve dismenoreyi tanımlamak için standart bir yöntemin olmayışından kaynaklanabilir [21].

Mevcut literatürdeki birçok çalışmada, biyolojik, psikolojik, sosyal ve yaşam tarzı faktörlerinin dismenore ve menstrüel profil ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Biyolojik faktörler arasında daha erken menarş yaşı, daha ağır menstrüel kanama ve ailede dismenore öyküsü yer alırken [22]. Psikolojik faktörler arasında stres, kaygı ve depresyon durumu yer almaktadır [12]. Çalışmada dismenore yaşayan katılımcıların %64,8’i ve dismenore yaşamayanların ise %5,5’i her adetinde ağrı yaşadığı ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır (**Tablo 2**). Altmış çalışmayı içeren sistematik bir derleme, erken adet görmeyen ve düzensiz bir döngünün dismenore riskini sırasıyla %54 ve %102 oranında artırdığı gösterilmiştir [23]. Hu ve arkadaşları (2019) çalışmasında adet kanaması erken olan ve düzensiz adet döngüsü olan kadınların adet ağrısı yaşama olasılığının daha yüksek olduğunu belirtmiştir [24]. Literatür sonuçları mevcut çalışmanın sonucunu desteklemektedir.

Ağrı, kişiden kişiye göre değişiklik gösteren subjektif bir duygudur. Literatürde değişik ağrı ölçüm yöntemleri olmasına karşın, mevcut çalışmada ağrının düzeyi kişinin algısına ve öz bildirimine göre değerlendirilmiştir. Dismenore yaşayan kadın öğrencilerin şiddetli ağrı algılama oranı %62,8 iken, dismenore yaşamayanlarda ise bu oran %2,2’dir (**Tablo 2**). Kadınların %3-33’ü her adet döngüsü sırasında 1-3 gün süren şiddetli ağrı yaşadığı raporlanmıştır [25]. Çalışmaların geneline bakıldığında dismenore yaşayan genç kadınların ağrıyı 5-7 puan aralığında orta düzeyde algıladıkları belirtilmektedir [8,18]. Maryam ve arkadaşları (2016) çalışmalarında, dismenore yaşayanların %12,1 hafif, %36,5 orta ve %51,4’e orta şiddette ağrı yaşadığını raporlamıştır. Çalışmanın bu bulgusu Maryam ve arkadaşlarının 2016’daki çalışmasındaki orta şiddette ağrı yaşama oranından daha yüksek bulunmuştur [26]. Araştırmanın bu sonucunun literatür ile farklılaşmasında bireysel, çevresel, sosyo-kültürel birçok faktörün etkili olduğu düşünülmektedir.

Dismenorede farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedavi yöntemlerden yararlanılmaktadır. Ancak pek çok kadın öncelikle farmakolojik yöntemleri tercih etmektedir. Araştırmada ağrı kesici ilaç kullanma durumu incelendiğinde dismenore yaşayan kadın öğrencilerin %52,2’inin ve dismenore

yaşamayanların ise %11'inin menstrüasyon döneminde ağrı kesici ilaç kullandığı belirlenmiştir (**Tablo 2**). Dismenorede ilaç kullanma oranını Alp Yılmaz ve Başer %19,8; Şentürk Erenel ve Şentürk %11,5; Uslay Keskin ve arkadaşları ise %14,09 olarak bulmuştur [27,28]. Mevcut araştırmada dismoresi olanların ağrı kesici kullanma oranı, yapılan diğer araştırma sonuçlarına göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmanın örneklem grubunun teorik ve uygulamalı eğitimlerinin en yoğun döneminde yapılması ve menstrüel ağrının azaltılması için katılımcıların ağrı kesici kullanım oranını arttırmış olabilir.

Primer dismenorede ağrıyla başatmak için medikal yöntemler yanında egzersiz, sıcak uygulama, masaj gibi tamamlayıcı yöntemlerin kullanıldığı belirtilmektedir [15,29]. Bu çalışmada dismoresi olanların %70,4'ünün, dismoresi olmayanların %41,8'inin menstrüasyon döneminde ilaç dışı yöntem kullandığı ve oranlar arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır (**Tablo 2**). İlaç dışı yöntem kullanma oranını Gun ve arkadaşları %80,9 [30]. Omidvar ve arkadaşları [31]. %83,2 ve Chia ve arkadaşları %75-91 olarak saptamıştır [32]. Mevcut çalışmada dismoresi olanların ilaç dışı yöntem kullanım oranları literatür ile paralellik gösterirken, dismoresi olmayanların ise yüzde kırk düzeyinde ilaç dışı yöntem kullandığı belirlenmiştir. Menstrüasyon dönemi her ne kadar fizyolojik bir dönem olarak algılsa da, kadınlar bu dönemi rahat geçirmek için ilaç dışı yöntemlerden yararlanmışlardır.

Ailedeki dismenore öyküsü, dismenore için önemli bir risk faktörüdür. Çalışmada dismoresi olanların %51,8'inin ve dismenore olmayanların %15,1'inin ailesinde dismenore öyküsü olduğu ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır (**Tablo 2**). Önceki çalışmaların çoğu, ailesinde dismenore öyküsü olan kadınların artmış dismenore riskine sahip olduğu bulgusu, mevcut çalışmanın bu bulgusunu desteklemiştir [33,34].

Dismenore ve menstrüel profil kadınların duyu durumunu etkileyerek anksiyete ve depresyona neden olabilmektedir. Duyusal ve davranışsal problemlerin dismenore ve menstrüasyon semptomlarını şiddetlendirdiği ya da anksiyete ve depresyonun dismenoreyi etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca anksiyete ve depresyonun dismenore şiddetini artırdığı belirtilmiştir [12,25]. Çalışmada hem dismoresi olan hem de dismoresi olmayan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması ile kaygılı bir kişiliğe sahip olduğunu düşünme ve adet döneminde kendini depresif hissetme oranları benzerlik göstermiştir ($p<0,05$) (**Tablo 3**). Gagaa ve arkadaşları primer dismoresi olan ve olmayan olguların depresyon ve anksiyete durumlarını kıyasladıkları çalışmalarının sonucunda dismenorelilerin %1,5'u düşük % 29,6'sı orta, % 68,9'u yüksek şiddete anksiyete düzeyine sahip olduğunu; kontrol grubunun % 33,1'i düşük %41,9'u orta %25'i yüksek anksiyete düzeyine sahip olduğunu tespit etmişlerdir [35]. Farklı yaş gruplarında yapılan başka çalışmada ise 18-55 yaş arası olan ve menstrüel sorunları olan kadınların anksiyete ve depresyon sıklığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir [36]. Goa'da 2000'den fazla Hintli kadını kapsayan bir çalışmada, dismenore yoğunluğunun depresyon, anksiyete ve somatik şikayetlerin şiddetiyle arttığı gösterilmiştir [37]. Namvar ve arkadaşları (2018) çalışmasında anksiyete skorunu dismenore olmayan grupta diğer iki gruba göre (primer dismoresi+ bel ağrısı olan ve primer dismoresi+ bel ağrısı olmayan) daha yüksek bulurken, depresyon skorunu dismenore olmayan grupta diğer iki gruba göre daha düşük bulmuştur [38]. Çalışmalarda dismenore ile anksiyete ve depresyon arasında ilişki gösterilmiş olmasına karşın, mevcut çalışmada hem dismoresi olan hem de dismoresi olmayan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması benzerlik göstermiştir. Çalışmanın bu bulgusunun literatürden farklılaşmasında, çalışmanın eğitimin en yoğun olduğu dönemde yapılması, katılımcıların kaygı ve depresyon düzeylerini etkilemiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda katılımcıların dismenore durumu ile menarş yaşı, adet ağrısı yaşama sıklığı, adet ağrısının başlama zamanı, adet dönemindeki ağrının şiddeti, adet ağrısı için ilaç kullanma, adet ağrısı için ilaç dışı yöntem kullanma ve ailede dismenore öyküsü arasında anlamlı fark saptanmıştır. Çalışmada hem dismoresi olan hemde dismoresi olmayan katılımcıların sürekli kaygı envanteri puan ortalaması benzerlik göstermiştir.

Sonuç olarak dismoresi olan ve olmayan grupların menstrüasyon profilleri farklılık gösterirken, sürekli kaygı envanteri puan ortalaması açısından gruplar benzerlik göstermiştir. Menstrüel süreç fizyolojik bir durum olmasına karşın, hemen her kadını etkilemesi nedeniyle, kadınların bu döneme özgü semptomlarının hafifletilmesi ve kaygılarının giderilmesi için danışmanlık desteği verilmesi önerilir. Gelecekteki araştırmalar, kadınların meşguliyetleri ile menstrüel dönemdeki anksiyete durumu arasındaki ilişkinin anlaşılmasına odaklanmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışmaya gönüllü katılan kadın üniversite öğrencilerine işbirlikleri için teşekkür ederim.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin “Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler” başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederim. Araştırma için ilgili etik kuruldan (26/12/2019/180 tarih ve sayılı) onam, kurumdan sözlü ve yazılı izin ve araştırmaya katılanlardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Kaynakça

- [1] Abd El-Mawgod, M.M., Alshaibany, A.S., Al-Anazi, A.M. 2016. Epidemiology of Dysmenorrhea Among Secondary-School Students in Northern Saudi Arabia. *J Egypt Public Health Assoc*, 91(3),115-119.
- [2] Iacovides, S., Avidon, I., Baker, F.C. 2015. What We Know About Primary Dysmenorrhea Today: A Critical Review. *Hum Reprod Update*, 21(6),762-778.
- [3] Osayande, A.S., Mehulic, S. 2014. Diagnosis and Initial Management of Dysmenorrhea. *Am Fam Physician*, 1;89(5),341-346.
- [4] Fernández-Martínez, E., Onieva-Zafra, M.D., Parra-Fernández, M.L. 2018. Lifestyle and Prevalence of Dysmenorrhea Among Spanish Female University Students. *PLoS One*, 10;13(8),e0201894.
- [5] Habibi, N., Huang, M.S., Gan, W.Y., Zulida, R., Safavi, S.M. 2015. Prevalence of Primary Dysmenorrhea and Factors Associated with its Intensity Among Undergraduate Students: A Cross-Sectional Study. *Pain Manag Nurs*,16(6),855-61.
- [6] Hailemeskel, S., Demissie, A., Assefa, N. 2016. Primary Dysmenorrhea Magnitude, Associated Risk Factors, and its Effect on Academic Performance: Evidence From Female University Students in Ethiopia. *Int J Womens Health*, 19(8),489-496.
- [7] Esen, İ., Oğuz, B., Serin, H.M. 2016. Menstrual Characteristics of Pubertal Girls: A Questionnaire-Based Study in Turkey. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 5;8(2),192-196.
- [8] Midilli, T.S., Yasar, E., Baysal, E. 2015. Dysmenorrhea Characteristics of Female Students of Health School and Affecting Factors and Their Knowledge and Use of Complementary and Alternative Medicine Methods. *Holist Nurs Pract*, 29(4),194-204.
- [9] Şahin, S., Kaplan, S., Abay, H., Akalın, A., Demirhan, İ., Pınar, G. 2015. Üniversite Öğrencilerinde Dismenore Yaşama Sıklığı ve Etkileyen Faktörlerin Değerlendirilmesi. *Ankara Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(1),25-43.
- [10] Lambert-Messerlian, G., Roberts, M.B., Urlacher, S.S., Ah-Ching, J., Viali, S., Urbanek, M., McGarvey, S.T. 2011. First Assessment of Menstrual Cycle Function and Reproductive Endocrine Status in Samoan Women. *Hum Reprod*, 26(9),2518-2524.
- [11] Seven, M., Güvenç, G., Akyüz, A., Eski, F. 2014. Evaluating Dysmenorrhea in a Sample of Turkish Nursing Students. *Pain Manag Nurs*, 15(3),664-671.
- [12] Dorn, L.D., Negriff, S., Huang, B., Pabs,t S., Hillman, J., Braverman, P., Susman, E.J. 2009. Menstrual Symptoms in Adolescent Girls: Association With Smoking, Depressive Symptoms, and Anxiety. *J Adolesc Health*, 44(3):237-243.
- [13] Şentürk Erenel, A., Şentürk, İ. 2007. Sağlık Meslek Lisesi Öğrencilerinin Dismenore Yaşama Durumları ve Dismenore ile Başetmeye Yönelik Uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 14(2),48-60.
- [14] Iravani, M. 2009. Clinical Effects of Zataria Multiflora Essential Oil on Primary Dysmenorrhea. *J Med Plants*, 8,54-60.

- [15] Güvey, H. 2019. Adölesanlarda Primer Dismenore ve Tedavi Yaklaşımları. *Jinekoloji - Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 16(3),160-66.
- [16] Öner, N., Le Compte, A. Durumluk - Sürekli Kaygı Envanteri El Kitabı. Boğaziçi Üniversitesi Yayını;1983.
- [17] Karaçam, Z., Dönmez, A., Doğan, H., Üstündağ, H. 2021. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 12(1),60-69.
- [18] Erdoğan, M., Özsoy, S. 2012. Genç Kızların Dismenore İçin Kullandığı Non-Farmakolojik Yöntemler. *Maltepe Tıp Dergisi*, 4(4),13-14.
- [19] Yılmaz, T., Nuraliyeva, Z., Dinç, H. 2020. Genç Kadınların Dismenore ile Baş Etme Yöntemleri. *JAREN*. 6(2),294-299.
- [20] Dawood, M.Y. 2006. Primary Dysmenorrhea: Advances in Pathogenesis and Management. *Obstet Gynecol*, 108(2),428-441.
- [21] Ju, H., Jones, M., Mishra, G. 2014. The Prevalence and Risk Factors of Dysmenorrhea. *Epidemiol Rev*, 36,104-113.
- [22] Zegeye, D.T., Megabiaw, B., Mulu, A. 2009. Age at Menarche and the Menstrual Pattern of Secondary School Adolescents in Northwest Ethiopia. *BMC Womens Health*. 5,9-29.
- [23] Latthe, P., Mignini, L., Gray, R., Hills, R., Khan, K. 2006. Factors Predisposing Women to Chronic Pelvic Pain: Systematic Review. *BMJ*, 332(7544),749-755.
- [24] Hu, Z., Tang, L., Chen, L., Kaminga, A.C., Xu, H. 2020. Prevalence and Risk Factors Associated With Primary Dysmenorrhea Among Chinese Female University Students: A Cross-Sectional Study. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 33,15e22.
- [25] Bernardi, M., Lazzeri, L., Perelli, F., Reis, F.M., Petraglia, F. 2017. Dysmenorrhea and Related Disorders. *F1000Res*. 5,6:1645.
- [26] Maryam, M., Ritonga, M.A., Istriati, I. 2016. Relationship Between Menstrual Profile and Psychological Stress With Dysmenorrhea. *Althea Medical Journal*, 3(3),382-387.
- [27] Alp Yılmaz, F., Başer, M. 2016. Dismenorenin Okul Performansına Etkisi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3),29-33.
- [28] Uslay Keskin, T., Yeşilfidan, D., Adana, F., Okyay, P. 2016. Aydın Sağlık Yüksekokulu Öğrencilerinde Perimenstrüel Şikâyetler ve Başa Çıkma Yöntemleri. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 15(5),382-388.
- [29] Topçu Akduman, A., Çimen Budur, O. 2016. Primer Dismenorede Tedavi Yaklaşımları. *Anadolu –Kliniği*, 21(3),235-240.
- [30] Gun, C., Demirci, N., Otrar, M. 2014. Use of Complementary Alternative Therapies for Dysmenorrhea Management. *Spatula DD*, 4(4),191-197.
- [31] Omidvar, S., Bakouei, F., Amiri, F.N., Begum, K. 2016. Primary Dysmenorrhea and Menstrual Symptoms in Indian Female Students: Prevalence, Impact and Management. *Glob J Health Sci*, 8(8),53632.
- [32] Chia, C.F., Lai, J.H., Cheung, P.K., Kwong, L.T, Lau, F.P., Leung, K.H., Leung, M.T., Wong, F.C., Ngu, S.F. 2013. Dysmenorrhoea Among Hong Kong University Students: Prevalence, Impact, and Management. *Hong Kong Med J*, 19(3),222-228.
- [33] Muluneh, A.A., Nigussie, T.S., Gebreslasie, K.Z., Anteneh, K.T., Kassa, Z.Y. 2018. Prevalence and Associated Factors of Dysmenorrhea Among Secondary and Preparatory School Students in Debreworkos Town, North-West Ethiopia. *BMC Womens Health*, 18(1),57.
- [34] Tavallae, M., Joffres, M.R., Corber, S.J., Bayanzadeh, M., Rad, M.M. 2011. The Prevalence of Menstrual Pain and Associated Risk Factors Among Iranian Women. *J Obstet Gynaecol Res*, 37(5),442-451.
- [35] Gagaa, T., Tkeshelashvili, B., Gagaa, D., Mchedlishvili, N. 2013. Assessment of Anxiety and Depression in Adolescents With Primary Dysmenorrhea: A Case-Control Study. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 26(6),350-354.

- [36] Strine, T.W., Chapman, D.P., Ahluwalia, I.B. 2005. Menstrual-Related Problems and Psychological Distress Among Women in the United States. *J Womens Health (Larchmt)*, 14(4),316-323.
- [37] Bettendorf, B., Shay, S., Tu, F. 2008. Dysmenorrhea: Contemporary Perspectives. *Obstet Gynecol Surv*, 63(9),597-603.
- [38] Namvar, H., Rahmati, M., Akbari, A., Hosseinifar, M., Moghaddam, A.A. 2018. Comparison of Anxiety and Depression in Female Students With Primary Dysmenorrhea and Without Dysmenorrhea in Zahedan University of Medical Sciences in 2017. *J Res Med Dent Sci*, 6 (2),140-147.

Evaluation of Geriatric Psychiatric Patients in The Emergency Department

Acil Serviste Geriatrik Psikiyatri Hastalarının Değerlendirilmesi

Habibe Selmin ÖZENSOY ^{1*}, Ahmet Burak ERDEM ¹, Meltem GÜRÜ ², Miray TÜMER ¹

¹ Ankara City Hospital, Department of Emergency Medicine, Ankara, Turkey

² Gazi University, Department of Psychiatry, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Objective: Besides the known co-morbidities, emergency department (ED) applications reveal an increasing trend due to the complications originating from the increase in the elderly population in the society. In addition, ED applications with psychiatric symptoms also continuously rise in numbers. Along these lines, in the current study, we focus on the fundamental causes associated with the ED applications of geriatric patients (> 64 years old) with psychiatric symptoms.

Materials and Methods: The patients who applied to our ED with psychiatric symptoms between February 2019 and August 2019 and who had a psychiatry consultation were evaluated retrospectively. The demographic data, co-morbidities, known psychiatric diseases, admission symptoms, and outcome diagnoses of the patients were recorded. The results were evaluated statistically.

Results: A total of 43.2 % of male patients who were over the age of 65, and 43.3 % of female patients were admitted to our ED with the most common complaint of anxiety. No significant relations were detected between suicide attempts and the presence of psychiatric disease in elderly patients ($p = 0.93$). Delirium was the most common diagnosis in the geriatric population without any known psychiatric disease ($n = 10$). All patients were diagnosed with depression, delirium, and dementia, respectively, after the emergency psychiatric evaluation.

Conclusion: Healthcare costs and morbidity-mortality rates of the senior patients with psychiatric symptoms can be significantly diminished upon the diagnosis of depression, delirium, and dementia via psychiatric examinations.

Keywords: Aging, emergency medicine, geriatric psychiatry

Alınış / Received: 16.09.2022 Kabul / Accepted: 05.06.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Amac: Bilinen komorbiditelerin yanı sıra toplumda yaşlı nüfusun artmasından kaynaklanan komplikasyonlar nedeniyle acil servis (AS) başvuruları artan bir eğilim göstermektedir. Ayrıca psikiyatrik belirtileri olan acil servis başvuruları da sürekli artış göstermektedir. Bu doğrultuda, mevcut çalışmada, psikiyatrik semptomları olan geriatric hastaların (>64 yaş) acil servis başvurularıyla ilişkili temel nedenlere odaklanıyoruz.

Gereç ve Yöntem: Acil servisimize Şubat 2019-Ağustos 2019 tarihleri arasında psikiyatrik belirtilerle başvuran ve psikiyatri konsültasyonu yapılan hastalar geriye dönük olarak değerlendirildi. Hastaların demografik verileri, ek hastalıkları, bilinen psikiyatrik hastalıkları, başvuru semptomları ve sonuç tanıları kaydedildi.

Bulgular: 65 yaş üstü erkek hastaların % 43.2'si, kadın hastaların ise % 43.3'ü en sık anksiyete şikayeti ile acil servisimize başvurdu. Yaşlı hastalarda intihar girişimi ile psikiyatrik hastalık varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.93$). Deliryum bilinen herhangi bir psikiyatrik hastalığı olmayan geriatric popülasyonda en sık görülen tanıydı ($n=10$). Acil psikiyatrik değerlendirme sonrasında tüm hastalara sırasıyla depresyon, deliryum ve demans tanısı konuldu.

Sonuç: Psikiyatrik semptomları olan yaşlı hastalarda psikiyatrik muayene ile depresyon, deliryum ve demans tanısı konulduğunda sağlık maliyetleri ve morbidite-mortalite oranları önemli ölçüde azaltılabilir..

Anahtar Kelimeler: Yaşlanma, acil tıp, geriatric psikiyatri



1. Introduction

The world's population is aging, bringing about an ever-greater burden of mental disorders in older adults [1]. Literature data suggest that number of people over the age of 65 exceeded 40 million in the U.S. in 2012, while senior citizens older than 65 years old surpassed 23.2 % of the population in Italy in 2020, and 25 % in Japan in 2013 [2,3]. It is expected that this ratio will reach > 30 % in Japan by 2025 [2,3]. The relative population of the elderly people in Turkey with respect to the national population is rapidly increasing [4]. For instance, the population over the age of 65 in Turkey corresponded to the 8.5 % of the overall population in 2017, where this value is expected to increase up to 10.2 % in 2023 [4]. According to a study conducted in a psychiatric hospital in Turkey, the rate of psychiatric patients aged 60 and above was found to be 8.2%, and it was reported that the proportion of elderly individuals seeking psychiatric emergency services has increased in parallel with the rise in the elderly population [5]. Depression is one of the most common psychiatric conditions in geriatric patients. Depressive symptoms are typically seen in about 15 % of geriatric patients. Age, malnutrition, obesity, race, economic inadequacies and functional disabilities are important risk factors leading to depression [6]. A study conducted in China identified more than 50 million patients over the age of 65 with dementia and cognitive impairment. This increased the need for psychiatric care in geriatric patients in the country and implied stringent measures to be taken at the national level. These measures not only reduced the hospitalization time of the patients, but also provided service to a greater number of patients [7].

Even after controlling for sociodemographic and disease-related variables, older adults with high levels of depressive symptoms have a 25% higher risk of all-cause mortality [8]. Therefore, the treatment of

mental health disorders among older adults is of critical importance for both mental and physical well-being [9].

There is a limited number of studies in Turkey regarding psychiatric emergency admissions in geriatric patients. In the present study, the purpose was to evaluate the demographic data of geriatric patients who applied to the ED with psychiatric symptoms, and the results of comorbidities and psychiatric diseases. In addition, it is aimed to contribute to the database of our country in geriatric psychiatric diseases.

2. Material and Method

The study was planned with a retrospective observational design. Patient consent was not obtained because it was in the form of a file review over the hospital automation system and did not contain images that would enable patients to be identified. The study was approved by the Ethics Committee. The present study was conducted in line with the Declaration of Helsinki and good clinical practices. There is no conflict of interest between the authors.

In the current study, patients ≥ 65 years of age who applied to the ED with psychiatric symptoms between February 2019 and August 2019 were evaluated retrospectively. These patients also received psychiatric consultation.

Among the patients admitted to the ED with psychiatric complaints, 67 patients who needed psychiatric consultation were included in the study. Those with any missing data were excluded from the study. The patients were divided into 2 groups as males and females. Patients' data were obtained through the hospital registry system. The results of the ED epicrisis and ED psychiatry consultations that were registered in the system were analyzed. The gender, age, place of residence, co-morbidities, known psychiatric diseases, whether or not patients had received any psychiatric treatment, and the final psychiatric diagnosis decision made in the process were recorded. The distribution of these data by gender was reported in statistical terms. The distribution of the final psychiatric diagnoses of the patients according to age was determined. Hospitalization decisions and the length of stay of the patients were also determined. The correlation between suicide attempts, which is among the reasons for admission to the ED, and psychiatric diagnosis status were examined. Finally, the relations between psychiatric diagnosis and hospitalization were investigated.

The SPSS 22 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL) program was used in the evaluation of the data. The categorical data were expressed as numbers and percentages, and numerical data as mean \pm standard deviation. The categorical data were compared with the Chi-Square Analysis (Pearson Chi-Square). A p value of < 0.05 was taken to be statistically significant.

3. Results

Among the currently investigated patients, 55 % (n = 37) of the patients were male and the mean age was 73 ± 7.0 in males. 45 % (n=30) of our patients were women. The mean age of the women was $77, 77.1\pm 9.7$ years. 92.5 % of the patients lived in their own houses. When the comorbidities of the patients were examined, the most common comorbidity was found to be the cerebrovascular disease with a rate of 35.8 %. This is followed by hypertension (23.9 %), and Alzheimer's disease (16.4 %). The distribution of the demographic data is summarized in Table 1.

Table 1. Distribution of the demographic data for those over the age of 65

		n	%
Gender	Male	37	55
	Female	30	45
Residence	Home	62	92.5
	Nursing home	5	7.5
Comorbidities	None	2	3
	Diabetes Mellitus	8	11.9
	Hypertension	16	23.9
	Cerebrovascular Disease	24	35.8
	Chronic Kidney Failure	1	1.5
	Parkinson	5	7.5
	Alzheimer's Disease	11	16.4
	Other*	33	49.3

*Peripheral Vascular Disease, Meniere's Disease, Systemic Lupus Erythematosus, Anemia, Neuro-brucellosis

It was found that anxiety was the most common symptom of patients in males (n=16) and females (n=13). Furthermore, 16.8 % of women who applied to the ED had a former a suicide attempt. In men, the most common reason for the admission was anxiety corresponding to the 43.2 % of the male patients, followed by aggression (21.6 %). When the distribution of the known psychiatric diseases of the patients was considered, it was found that 18.9% (n=7) of the males had dementia and (n=8) of females had depression (26.7 %). 43.3 % of women and 35.1 % of men did not have a known diagnosis of psychiatric disease. Observed symptoms and the distribution of known psychiatric disorders are summarized in Table 2.

Table 2. Distribution of admission symptoms, psychiatric disease, and use of medication of patients over the age of 65

	Gender		n	% (in terms of gender)	
Symptom	Male	Aggression	8	21.6	
		Anxiety	16	43.2	
		Suicide	5	13.5	
		EPS&	3	8.1	
		Hallucination	3	8.1	
		Drug Overdose	0	0	
		Depressive Symptom	2	5.4	
	Female	Aggression	4	13.3	
		Anxiety	13	43.3	
		Suicide	5	16.8	
		EPS&	0	0	
		Hallucination	4	13.3	
		Drug Overdose	1	3.3	
		Depressive Symptom	3	10	
Known Psychiatric Disease	Male	None	13	35.1	
		Dementia	7	18.9	
		Bipolar Disorder	3	8.1	
		Depression	6	16.2	
		Schizophrenia	6	16.2	
		GAD*	2	5.4	
	Female	None	13	43.3	
		Dementia	3	10	
		Bipolar Disorder	1	3.3	
		Depression	8	26.7	
		Schizophrenia	4	13.3	
		GAD*	1	3.3	
		Psychiatric treatment status	Male	21	56.8
		Female	17	56.7	

& Extrapryramidal Symptoms, * Generalized Anxiety Disorder

Upon initial psychiatric evaluations of the patients, it was found that the most common diagnosis was major depression (n=24). After the secondary evaluation, delirium (n=16) and dementia (n=8) were also diagnosed in addition to depression. It was also found that the most common diagnosis for the patients without a known psychiatric disease was delirium (n=10). Depression was the second most common

(n=6) diagnosis among the patients without a psychiatric diagnosis. The relationship between the final psychiatric diagnosis and age is summarized in Table 3.

Table 3. Distribution of the final psychiatric diagnosis and age of patients over the age of 65

		n	Age (Mean±SD)
Psychiatric disease after psychiatric assessment	Depression	24	72.2±7.62
	Delirium	16	79.1±7.54
	Dementia	8	78.6±11.8
	Psychosis	5	70.2±5.4
	No	2	76.5±12.02
	PTSD*	1	66
	Other**	11	74.18±7.87

* Post-traumatic stress disorder, ** Anxiety disorder, psychiatric follow-up, Extrapyramidal symptom

No correlation was found between patients with known psychiatric disease and those who attempted suicide as a control ($p=0.93$). There were no significant correlation between the patients who were diagnosed with a psychiatric disease after psychiatric evaluations and suicide ($p=0.54$). All of the patients without a known diagnosis of psychiatric disease were diagnosed with a psychiatric disease after the suicide attempt (Table 4).

Table 4. Relation of patients over the age of 65 diagnosed with psychiatric disease with suicide

Known Psychiatric Disease	Suicide		Total	p [*]
	Yes	No		
Yes	6	35	41	0.93
No	4	22	26	
Psychiatric disease diagnosis after psychiatric evaluation				
	Suicide		Total	p [*]
	Yes	No		
Yes	10	55	65	0.54
No		2	2	

*Chi-Square Test

Table 5 summarizes the relationship between the need for hospitalization and the psychiatric diagnosis of the patients. No correlations were detected between the patients' known psychiatric disease diagnosis and the need for hospitalization ($p=0.37$). There were no significant relations between the patients who were diagnosed with a psychiatric disease after psychiatric evaluation and the need for hospitalization ($p=0.68$).

Table 5. Relation with hospitalization of patients over the age of 65 with psychiatric disease diagnosis

Known Psychiatric Disease	Hospitalization		Total	p [*]
	Yes	No		
Yes	4	37	41	0.37
No	1	25	26	
Psychiatric disease diagnosis after psychiatric assessment				
	Hospitalization		Total	p [*]
	Yes	No		
Yes	5	60	65	0.68
No		2	2	

*Chi-Square Test

4. Discussion and Conclusion

The care of elderly patients who have multiple comorbidities is important in terms of reducing mortality and morbidity. In this sense, a geriatric-based approach may increase survival rates [10,11]. The present study deals with the psychiatric aspect of the issue in the emergency services, where an important examination and treatment process of individuals over 65 years of age is managed. More than half of the cases in the present study were men. However, there were differences in the rate of admission between the genders in previous studies. The number of female applicants was reported to be higher than that of males in some studies [12]. While Kalenderoğlu et al. found that the patients were mostly female in their study [13]. Sawayama identified a large proportion of male patients [14]. This difference in gender distribution may be because of regional, socioeconomic, and cultural differences. It is apparent that larger epidemiological studies are needed to clarify this issue. However, most studies show that the mean age of women is greater than that of men in the elderly population. The biggest reason for this may be that women have a longer life expectancy than men [15]. In our study, clinical complaints in the emergency department and anxiety symptoms were the first in both genders. Epidemiological studies have shown that anxiety disorders are more commonly observed among geriatric patient groups, with physical limitations, social, and economic problems emerging as prominent contributing factors [16]. Although aggressive behavior was the second most common among men, suicidal attempts were more common among women. The least common reason for men to apply was depressive complaints, and that of women was the drug overdose. Numerous studies reported that anxiety increased with age, comorbid disease, and multiple drug use in the elderly. This rate was between 10-20 % in the elderly [13]. It has been observed that anxiety and loneliness trigger depression in older individuals [16]. Although anxiety was the most common symptom in the our study, these patients were mostly diagnosed with depression and delirium. When the known psychiatric diagnoses were evaluated, there were only three patients diagnosed with anxiety disorder. After the emergency psychiatric examination of the patients, depression was added as a new diagnosis in two of them.

When the patients admitted to the emergency department because of a suicide attempt were examined, no significant relations were detected between a previously known psychiatric disease diagnosis. When the patients without a psychiatric diagnosis were evaluated from this point of view, no significant relations could be established with suicide. It was reported that an average of 13 people over the age of 65 die from suicide every day in the U.S. Furthermore, it was shown that 18.1 % of those who attempted suicide in 2000 were caused by the geriatric population [17]. A Canadian study evaluated psychiatric emergency service use among the people aged over and below the age of 65. It was found that 19% of people who were over the age of 65 had suicidal ideas and 8 % attempted suicide [18]. In the current study, it was also observed that a significant proportion of the patients had a history of suicide attempts. We believe that this is noteworthy even though there are differences between the relative populations of elderly people for different countries. A previous study reported that the rate of suicide was 5-6 times higher in men aged 80-84 than in the general population [19]. The reason for the higher rate in our study may be because of the level of development between countries and economic reasons. We think that this problem may increase with the increased geriatric population in our country .

Overall assessment of the currently investigated patients reveal that more than half of them had previously undergone a psychiatric examination and had been diagnosed with a known symptom. Most of these patients were using their medications regularly. Almost all of our patients were diagnosed with a psychiatric disorder after undergoing a psychiatric evaluation in the emergency department. A secondary additional psychiatric diagnosis was made to some of them who were previously diagnosed. The most frequently diagnosed disease was delirium in the patients who had no diagnosis, and depression was the second most common. When all patients were evaluated in the ED, the most common diagnosis was depression. In emergency department admissions, delirium is present in 8% to 17% of elderly patients and up to 40% of those residing in nursing homes [20]. Delirium has consistently been associated with adverse outcomes, including mortality [21]. These results as well as the current study underscore the prominence of depression and delirium in the emergency service diagnoses in the geriatric population. In accordance with the results of the current study, in a former study that was conducted in Canada, depression was detected among 20% of the patients over the age of 65 applying to the psychiatric emergency service. Admission to the emergency department because of substance use, especially alcohol, was found to be high in this study [18]. In the our study, no patients were detected who applied to the emergency department because of substance abuse. Accidental excessive drug intake was found in only 1 female patient. This may be because of the low rate of substance use such as alcohol among the elderly in our country and sociocultural differences. In the current study,

almost all of these patients were diagnosed with a new psychiatric disease for the first time. In summary, this result suggests that there are more elderly psychiatric patients in the geriatric population in our country than expected. Our work will be informative for more comprehensive studies. According to the results of the present study, the most important suggestion is the need to establish psychiatric diagnosis centers for the elderly population. The elderly must have easy access to these centers, which must be equipped in terms of geriatric care principles. Finally, dealing with the emergency psychiatric problems of elderly psychiatric patients in these centers outside the general emergency services will protect these patients, especially from the delirium manifestation caused by the general emergency room environment.

The geriatric population is experiencing a steady increase in our country, necessitating the establishment of healthcare institutions capable of providing psychiatric evaluations for these individuals. While developed countries have implemented specialized psychiatric emergency services, in our country, general emergency services are predominantly utilized for addressing the needs of such patients. Upon evaluating the results of the present study, it becomes evident that the aging population is associated with a heightened prevalence of anxiety among geriatric patients. Consequently, it is essential to conduct psychiatric evaluations for geriatric patients who present to the emergency department with psychiatric behavior changes or symptoms, irrespective of whether they have a previously diagnosed psychiatric condition. The psychiatric evaluation must be performed in geriatric patients who present to the emergency department with psychiatric behavior changes or symptoms, whether or not they have a previously known psychiatric disease or not. Comorbidities that occur with age, especially the history of cerebrovascular disease, loneliness, loss of cognitive functions, and physical decline cause depression in geriatric patients. Secondly, delirium and then dementia appear as other leading diseases. Periodic psychiatric examinations of geriatric patients in these periods of their lives without symptoms may decrease the development of diseases such as depression, delirium, and dementia. Reducing these three diseases can prevent other diseases and traumas which may develop in the elderly. Thus, ED admissions and hospital stays can be reduced due to psychiatric limitations in geriatric patients.

Declaration of Ethical Code

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

The study was approved by the Ethics Committee of Ankara City Hospital with E1-21-2169 on 21,12,2021.

References

1. Charles F. Reynolds 3rd et al. Mental health care for older adults: recent advances and new directions in clinical practice and research *World Psychiatry* 2022;21:336–363
2. Cristina ML, Spagnolo AM, Giribone L, Demartini A, Sartini M. 2021. Epidemiology and Prevention of Healthcare-Associated Infections in Geriatric Patients: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*. ;18(10): 5333.
3. Arai H, Ouchi Y, Toba K, Endo T, Shimokado K, Tsubota K, et al. 2015. Japan as the front-runner of super-aged societies: Perspectives from medicine and medical care in Japan. *Geriatr Gerontol Int*. 15(6): 673-687.
4. Gürer A, Çırpan FK, Özlen NA. 2019. Yaşlı Bakım Hizmetleri *Journal of Health Services and Education*; 3(1): 1-6 ISSN: 2636-8285.
5. Derya İPEKÇİOĞLU et all. Bir eğitim hastanesi psikiyatri acil servisine başvuran yaşlı hastaların sosyodemografik ve klinik özellikleri *Anatolian Journal of Psychiatry* 2012; 13:24-31
6. Aprahamian I, Mamoni RL, Cervigne NK, Augusto TM, Romanini CV, Petrella M, et al. 2020. Design and protocol of the multimorbidity and mental health cohort study in frailty and aging (MiMiCS-FRIL): unraveling the clinical and molecular associations between frailty, somatic disease burden and late life depression. *BMC Psychiatry*. 20: 573.

7. Wang J, Sun F, Qiu Q, Li Q, Zhang Q, Yang H, et al. 2020. Geriatric psychiatry development in health care settings in mainland China: Challenges and Outlook. *Int J Geriatr Psychiatry*. 35 (9): 1078-1079.
8. Schulz R, Beach SR, Ives DG, Martire LM, Ariyo AA, Kop WJ. Yaşlı erişkinlerde depresyon ve ölüm arasındaki ilişki: kardiyovasküler sağlık çalışması . *Arch Intern Med* 2000; 160 :1761–8
9. Jason T. Grossman et all. mHealth Assessment and Intervention of Depression and Anxiety in Older Adults. *Harv Rev Psychiatry*. 2020 May-Jun; 28(3): 203–214. doi: 10.1097/HRP.000000000000255
10. Simson S, Wilson LB. 1982. Meeting the Mental Health Needs of the Aged: The Role of Psychiatric Emergency. *Hospital & Community Psychiatry*. 33(10): 833-836.
11. Wells JL, Seabrook JA, Stolee P, Borrie MJ, Kneefel F. 2003. State of the art in geriatric rehabilitation. Part I: Review of frailty and comprehensive geriatric assessment. *Arch Phys Med Rehabil*. 84: 890-897.
12. Saddock BJ, Saddock VA. 2007. *Klinik Psikiyatri. Psikiyatrik Aciller*, Aydın H, Bozkurt A (Çeviri Ed.) 8. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2442–2460.
13. Kalenderoğlu A, Yumru M, Selek S, Cansel N, Virit O, Savaş HA. 2007. Sociodemographic and clinical features of patients, who applied to the Geropsychiatry Unit of Gaziantep University Faculty of Medicine. *Anatolian Journal of Psychiatry*. 8: 179-185.
14. Sawayama E, Takahashi M, Arai H, Nakajima K, Kano A, Sawayama T, et al. 2009. Characteristics of elderly people using the psychiatric emergency system. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 63: 577–579.
15. Şişe Ş, Özder A. 2016. Afyonkarahisar ilinde evlerin-de yaşayan 85 yaş ve üstü ileri yaşlıların genel yaşam koşullarının değerlendirilmesi. *Konuralp Tıp Dergisi* 8: 124-31.
16. Katherine Ramos, PhDa, *, Melinda A. Stanley Anxiety Disorders in Late Life. *Clin Geriatr Med* 36 (2020) 237–246
17. Walsh PG, Currier G, Shah MN, Lyness JM, Friedman B. 2008. Psychiatric Emergency Services for the U.S. Elderly: 2008 and Beyond. *Am J Geriatr Psychiatry*. 16:706–717
18. Chaput Y, Beaulieu L, Paradis M, Labonté E. 2011. The elderly in the psychiatric emergency service (PES); a descriptive study. *BMC Psychiatry*. 11(111): 1-9.
19. Thienhaus OJ, Piasecki MP. 2004. Assessment of Geriatric Patients in the Psychiatric Emergency Service. *Emergency Psychiatry*. 55(6): 639-642.
20. Inouye S., Westendorp R., Saczynski J.: Yaşlı insanlarda deliryum. *Lancet* 2014; 383: s. 911-922.
21. Tammy T. Hsieh MD, MPH et all. Delirium in the Elderly Psychiatric Clinics of North America, 2018-03-01, Volume 41, Issue 1, Pages 1-17

Drug-Excipient Compatibility Studies In Binary Mixtures of Tadalafil by Using DSC, TGA and FTIR

İkili Tadalafil Karışımlarında DSC, TGA ve FTIR Kullanılarak İlaç-Yardımcı Madde Geçirgenlik Çalışmaları

Mahmut DOĞANTÜRK^{1*}, Hale SEÇİLMİŞ²

¹ Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Scientific and Technology Application and Research Center, Burdur, Turkey

² Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, Burdur, Turkey

ABSTRACT

Objective: During drug preformulation studies, thermal analysis and spectroscopic techniques are used to detect physical or chemical incompatibilities between the active compound and the excipients in the formulation, and to demonstrate the safety and/or efficacy of the final product. It has revolutionized erectile dysfunction with the development of a selective cyclic guanosine monophosphate-specific PDE-5 inhibitors. Tadalafil is one of these inhibitors. Excipients are included in dosage forms to assist in manufacture, absorption or application. Although considered to be pharmacologically inert, the drug active compound may impair effectiveness.

Material and Method: DSC, TGA, and FTIR, were used in the work. Ascorbic acid, butylated hydroxyanisole, calcium phosphate dibasic, cellulose, magnesium stearate, mannitol, sodium carboxymethyl cellulose, sucrose, talc, starch, primojel, and citric acid exhibit interaction with Tadalafil. Binary mixtures of drug:excipient have been analyzed.

Results: Based on spectroscopic and thermal results; Tadalafil is incompatible with magnesium stearate, mannitol, sucrose, and ascorbic acid.

Conclusion: Studies to investigate drug-excipient compatibility are an important step in drug development studies. Thermal and spectroscopic techniques are widely used in such studies.

Keywords: Tadalafil, Compatibility, Excipient; Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Differential Scanning Calorimetry

Alınış / Received: 01.11.2022 Kabul / Accepted: 19.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Amaç: İlaç ön formülasyon çalışmaları sırasında, formülasyondaki aktif bileşik ile yardımcı maddeler arasındaki fiziksel veya kimyasal geçimliliklerini tespit etmek ve nihai ürünün güvenilirliğini ve/veya etkinliğini göstermek için, uygun bir formülasyon eldesinde termal analiz ve spektroskopik teknikler kullanılır. Erektile disfonksiyonda, seçici bir siklik guanozin monofosfata özgü fosfodiesteraz tip 5 inhibitörlerinin geliştirilmesi ile devrim yaratmıştır. Tadalafil de bu inhibitörlerden bir tanesidir. Yardımcı maddeler, üretim, emilim veya uygulamaya yardımcı olmak için dozaj formlarına dahil edilmiştir. Farmakolojik olarak inert olduğu düşünülse de, ilaç aktif bileşiği etkinliği bozabilir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada DSC, TGA ve FTIR sistemleri kullanılmıştır. Askorbik asit, butile hidroksianisol, kalsiyum fosfat dibazik, selüloz, magnezyum stearat, mannitol, sodyum karboksimetil selüloz, sukroz, talk, nişasta, primojel ve sitrik asidin Tadalafil ile etkileşimi incelenmiştir. İkili ilaç karışımları: ekspiyan analiz edilmiştir.

Sonuçlar: Spektroskopik ve termal sonuçlara göre; Tadalafil magnezyum stearat, mannitol, sukroz ve askorbik asit ile geçimsizdir.

Sonuç: İlaç-ekspiyan uyumluluğunu araştıran çalışmalar, ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir adımdır. Bu tür çalışmalarda termal ve spektroskopik teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tadalafil, Geçimlilik, Yardımcı madde, Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi, Diferansiyel tarama kalorimetrisi



1.Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease involving a proliferative vasculopathy of various small pulmonary vascular arterioles of different etiologies, but also with a similar clinical presentation and, in most cases, responding to similar medical treatment. Currently, various drugs and prostanoids for symptom relief, endothelin receptor antagonists (ERA), and phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors are used as pulmonary arterial standards in the treatment of hypertension and erectile dysfunction [1-11]. Tadalafil is the newest of the three PDE5 inhibitors available. Similar effect to Sildenafil and Vardenafil in terms of mechanism of action, but differing primarily in longer duration of action and half-life [12]. The chemical structures of Tadalafil is given in Figure 1.

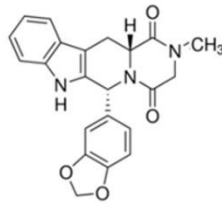


Figure 1: The chemical structure of Tadalafil

The safety, effectiveness, quality and stability of the drug formulation are the main topics of the new drug development process. The stability of a dosage form with these properties is the result of a thorough study of the physico-chemical properties of the active pharmaceutical ingredient (API) as well as all other ingredients (eg excipients, production aids, packaging) [13]. Drug-excipient compatibility studies maximize the stability of a dosage form. In addition, it is important in the discovery and development of new drugs. It helps in formulating the dosage form, determining its stability and maximizing it. Both physical and chemical instability can cause safety concerns on the drug. Negative interactions between drug and excipient result in chemical instability of the drug, change in the chemical structure of the drug molecule, degradation of the drug and decrease in drug content, and formation of other molecules such as degradation products [14].

Spectroscopic and thermal techniques are frequently used for incompatibility studies between drugs and excipients [15-25]. Spectroscopic techniques are sensitive to the structure, functional groups and environment of organic compounds. These techniques are used to determine the solid state behavior and formulations of APIs. In addition, it is also used in scanning potential intermolecular interactions and compatibility between components based on vibrational changes. Thermal analysis techniques are critical in compatibility screening studies. It is widely used for rapid detection and assessment of physicochemical mismatch. XRD is a direct measurement of a material's crystalline form, with the typical output being a plot of intensity versus diffraction angle [26]. Different excipient mixtures are used in drugs containing tadalafil (lactose, hydroxypropyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, microcrystalline cellulose, sodium lauryl sulfate, magnesium stearate, hydroxypropyl methylcellulose, titanium dioxide, yellow iron oxide, macrogol/PEG 4000, hypromellose, triacetin, talc, sodium lauryl sulfate, polyvinyl alcohol, lecithin, etc.).

In the present study, the possible interactions between Tadalafil and excipients (ascorbic acid, butylated hydroxyanisole, calcium phosphate dibasic, cellulose, magnesium stearate, mannitol, sodium carboxymethyl cellulose, sucrose, talc, starch, primojel, citric acid) have been evaluated. Ascorbic acid is a powdered compound with preservative properties, which is considered safe for oral administration as an inactivated excipient. Its melting point is 190°C. Calcium phosphate dibasic is a pharmaceutical excipient that contains Calcium ions (Ca^{2+}) together with phosphate anions. It has a white powder structure with a melting point of 109°C.

Polymers are macromolecular compounds. They make up a broad and diverse group of substances, including natural polymers, synthetic polymers, semi-synthetic polymers, and fermentation products. These compounds are frequently used in drug formulations due to their excellent binding properties in the dry state. Polymers are macromolecular compounds. They make up a broad and diverse group of substances, including synthetic polymers, semi-synthetic polymers, natural polymers, and fermentation products. These compounds are frequently used in drug formulations due to their excellent binding properties. Polymers are macromolecular compounds. They make up a broad and diverse group of substances, including synthetic polymers, semi-synthetic polymers, natural polymers, and fermentation products. These compounds are frequently used in drug formulations due to their excellent binding properties. Carboxymethylcellulose sodium and cellulose are excipients in the form of white powder. While the melting point of Carboxymethylcellulose sodium is 274°C, this value is in the range of 260-270°C for Cellulose. Butylated hydroxytoluene, commonly known as BHT, is an organic compound used as an antioxidant in the pharmaceutical industry. BHT is a substituted derivative of phenol. BHT helps to prevent the formation of free radicals and the oxidation step. It has a powder structure with a melting point in the range of 58-70°C. Magnesium Stearate ($\text{Mg}(\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2)_2$ or Magnesium Octadecanoate) is a mixture of magnesium salts of fatty acids, mainly palmitic and stearic acid. It is one of the most commonly used excipients. It is a solid and white powder. It is an FDA-approved inactive ingredient commonly used as a lubricant and release agent in pharmaceutical manufacturing. Its melting point is 359.4°C [27]. Sucrose is a sugar from the monosaccharide group. It is a compound that is used as a preservative especially during the lyophilization of drugs, exists in crystal form and has a melting point of 186°C [28]. Mannitol, commonly used in pharmaceutical formulations, is a sugar alcohol. It is one of the most common excipients in freeze-dried injectable products and is used as a bulking agent. It is also used as a sweetening agent, diluent and tonicity agent. It has a melting point of 165°C [29]. Talc is a naturally sourced mineral extracted from the soil, consisting of magnesium, silicon, oxygen and hydrogen. It is an aqueous magnesium silicate with the chemical formula $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$. It is used to retain moisture, prevent clumping and facilitate the use of the product.

The aim of this paper is to assess the stability of Tadalafil when mixed with several excipients commonly used in the pharmaceutical industry. In the present study, thermal and spectral techniques were used

for drug-exciptent interactions. Due to its unique chemical and pharmacokinetic properties, Tadalafil-exciptent interaction has been included in our study.

2. Material and Method

Chemicals and reagents

Tadalafil, ascorbic acid (AA), butylated hydroxyanisole (BHA), calcium phosphate dibasic (CP), cellulose (C), magnesium stearate (MS), mannitol (M), sodium carboxymethyl cellulose (SCC), sucrose (S), talc (T), starch (ST), primojel (P), citric acid (CA), potassium bromide (KBr) purchased from Sigma and Merck.

Instrumentation

Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR) spectra were recorded at room temperature using a Frontier Perkin Elmer using KBr compressed discs. Each spectrum was obtained by averaging 32 scans from 4000 down to 450 cm^{-1} [30].

Differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained in Perkin Elmer Calorimeter (DSC 4000). Tadalafil and Tadalafil-exciptent mixtures were placed in a pre-weighed stainless steel pan. A pan was containing approximately 10 mg of sample under dry nitrogen atmosphere (flow rate of 20 mL min^{-1}). The sample was equilibrated to 25°C and then heated from 25°C to 400°C at a rate of 10°C/min. [31, 32].

Thermogravimetric analysis (TG) curves were obtained in a SEIKO SII, model TG/DTA 7200, under dry nitrogen atmosphere (flow rate 30 mL min^{-1}) as the purge gas and heating rate of 10°C min^{-1} in the temperature range between ambient and 800°C. Samples were weighted in platinum pans about 10 mg. $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ was employed as a reference material in the analysis [33].

3. Results

Recently, thermal and spectroscopic methods have been recommended for such studies. FTIR focuses on the solid state behavior of drug substances. Indicative of no interaction between drug and excipient is the absence of any disappearance of the base group peak of the pure drug. In the dual drug mixture, functional group peaks of the pure drug are included in the spectrum, even if there is a slight decrease in density. For this reason, vibrational changes are considered as an indicator of intermolecular interactions-incompatibility studies between drug-exciptents. The spectra are compared (Table 1) (Figure 2).

Table I: FTIR description of Tadalafil

Peak wavenumber (cm^{-1})	Description [34, 35]
3330	Absorption bands characteristic of amine (N-H)
3073	=C-H stretching in an aromatic ring
2907	-C-H stretchings in the alkanes
1677	lactam (N-H)
1678 and 1650	C=O
1600–1585 and 1500–1400	Carbon–carbon stretching vibrations in the aromatic rings
1300–1000	C-N stretching
1200–1000	C-H deformation

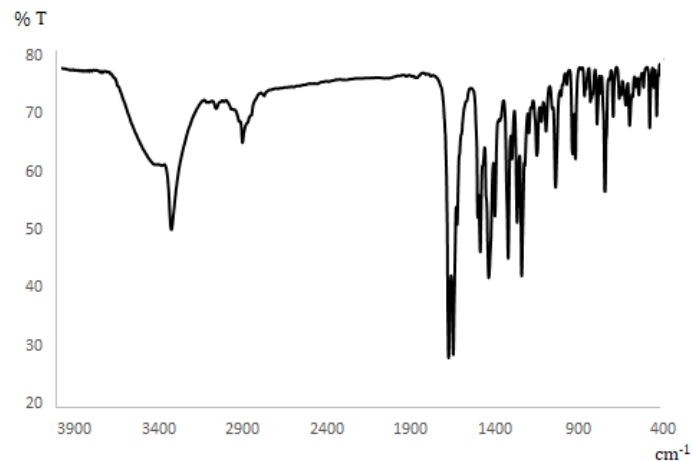


Figure 2: FTIR spectrum of Tadalafil

The FTIR spectrum of Tadalafil-BHA mixture showed sharp band at 3404 cm^{-1} , 3392 cm^{-1} , 2979 cm^{-1} , 2951 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} , and 1033 cm^{-1} . These peaks are either not included in the spectrum of Tadalafil or their peak intensities are very low (Figure 3).

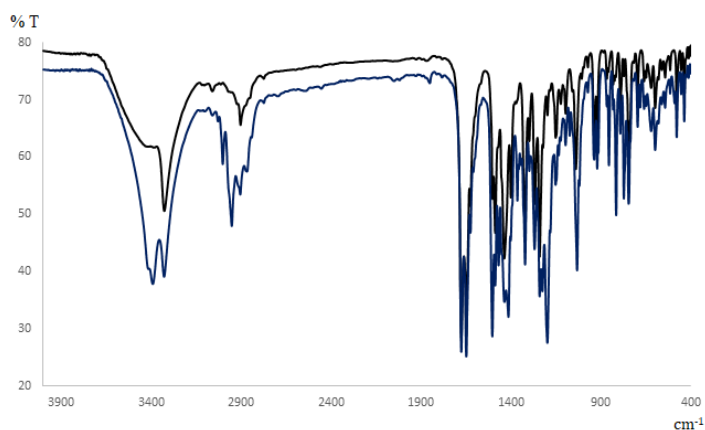


Figure 3: FTIR spectrum of Tadalafil-BHA mixture

Apart from the peaks in Tadalafil, there are also sharp peaks in 3400 cm^{-1} , 3287 cm^{-1} , 2971 cm^{-1} , 2947 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , and 1021 cm^{-1} for Tadalafil-M mixture (Figure 4).

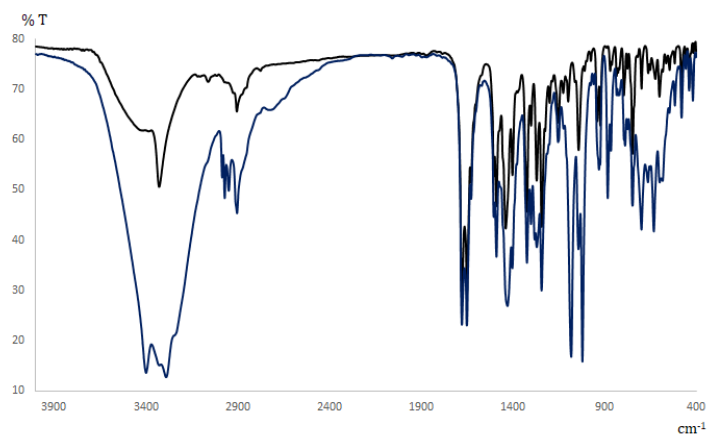


Figure 4: FTIR spectrum of Tadalafil-M mixture

In addition to the characteristic peaks of Tadalafil, there are 3564 cm^{-1} , 3389 cm^{-1} , and 1068 cm^{-1} peaks of different intensities in the Tadalafil-S mixture (Figure 5).

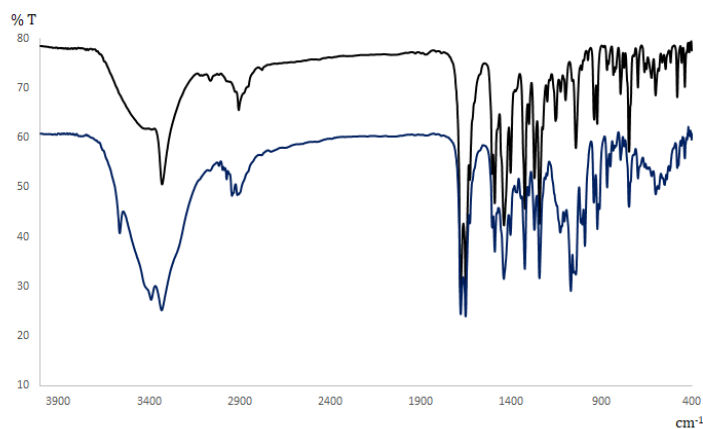


Figure 5: FTIR spectrum of Tadalafil-S mixture

In the spectrum of Tadalafile-AA, there are peaks of different intensities at 3525 cm^{-1} , 3408 cm^{-1} , 3213 cm^{-1} , and 1578 cm^{-1} . In addition, due to the differentiation in the structure, the twin peak at 1678 and 1650 cm^{-1} of C=O shifted to 1700 cm^{-1} and the shape of the peak changed. It is seen from the spectrum that the peak intensities differ in the range of 1400 cm^{-1} - 900 cm^{-1} (Figure 6).

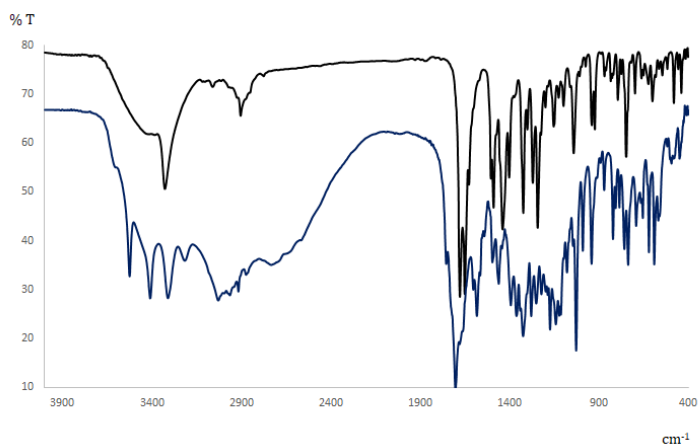


Figure 6: FTIR spectrum of Tadalafil-AA mixture

In the spectrum of the Tadalafil-CA mixture, there are peaks of different intensities, especially at 3496 cm^{-1} , 3446 cm^{-1} , 3294 cm^{-1} , 1361 cm^{-1} , and 1176 cm^{-1} . In addition, there are two peaks at 1755 cm^{-1} and 1683 cm^{-1} next to the twin peaks at 1678 and 1650 cm^{-1} belonging to two C=O in the structure (Figure 7).

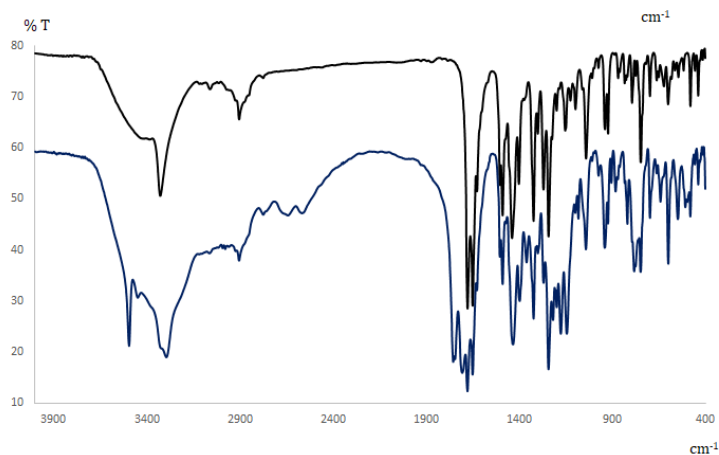


Figure 7: FTIR spectrum of Tadalafil-CA mixture

According to FTIR results, BHA, M, S, AA and CA excipients were found to be incompatible with Tadalafil. If the main peaks of the drug are also included in the spectrum of the drug-excipient physical mixtures, it is an indication of the absence of possible interactions between the active drug and excipients [36, 37]. The characteristic peaks of Tadalafil were unchanged or preserved in mixtures of Tadalafil-CP, Tadalafil-C, Tadalafil-SCC, Tadalafil-T, Tadalafil-ST, and Tadalafil-P (Figure 8).

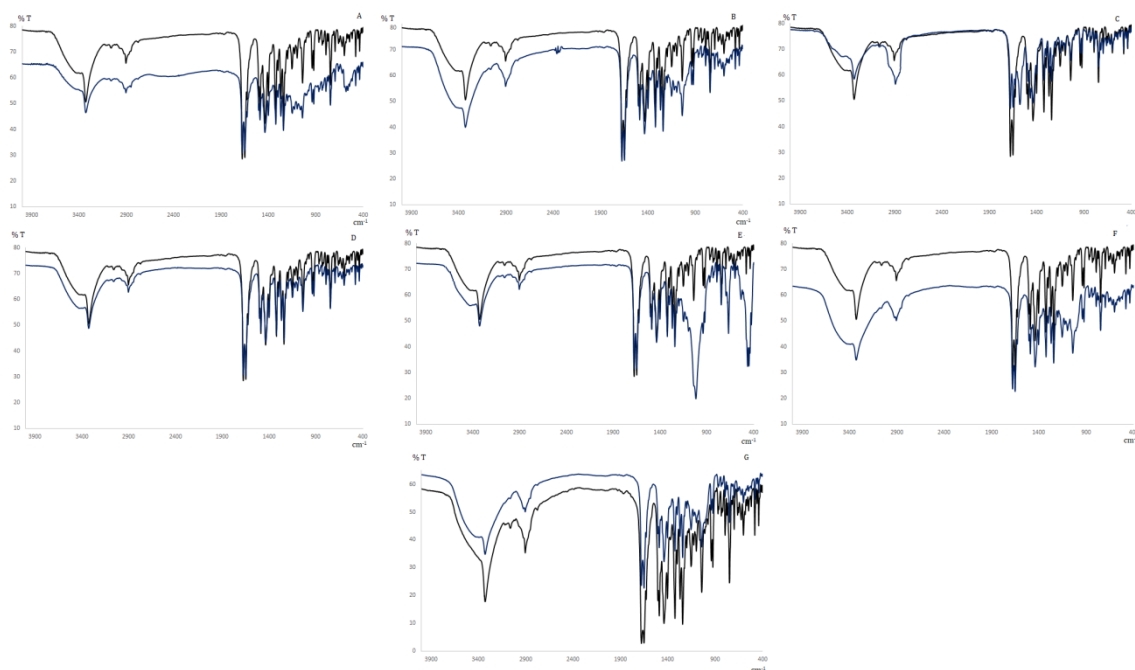


Figure 8: FTIR spectrums of a) Tadalafil-CP mixture, b) Tadalafil-C mixture, c) Tadalafil-MS mixture, d) Tadalafil-SCC mixture, e) Tadalafil-T mixture, f) Tadalafil-ST mixture, and g) Tadalafil-P mixture

The TGA curve of Tadalafil is illustrated in Figure 9.

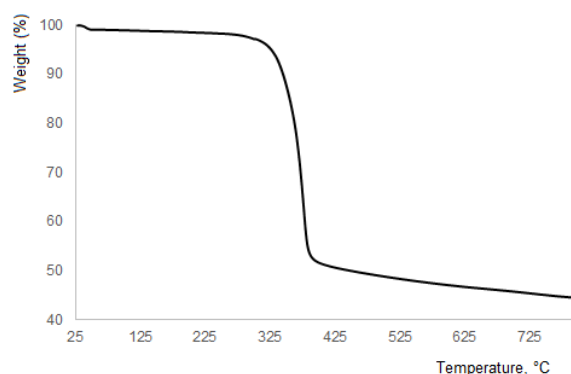


Figure 9: TGA curve of Tadalafil

From TGA curve, little weight loss from 25 to 300°C was detected for Tadalafil because chemical degradation with 3% of impurities. As shown in Fig. 9, Tadalafil had a sharp melting point (T_M) at 303°C [38, 39]. Thermal stability of Tadalafil and its binary mixtures with different excipients are presented in the Table 2. TG/DTG curve showed that Tadalafil was thermally stable up to 300°C and finally decomposed at 400°C with a residual amount of 48.27%. The DSC curve showed a sharp endothermic peak at 303.64°C indicating the indicating the (T_M) [38-40]. We have compared TG curve of pure Tadalafil and BHA, CP, C, MS, M, SCC, S, T, AA, ST, P, and CA. In binary mixture %10 decomposition temperatures were start from a range of 128-355°C. In drug-exceptient binary mixture %10 decomposition temperatures were start from a range of 138-599°C. The decomposition temperature value is directly proportional to resistibility of drug in mixture form against temperature. Table 2 shows seven compounds close to the decomposition temperature of Tadalafil. These are CP, C, MS, SCC, T, ST and P.

Based on the 10% and 15% decomposition temperatures, the temperature values of the T and ST mixtures are higher than the other mixtures. This shows that these binary mixtures (Tadalafil-T and Tadalafil-ST) are more stable than others Tadalafil-CP, Tadalafil-C, Tadalafil-MS, Tadalafil-SCC, and Tadalafil-P).

Table 2: Thermal stability of Tadalafil and Tadalafil-excipient mixture with excipients by TG.

Sample	10% mass loss/°C	15% mass loss/°C	Total weight loss (600°C/%)
Tadalafil	344.91	355.12	52.85
Tadalafil-BHA	128.79	138.13	86.18
Tadalafil-CP	343.75	354.84	45.39
Tadalafil-C	323.23	332.38	79.79
Tadalafil-MS	317.77	326.52	70.74
Tadalafil-M	295.48	305.02	72.93
Tadalafil-SCC	311.68	341.14	21.39
Tadalafil-S	234.36	249.62	72.44
Tadalafil-T	352.59	366.48	24.07
Tadalafil-AA	238.13	278.15	32.82
Tadalafil-ST	355.89	599.67	15.28
Tadalafil-P	331.70	357.95	18.69
Tadalafil-CA	199.87	216.17	29.36

The amount of residue may also influence the stability of formulation residual content after heating is inversely proportional to the thermal decomposition of drug. The TG curve of all binary mixture show a content of residue range from 13.82-84.72% of its initial weight. The highest content of residue would be found in case of ST.

As shown in Fig. 10, Tadalafil had a sharp (T_M) at 303.64°C as reported [38]. About the same melting endotherm peak was observed for the drug and CP, C, and T physical mixtures (Table 3). The endotherm peak for Tadalafil-MS at 279.33°C, Tadalafil-SCC at 296.33°C, Tadalafil-ST at 297.14°C, Tadalafil-P at 298.48°C. According to papers, very little temperature change in enthalpy peaks in DSC thermograms is due to their low impurity in the compounds used for analysis [38-41]. As such there is no interaction between drug–this excipient.

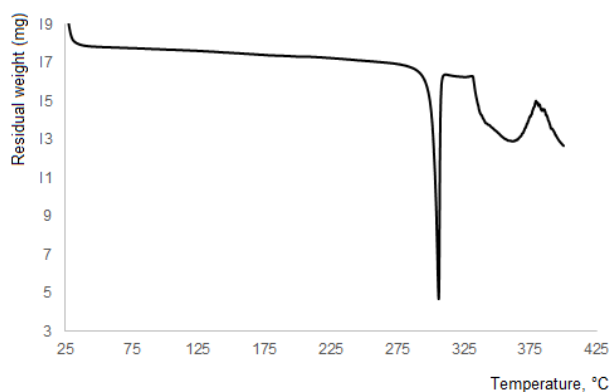


Figure 10: DSC curve of Tadalafil

Table 3: Peak temperature and enthalpy values of Tadalafil and Tadalafil-excipient mixtures

Sample	T_{peak} (°C)	Comments	Result
Tadalafil	303.64		
Tadalafil-BHA	169.28	Lowest melting time	Possible interaction
Tadalafil-CP	304.41	Thermally stable	No interaction
Tadalafil-C	304.46	Thermally stable	No interaction
Tadalafil-MS	279.33	Thermally less stable	Low impurity
Tadalafil-M	169.21	Lowest melting time	Possible interaction
Tadalafil-SCC	296.78	Thermally less stable	Low impurity
Tadalafil-S	182.40	Lowest melting time	Possible interaction
Tadalafil-T	304.44	Thermally stable	No interaction
Tadalafil-AA	193.95	Lowest melting time	Possible interaction
Tadalafil-ST	297.14	Thermally less stable	Low impurity
Tadalafil-P	298.48	Thermally less stable	Low impurity
Tadalafil-CA	156.97	Lowest melting time	Possible interaction

The endotherm peak for Tadalafil-BHA at 169.28°C, Tadalafil-M at 169.21°C, Tadalafil-S at 182.40°C, Tadalafil-AA 193.95°C, and Tadalafil-CA 156.97°C, thus suggesting a probable interaction.

4. Discussion and Conclusion

The FTIR, TGA and DSC results of the drug and its binary mixtures containing excipients are important in terms of determining the interaction between the drug and excipient. Studies to investigate drug-excipient compatibility are an important step in drug development studies. Thermal and spectroscopic techniques are widely used in such studies. Tadalafil is the new and the most versatile PDE5 inhibitor in the treatment of hypertension. Parallel combinations of Tadalafil and Tadalafil-excipient mixtures with TG and DSC thermogram and various excipients were recorded. When evaluating the results, the focus was on the thermal stability model, or mass percent in the TG, during the change or movement of the endothermic peak and the presence of the new temperature-related peak in the DSC. In this study,

DSC, TGA, and FTIR systems were used to determine the possible interactions between Tadalafil and some excipients like BHA, M, S, AA, and CA. TG results clearly demonstrate that CP, C, MS, SCC, ST, T and P are stable with drug at elevated temperature. While the 10% and 15% mass loss temperatures of Tadalafil-T and Tadalafil-ST are higher than pure Tadalafil, the values of the others are slightly lower. DSC curve demonstrated suspected interaction with BHA, M, S, AA and CA. In the FTIR spectra of the binary mixtures of BHA, M, S, AA and CA, there have been shifts in the places of some of the main peaks of Tadalafil or different peaks. The result of FTIR study of drug and there binary mixtures with excipient were constant and showed as supportive result of TG and DSC.

Declaration of Ethical Code

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

References

- [1] Giuseppe, G. P., Capron, F., Stewart, S., Leone, O., Humbert, M., Robbins, I. M., Reid, L. M., Tuder, R. M. 2004. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12), 25-32.
- [2] Rich, S. E. Primary pulmonary hypertension: executive summary from the World Symposium—primary pulmonary hypertension. <http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html>.
- [3] Tanaka, S., Uchida, A., Hakamata, A., Miyakawa, S., Odagari, N., Inui, N., Watanabe, H., Namiki, N. 2020. Simultaneous LC-MS analysis of plasma concentrations of sildenafil, tadalafil, bosentan, ambrisentan, and macitentan in patients with pulmonary arterial hypertension. *Pharmazie*, 75, 236-239.
- [4] Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P., Stewart, D. J. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine*, 328, 1732–1739.
- [5] Galie, N., Ghofrani, H. A., Torbicki, A., Barst, R. J., Rubin, L. J., Badesch, D., Fleming, T., Parpia, T., Burgess, G., Branzi, A., Grimminger, F., Kurzyna, M., Simonneau, G. 2005. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 353, 2148–2157.
- [6] Galie, N., Olschewski, H., Oudiz, R. J., Torres, F., Frost, A., Ghofrani, H. A., Badesch, D. B., McGoon, M. D., McLaughlin, V. V., Roecker, E. B., Gerber, M. J., Dufton, C., Wiens, B. L., Rubin, L. J. 2008. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*, 117(23), 3010–3019.
- [7] Galie, N., Brundage, B. H., Ghofrani, H. A., Oudiz, R. J., Simonneau, G., Safdar, Z., Shapiro, S., White, R. J., Chan, M., Beardsworth, A., Frumkin, L., Barst, R. J. 2009. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 119(22), 2894–2903.
- [8] Galie, N., Barbera, J. A., Frost, A. E., Ghofrani, H. A., Hoeper, M. M., McLaughlin, V. V., Peacock, A. J., Simonneau, G., Vachiery, J. L., Grunig, E., Oudiz, R. J., Vonk-Noordegraaf, A., White, R. J., Blair, C., Gillies, H., Miller, K. L., Harris, J. H., Langley, J., Rubin, L. J. 2015. Initial use of ambrisentan plus tadalafil in pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 373, 834–844.
- [9] Sastry, B. K., Narasimhan, C., Reddy, N. K., Raju, B. S. 2004. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, doubleblind, crossover study. *Journal of the American College of Cardiology*, 43 (7), 1149–1153.
- [10] Stewart, D. J., Levy, R. D., Cernacek, P., Langleben, D. 1991. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of Internal Medicine*, 114(6); 464–469.
- [11] Channick, R. N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I. M., Frost, A., Tapson, V. F., Badesch, D. B., Roux, S., Rainisio, M., Bodin, F., Rubin, L. J. 2001. Effects of the dual endothelinreceptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet*, 358(9288), 1119–1123.
- [12] Coward, R. M., Carson, C. C. 2008. Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(6), 1315–1329.

- [13] Dave, V. S., Haware, R. V., Sangave, N. A., Sayles, M., Popielarczyk, M. 2015. Drug-excipient compatibility studies in formulation development: Current trends and techniques. St. John Fisher College Fisher Digital Publications,1, 8-15.
- [14] Chidambaram, M., Krishnasamy, K. 2014. Drug-drug/drug-excipient compatibility studies on curcumin using non-thermal methods. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(3), 309-312.
- [15] McDaid, F. M., Barker, S. A., Fitzpatrick, S., Petts, C. R., Craig, D. Q. M. 2003. Further investigations into the use of high sensitivity differential scanning calorimetry as a means of predicting drug–excipient interactions. *International Journal of Pharmaceutics*, 252(1), 235-240.
- [16] Thomas, V. H., Naath, M. 2008. Design and utilization of the drug–excipient chemical compatibility automated system. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1),150-157.
- [17] Brown, M. E., Antunes, E. M., Glass, B. D., Lebeta, M., Walker, R. B. 1999. DSC screening of potential prochlorperazine-excipient interactions in preformulation studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 56, 1317–1322.
- [18] Pyramides, G., Robinson, J. W., Zito, S. W. 1995. The combined use of DSC and TGA for the thermal analysis of atenolol tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(2), 103–110.
- [19] Giron, D. 1998. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals—Part I. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(5), 191–199.
- [20] Phipps, M. A., Winnike, R. A., Viscomi, F., Long, S. T. 1998. Excipient compatibility assessment by isothermal microcalorimetry. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(59), 9.
- [21] Newman, A. W., Byrn, S. R. 2003. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. *Drug Discovery Today*, 8(19), 898–905.
- [22] Qi, L., Harding, S., Hill, G., Reading, M., Craig, D. Q. M. 2008. The development of microthermal analysis and photothermal microspectroscopy as novel approaches to drug–excipient compatibility studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 354(1–2), 149–157.
- [23] Aigner, Z., Heinrich, R., Sipos, E., Farkas, G., Ciurba, A., Berkesi, O., Szabó-Révész, P. 2011. Compatibility studies of aceclofenac with retard tablet excipients by means of thermal and FT-IR spectroscopic methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104, 265–271.
- [24] Mura, P., Faucci, M. T., Manderioli, A., Bramanti, G., Ceccarelli, L. 1998. Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(1-2), 151–163.
- [25] Botha, S. A., Lotter, A. P. 1990. Compatibility study between Naproxen and tablet excipients using differential scanning calorimetry. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 16(9), 673–683.
- [26] Chadha, R., Bhandari, S. 2014. Drug–excipient compatibility screening—role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 82– 97.
- [27] Uzunović, A., Vranic, E. 2007. Effect of Magnesium stearate concentration on dissolution properties of ranitidine hydrochloride coated tablets. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 7(3), 279-283.
- [28] Boge, L., Västberg, A., Umerska, A., Bysell, H., Eriksson, J., Edwards, K., Millqvist-Fureby, A., Andersson, M. 2018. Freeze-dried and re-hydrated liquid crystalline nanoparticles stabilized with disaccharides for drug-delivery of the plectasin derivative AP114 antimicrobial peptide. *Journal of Colloid and Interface Science* 522, 126–135.
- [29] Thakral, S., Sonje, J., Munjal, B., Bhatnagar, B., Suryanarayanan, R. 2023. Mannitol as an excipient for lyophilized injectable formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 112; 19–35.
- [30] Madejová, J. 2003. FTIR techniques in clay mineral studies. *Vibrational Spectroscopy*, 31(1), 1-10.
- [31] Wakasawa, T., Sano, K., Hirakura, Y., Toyooka, T., Kitamura, S. 2008. Solid-state compatibility studies using a high-throughput and automated forced degradation system. *International Journal of Pharmaceutics*, 355(1-2), 164–173.

- [32] Monajjemzadeh, F., Hassanzadeh, D., Valizadeh, H., Siahi-Shadbad, M. R., Mojarrad, J.S., Robertson, T.A., Roberts, M. S. 2009. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(3), 404–413.
- [33] Wesolowski, M., Rojek, B. J. 2013. Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113, 169-117.
- [34] Yathirajan, H. S., Nagaraj, B., Nagaraja, P., Bolte, M. 2005. Sildenafil citrate monohydrate. *Acta Crystallographica Section E*, 2005(E61), O489-O491.
- [35] Sawatdee, S., Pakawatchai, C., Nitichai, K., Srichana, T., Phetmung, H. 2015. Why sildenafil and sildenafil citrate monohydrate crystals are not stable? *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(5), 504-514.
- [36] Wizek, S., Krochmal, B., Givant A., Diller, D. 2006. U.S. Patent 20060111571 A1 2006.
- [37] Mura, P., Manderioli, A., Bramanti, G., Furlanetto, S., Pinzauti, S. 1995. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. *International Journal of Pharmaceutics*, 119, 71-79.
- [38] Lu, M., Xing, H., Yang, T., Yu, J., Yang, Z., Sun, Y., Ding, P. 2017. Dissolution enhancement of tadalafil by liquid solid technique. *Pharmaceutical Development and Technology* 22(1), 77–89
- [39] Wei, Y., Ling, Y., Su, M., Qin, L., Zhang, J., Gao, Y., Qian, S. 2018. Characterization and stability of amorphous tadalafil and four crystalline polymorphs. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 66, 1114–1121.
- [40] Pani, N. R., Nath, L. K., Acharya, S. 2011. Compatibility studies of nateglinide with excipients in immediate release tablets. *Acta Pharmaceutica*, 61(2), 237-247.
- [41] Manikandan, M., Kannan, K., Manavalan, R. 2013. Compatibility studies of camptothecin with various pharmaceutical excipients used in the development of nanoparticle formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 315-321.

Vitamin B Kompleksinin Fotodinamik Terapiyle Kolon Kanserine Etkisi

Effect of Vitamin B Complex on Colon Cancer by Photodynamic Therapy

Asiye GÖK YURTTAŞ^{1*}, Kamil ÇINAR²

¹ İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, İstanbul, Türkiye

² Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Katıhal Fiziği Anabilimdalı, Kocaeli, Türkiye

Ö Z

Amaç: Kolon kanserleri, hastanın yaşam kalitesini derinden etkileyen ve çeşitli komplikasyonlarla ilişkili kronik ölümcül bir hastalıktır. Vitamin B kompleksi, gıda takviyesi olarak alındığında olumlu anti-inflamatuar etkiler göstermektedir. Bu çalışma, fotodinamik terapiyle lipozomlu vitamin B kompleksinin kolon kanserlerinde (HCT-116 ve HT-29 hücre hattı) anti-kanser etkisini araştırmayı amaçlamıştır.

Materyal- Metot: Çalışmanın birinci basamağını oluşturan Vitamin B kompleksi lipozom ile kapsüle edildi. Lipozomlu vitamin B kompleksi Zetasizer cihazı ile karakterize edildi. Lipozomlu vitamin B kompleksi MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile HCT-116 ve HT-29 hücre hattında % canlılık oranlarına bakılmıştır. Aynı hücre hatlarında vitamin B kompleksinin fotodinamik terapi etkisiyle hangi ölüm yollarını seçtiğini göstermek için de akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Lipozomlu vitamin B kompleksinin boyutları 100 nm ile 200 nm aralığında değiştiği belirlendi. Lipozomlu vitamin B kompleksi (fotosensitizer) 7,5 J/cm² ışık dozunda 0,25 mg/ mL'de karanlık deneyinde HCT-116 hücre canlılık yüzdesi %75 iken ışık deneyi sonrası bu oran %47'lere düşmüştür (****p<0.001). 0,5 mg/mL vitamin B kompleksi çözeltisi için yapılan karanlık deneyinde HT-29 hücre canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran %35'lere düşmüştür (****p<0.001). Arzu edilen fotodinamik etkinlik bu sonuçlara daha yakındır. Hücre ölüm yolları belirleme deneyinde lipozomlanmış vitamin B kompleksinin konsantrasyonu 1mg/mL olarak HCT-116 ve HT-29 hücrelerine uygulanmıştır. HCT-116 hücre hattında %40 oranında apoptoz görülürken HT-29 hücre hattında %60 oranında apoptoz görüldü.

Sonuç: Pazarlanan ilaçları yeniden konumlandırmak, yeni antitümör ilaçları keşfetmek için yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Pazarlanan ilaçlar için yeni kullanım alanlarının geliştirilmesi, yeni anti-tümör ilaçları geliştirmenin etkili ve hızlı yolu olduğu kanıtlanmıştır. Verilerimiz *in-vitro* olarak bazı kolon kanser türlerinde vitamin B kompleksinin fotodinamik terapiyle kullanımının ümit vaat ettiğini savunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik terapi, kolon kanseri, ilaç yeniden konumlandırma, vitamin B kompleksi, lazer

Alınış / Received: 08.11.2022 Kabul / Accepted: 05.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Objective: Colon cancer is a chronic fatal disease that severely affects the quality of life of patients and is associated with various complications. Vitamin B complex shows positive anti-inflammatory effects when taken as a food supplement. The aim of this study was to investigate the anti-cancer effect of vitamin B complex with liposomes in colon cancers (HCT-116 and HT-29 cell lines) using photodynamic therapy.

Material-Method: Vitamin B complex, which is the first step of the study, was encapsulated with liposome. Vitamin B complex with liposome was characterized by Zetasizer device. The MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to determine the % survival rates in HCT-116 and HT-29 cell lines. The same cell lines were also analyzed by flow cytometry to show which death pathways were selected by the vitamin B complex with the effect of photodynamic therapy.

Results: It was found that the dimensions of the vitamin B complex with liposomes varied between 100 nm and 200 nm. Liposomal vitamin B complex (photosensitizer) at 7.5 J/cm² light dose at 0.25 mg/mL in the dark experiment, while the percentage of HCT-116 cell viability was 75%, this rate decreased to 47% after the light experiment (****p <0.001). While the percentage of HT-29 cell viability was 70% in the dark test for 0.5 mg/mL vitamin B complex solution, this rate decreased to 35% after the light test (****p<0.001). The desired photodynamic efficiency is closer to these results. In the cell death pathway assay, the concentration of liposomal vitamin B complex was applied to HCT-116 and HT-29 cells at 1 mg/mL. While 40% apoptosis was observed in the HCT-116 cell line, 60% apoptosis was observed in the HT-29 cell line.

Conclusion: Repositioning of marketed drugs has emerged as a new approach to the discovery of new anti-tumor drugs. The development of new uses for marketed drugs has proven to be an efficient and rapid way to develop new anti-tumor drugs. Our data suggest that the in vitro use of vitamin B complex with photodynamic therapy is promising in some types of colorectal cancer.

Keywords: Photodynamic therapy, colon cancer, drug repositioning, vitamin B complex, laser



1. Giriş

Dünya Sağlık Örgütü, tümör morbidite ve mortalitesinin son yıllarda kademeli olarak artmakta olduğunu bildirmiştir [1]. Bu sebeple, hızla gelişen teknoloji ile anti-tümör ilaçlar için pazar zamanla çok büyük olmaktadır. Geleneksel yöntemleri kullanarak yeni ilaçlar keşfetmek zorlaşmaktadır, bu da yeni ilaç geliştirmenin başarı oranının yıldan yıla düşmesine neden olmaktadır [2]. İlacı yeniden konumlandırma olan pazarlanan ilaçlar için yeni kullanım alanlarının geliştirilmesi, yeni anti-tümör ilaçları geliştirmenin etkili bir yolu olduğu kanıtlanmıştır [3].

Kolon kanseri, dünya çapında ölüme neden olan üçüncü büyük kanser türüdür [4]. Kolorektal kanser (KRK), vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparsa, hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %15'tir [5]. Kanser için mevcut tedaviler radyoterapi, kemoterapi, cerrahi rezeksiyon ve immünoterapidir. Halihazırda mevcut tedaviler, zayıf biyoyararlanım ve ciddi yan etkilere sahip olup, sağlıklı hücreleri öldürmektedir. Bu nedenle, hasta sonuçlarını iyileştirebilecek yeni tedavi stratejilerini belirlemek için KRK başlangıcını ve ilerlemesini yöneten mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşturulması çok önemlidir. Fotodinamik terapi (FDT), minimal invaziv bir tümör tedavi stratejisidir [6, 7]. Hastalara başlangıçta intravenöz olarak, tümör bölgelerinde biriken bir fotosensitizer (FS) (ilaç) uygulanır, ardından tümörü ışınlamak için belirli bir dalga boyunda görünür ışık kullanılır. FS, fotokimyasal

reaksiyon yoluyla singlet oksijen (1O_2) oluşumuyla tümör hücrelerine zarar verir ve onları öldürür. Vitamin B12, folat ve biyotin reseptörleri; akciğer, lösemi, kolon, meme ve böbrek hücre hatlarında daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir [8-10]. Vitamin B kompleksi düşük toksisite, hedef dokuda hızlı ve seçici birikim, kolay sentez ve üretim, 550-670 nm'de güçlü absorpsiyon dalga boyu, cilde neredeyse hiçbir yan etkisi olmayan avantajlarıyla FDT için ileriye dönük bir FS olarak ortaya çıkmaktadır [11,12]. Klinik uygulamada FDT'nin yüksek maliyeti sadece ekipmanın fiyatından değil, aynı zamanda FDT için kullanılan ilaçların yüksek maliyetinden de kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, özellikleri yüksek etkinlik, düşük yan etkiler ve düşük maliyet içermesi gereken yeni ilaçların geliştirilmesi arzu edilmektedir. Bu gereklilikleri takiben, halihazırda varolan bazı organik kimyasallar FDT adayları olarak kullanılmaktadır. Bunlardan biri de 650 nm'de yüksek ışık absorpsiyonuna sahip iyi bilinen bir boya olan metilen mavisidir [13]. Bizde burdan yola çıkarak vitamin B kompleksinin FDT'de etkili ve çeşitli hastalıklara karşı klinik uygulamalar için 1O_2 ve fotodinamik aktivite üretme kabiliyeti gösterebileceğini öngörmekteyiz.

FDT ile ilişkili kanser tedavisinde FS veya ilaçların çözünürlüğü çok önemlidir [14]. Çözünürlükle ilgili temel sorunlar, polimerik nanoparçacıklar [15], lipozomlar [16], miseller [17] ve karbon nanotüpler [18] gibi farklı nanotaşıyıcı sistemler kullanılarak belirgin bir şekilde azaltılmıştır. Bu makalede nanotaşıyıcı sistem olarak lipozomlama teknolojisi kullanılmıştır. Lipozomlanan vitamin B kompleksi herhangi zararlı etkiye uğramadan kolon kanser hücrelerinin membranından kolay bir şekilde geçerek hedefe ulaşmış olacaktır. Bizde bu çalışma ile halihazırda varolan vitamin B kompleksini yeni anti-tümör ilaç olarak yeniden konumlandırmayı hedeflemekteyiz. Vitamin B kompleksi FDT' de FS olarak kullanılarak düşük maliyet ve düşük yan etki sağlanmış olacaktır.

2. Materyal ve Metot

Fotosensitizer ve Işık Kaynağı

Fotosensitizer olarak vitamin B kompleksi (B1:B6:B12), (Cas no:Sigma V2876 68-19-9), ışık kaynağı için merkezi dalga boyu 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot kullanılmıştır. 0,2 cm²'lik bir alanı kapsayan hüzmeye genişliğine sahip olup, hüzmeye profili yaklaşık Gaussian profilindedir. Gaussian ışın profilinin kuyrukları, numuneler üzerindeki maruz kalma acıklılığına ihmal edilebilir katkı nedeniyle hesaplamamızda hariç tutulmuştur. Lazer çıkışı uygulama alanına 5 mW'lık ışık gücü aktarmaktadır. Dozlama süresince (5 dakikada) net 7,5 J/cm² miktarında ışık akısı ilgili örnek yüzeyine aktarılmaktadır [19-21].

Vitamin B Kompleksinin Lipozomlanması

Öncelikle iki ayrı karışım hazırlandı [22].

- Birinci karışım: 3 mg fosfolipit (Lipoid S) etanol (EtOH)'de çözüldü.
- İkinci karışım: %2'lik DMSO/PBS ve Vitamin B kompleksi (stok derişim: 10 mg/mL) hazırlanıp çalkalayıcıda karıştırıldı. Birinci karışımından 10 µL ikinci karışımından da 90 µL alındı ve 15 dakika vortekslandı. Zeta sizer boyut analiz cihazı ile karakterize edildi (Şekil 7).

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışmamız ATCC'den ticari olarak temin edilen HCT-116 ve HT-29 (kolorektal kanser hücre) hatlarında gerçekleştirilmiştir. Bu hücre hatları fotodinamik etkinliğin fazla olan yüzeye yakın kanser türleri olduğu için tercih edilmiştir. Hücreler -80°C'den alınarak hızla çözünmesi sağlandı. Hücrelerin kültür ortamları DMEM (4.5 g/L glukoz, Thermo Fisher Scientific), %10 fetal dana serumu (2x, SIGMA), 100 U/mL penisilin (SIGMA) içinde yapıldı. Çözünen hücreler içerisinde 10 ml DMEM besiyeri bulunan 50 ml'lik tüplere alınarak 1500 rpm (2 819 xg) de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet resüspanse edilerek, besiyeri içeren flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de inkübasyona bırakıldı, hücre çoğalması her gün takip edildi. Hücrelerin besiyeri değişimleri, pH değişimine bağlı olarak üç dört günde bir gerçekleştirildi. Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi. Pasaj sırasında besiyeri flasklardan uzaklaştırıldı, PBS (1x, SIGMA) ile üç kez yıkanan hücreler, flaskın boyutuna göre eklenen tripsin-EDTA (%0.25, SIGMA) ile 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besiyeri ile birlikte 50 ml'lik tüplere toplanan hücreler 1500 rpm (2 819 xg) de 5 dakika santrifüj edildi. Flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, pasajlamada anlatılan şekilde toplanan hücreler, pelletin miktarına göre besiyeri ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µL alındı, 10 µL tripan mavisi ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.

Toma lamı ve lamel arasına boyanan hücrelerden 10 µL konularak ters-faz ışık mikroskopunda 10x büyütmede hücreler sayıldı. Tripan mavisi (MERCK) ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirildi ve ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

Hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılıp, sayıldıktan sonra 10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl besiyeri/kuyu içeren 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve 24 saat 37°C (% 5 CO₂)'de kuyulara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün lipozomlu vitamin B kompleks hazırlanan ana stoklardan 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg/mL olacak şekilde hücrelere uygulandı [20,21]. Bu maddelerin hücre canlılığına olan etkileri incelenmek üzere, ilaç+ışık uygulamasından 24 saatin sonunda MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür, (5 mg/mL, SIGMA)'den 10 µl eklendi. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücre canlılığı spektrofotometre kullanılarak 540 nm'de ölçüldü aşağıdaki formüle göre hesaplandı [23].

$$\text{Canlılık} = (\text{Örnek}_{540\text{nm}} - \text{Blank}_{540\text{nm}}) / (\text{Control}_{540\text{nm}} - \text{Blank}_{540\text{nm}})$$

Akış Sitometrisinde Apoptoz ve Nekroz Tayini

Apoptoz yolağının aktivasyonu sırasında hücre zarında açığa çıkan fosfatidilserinlerin boyanmasını sağlayan Annexin V, FITC konjüğe olduğundan FL1 panelinde görüntülenirken hücre çekirdeğini boyayan 7AAD (7-Aminoactinomisin D), apoptozun geç evresindeki ve nekrotik hücreleri boyayarak FL2 panelinde görüntülenir. Sonuç olarak boyanmayan hücreler canlı, sadece Annexin V ile boyanan hücreler erken apoptotik, her iki boya ile boyanan hücreler geç apoptotik, son olarak sadece 7AAD ile boyanan hücreler ise nekrotik olarak değerlendirilir. Lipozomlanmış vitamin B kompleksi hücre hatlarında (HCT-116 ve HT-29) hangi ölüm yollarını tetiklediği Annexin V/7AAD ile boyanmaları ile belirlendi. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara, 80^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Lipozomlanmış vitamin B kompleksi (1mg/mL) uygulanmasından ve ışık (ışık kaynağı için merkezi dalga boyu 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot kullanılmıştır. 0,2 cm²'lik bir alanı kapsayan hüzmeye genişliğine sahip olup, hüzmeye profili yaklaşık Gaussian profilindedir) ile muamele edildikten sonra 24. saatteki apoptoz ve nekroz oranları akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. Hücreler kuyucuklardan tripsin-EDTA (2x) ile kaldırılıp ependorflara toplandıktan sonra, iki kez soğuk PBS (Fosfat Tamponu, 1x) ile yıkandı. Daha sonra 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilip supernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelletin konsantrasyonu 10^6 hücre/mL olacak şekilde annexinV bağlama tamponu eklendi, içerisinde 100 µL (10^5 hücre) alınıp üzerine 5µl Annexin V, 5µl 7AAD eklendi, tüpler 15 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 400 µl bağlama tamponu eklenen tüpler buza alındı ve akış sitometrisinde analiz gerçekleştirildi.

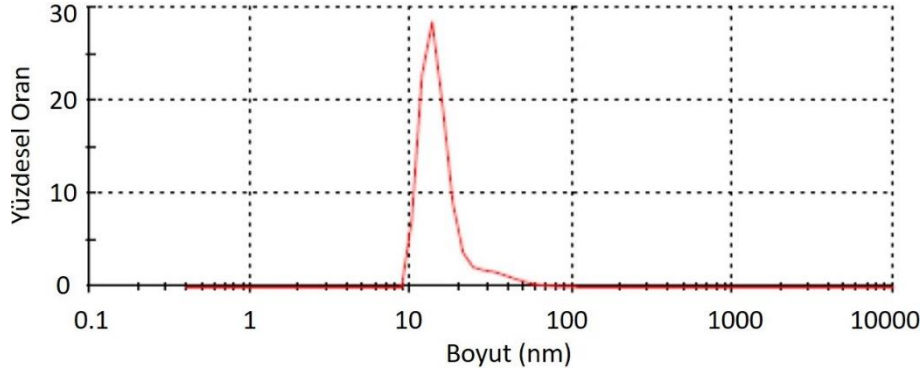
İstatiksel Analiz

İkiden fazla parametrik değişkenin karşılaştırılması İki Yönlü Varyans Analizi (Two-way ANOVA) ile, Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi ise post hoc testi ile yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler % 5 anlamlılık düzeyinde yapıldı ve P <0.05, P <0.01 ve P <0.001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analiz, Graphpad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

3. Bulgular

Vitamin B Kompleksinin Lipozomlanması

Lipozomlanmış vitamin B kompleksinin Zetasizer ile boyutları incelendi. Lipozom boyutlarının 100 nm ile 200 nm aralığında değiştiği belirlendi. Lipozomlanmış vitamin B kompleksi bir filtre yardımıyla süzülerek 100 nm altında olanlar kanserli hücrelere verilmiştir. Böylece vitamin B kompleksi hücre zarından geçebilecek biyouyumlu hal almıştır (Şekil 1).



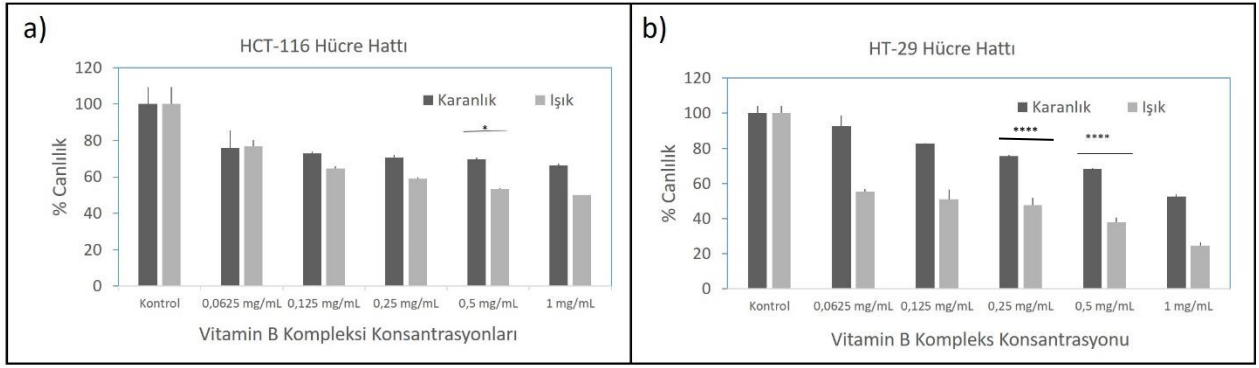
Şekil 1. Vitamin B kompleksinin lipozom partikül boyutta karşılık yüzdesel oranı

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Lipozomlanmış vitamin B kompleksi kanser hücre hatlarında (HCT-116 ve HT-29) hücre canlılığına olan etkileri farklı derişimlerinde MTT testi ile % canlılık kontrolü yapılmıştır. Hücre kültürü ortamında 96 kuyulu plaklar kullanılarak gerçekleştirilen canlılık testinde belirlenen konsantrasyon aralığında, her iki hücre hattında da 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL artan konsantrasyonlarına bağlı olarak karanlık ve ışık deneylerinde canlılığını yitirdiği gözlenmiştir (Şekil 2). Fotodinamik terapinin temel prensiplerinden olan karanlık toksisiteye bakılırken minimal toksik etki göstermesi ışık toksisite de maksimum toksik etki göstermesidir.

HCT-116 hücre hattında karanlık toksisiteden sonra ışık ile muamele edilerek aktif hale getirilmek istenen fotosensitizer (Lipozomlanmış vitamin B kompleksi) lipozomlanarak 96 kuyulu plaklara 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot ile 7,5 J/cm² ışık dozlarına maruz bırakıldı. Daha sonra MTT testi ile % canlılık oranlarına bakıldı. 7,5 J/cm² ışık uygulandığında fotosensitizer 0,0625 mg/mL konsantrasyonunda karanlık ve ışık deney sonuçları arasında anlamlı bir fark görülmezken, 0,5 mg/mL konsantrasyonunda da karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 50'lere düşmüştür (*p<0.05) (Şekil 2). Fotosensitizer 1 mg/mL konsantrasyonunda da karanlık deneyinde canlılık yüzdesi % 65 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 50'lere düşmüştür (*p<0.05). Fotodinamik terapinin temel prensiplerinden olan karanlıkta minimum toksik etki gösterirken ışık deneyinde maksimum bir ölüm gözlenmesidir. Fakat kabul etmeliyiz ki; fotodinamik terapinin etkinliği HCT-116 hücre hattında beklenen etkiyi gösterememiştir.

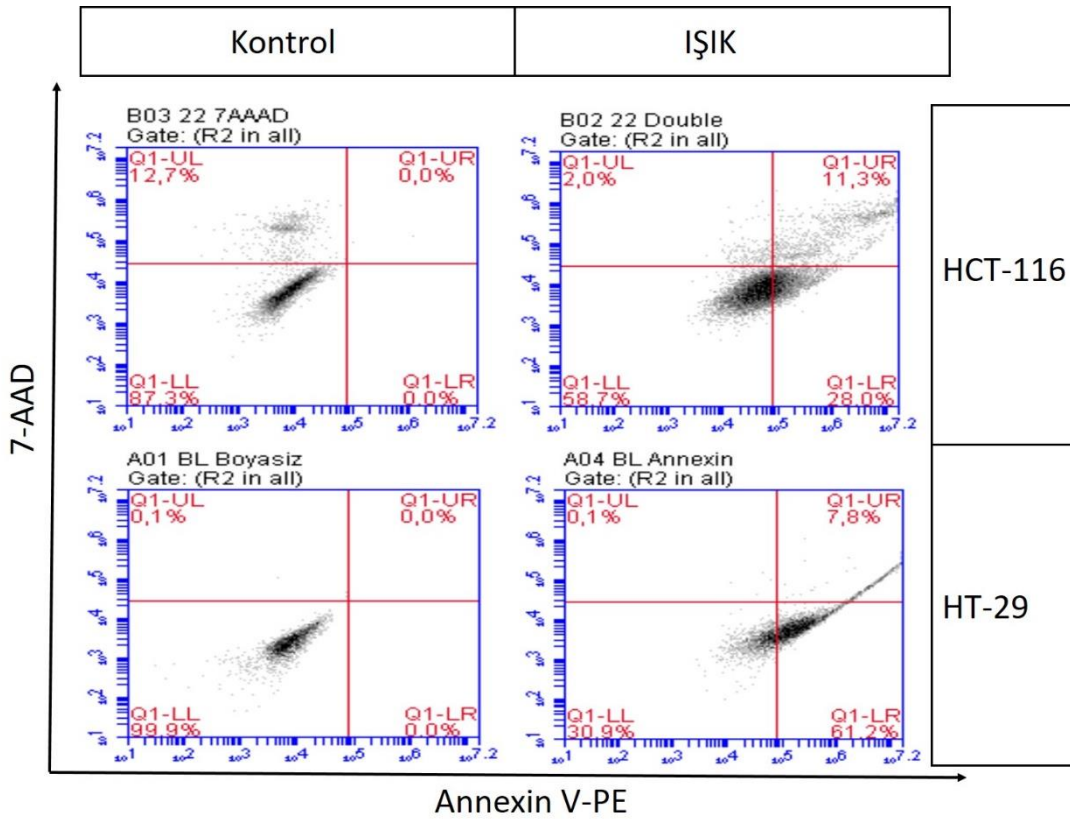
HT-29 hücre hattında karanlık toksisiteden sonra ışık ile muamele edilerek aktif hale getirilmek istenen fotosensitizer (Lipozomlanmış vitamin B kompleksi) lipozomlanarak 96 kuyulu plaklara 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot ile 7,5 J/cm² ışık dozlarına maruz bırakıldı. Daha sonra MTT testi ile % canlılık oranlarına bakıldı. 7,5 J/cm² ışık dozunda, fotosensitizer 0,25 mg/mL konsantrasyonda karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %75 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 47'lere düşmüştür (****p<0.001) (Şekil 2). Aslında bu konsantrasyonda da karanlık ve ışık deney arasında beklenen fark yine yakalanamamıştır. Fakat 0,5 mg/mL'da konsantrasyonda karanlık deneyinde hücrenin canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 35'lere düşmüştür (****p<0.001) (Şekil 2). Fotosensitizer 1 mg/mL'da konsantrasyonda ise karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %50 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 25'lere düşmüştür (****p<0.001). Arzu edilen fotodinamik etkinlik bu sonuçlara daha yakındır. Her iki konsantrasyonda da canlılık yüzdesi yarı yarıya düştüğü hem şekil hem yüzdelere üzerinden de görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Vitamin B kompleksinin a) HCT-116 Hücre Hattı'nın ve b) HT-29 Hücre Hattı'nın karanlık-ışık toksisite sonuçları verilmiştir. HCT-116 hücrelerinde Vitamin B kompleksinin; karanlık 0,5 mg/mL vs ışık 0,5 mg/mL * $p < 0.05$ ve ışık 0,5 mg/mL vs ışık 0,0625 mg/mL *** $p < 0,001$. HT-29 hücrelerinde Vitamin B kompleksinin, ışık 0,0625 mg/mL vs karanlık 0,0625 mg/mL **** $p < 0,001$; ışık 0,25 mg/mL vs karanlık 0,25 mg/mL **** $p < 0,001$; ışık 0,5 mg/mL vs karanlık 0,5 mg/mL **** $p < 0,001$.

Akış Sitometrisinde Apoptoz ve Nekroz Tayini

Lipozomlanmış vitamin B kompleksi (1mg/mL) uygulanmasından ve ışık ile muamele edildikten sonra 24. saatteki apoptoz ve nekroz oranları akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. FDT uygulamasından sonra hücrelerin doza bağlı ölümleri apoptotik açıdan değerlendirildi. Apoptoz deneyinde lipozomlanmış vitamin B kompleksinin konsantrasyonu 1mg/mL olarak hücrelere uygulanmıştır. Lipozomlanmış vitamin B kompleksinin 1mg/mL konsantrasyonları hücre hatlarına (HCT-116 ve HT-29) uygulanmıştır. Her iki hücre hattını etkinlik açısından karşılaştırmak için bu konsantrasyon seçilmiştir. HCT-116 hücre hattında %40 oranında apoptoz görülürken HT-29 hücre hattında %60 oranında apoptoz görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında Vitamin B kompleksinin (1 mg/mL) Annexin-V/7AAD analizi

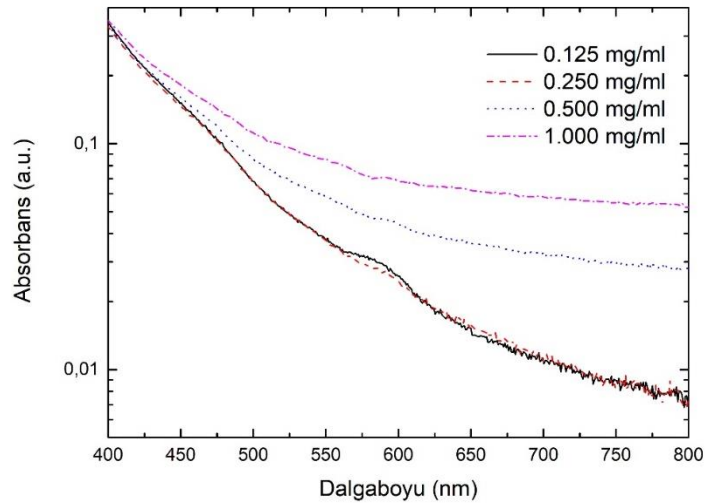
Flow sitometri diyagram, aşağıdaki şekilde tanımlanan dört bölgeye ayrılır: Q1, Q2, Q3 ve Q4 yüzdeleri şu şekilde: nekrotik hücrelerin yüzdesi (Q1: 7AAD/ AnnexinV +/-); geç apoptotik hücrelerin yüzdesi (Q2; 7AAD/ AnnexinV +/-); yaşayabilir hücrelerin yüzdesi (Q3; 7AAD/ AnnexinV -/-) ve erken apoptotik hücrelerin yüzdesi (Q4; 7AAD/ Annexin-V -/+).

Lazer Dozlamaları ve Absorbans

Bu çalışmada ışık deneylerinde 650 nm dalgaboylu sürekli lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazer ışınması dalga-boyu bant genişliği ≈ 3 nm sahip olması aktarılan ışık enerjisinin hücreye aktarılan miktarının kesinlikli olarak hesaplanmasını kolaylaştırmaktadır.

Deneyler sırasında kullanılan vitamin B kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans grafikleri Şekil 4'da gösterilmiştir. Absorbans değerleri göreceli olarak logaritmik ölçekte verilmiştir. Konsantrasyonların artışıyla birlikte absorbans değerlerindeki artış, derişim değerlerindeki artışla doğru orantılı olarak artmaktadır ki bu beklenen bir sonuçtur.

Şekil 4'de 1 mg/mL ve 0.5 mg/mL derişimli B kompleksi için 650 nm dalgaboyunda absorbansı sırasıyla 6 ve 3 katları kadar artış göstermektedir. Bu da ilgili hücrelerin ışık dozlamasında FDT için gerekli enerji miktarının aynı oranlarda artmasına neden olmakta birlikte FDT'nin 650 nm dalgaboyunda etkinliğini artırmaktadır. Kanser hücreleri 650 nm dalgaboyunda $7,5 \text{ J/cm}^2$ enerji ile dozlanan 1 mg/mL ve 0,5 mg/mL vitamin B kompleksi aracılığıyla bu enerjinin sırasıyla %15 ve %10 kadarını bünyelerinde hapsedebilmektedirler. FDT etkinliği bu emilim sayesinde gözlenmektedir.



Şekil 4. Vitamin B kompleksi derişimine göre absorbans grafiği

4. Tartışma ve Sonuç

Modern dünyada kanserin giderek artması, etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini önemli kılmaktadır. Günümüzde modernleşen alışkanlıklar nedeniyle kanser hastaları ve ölüm vakaları hızla artmaktadır [24]. Araştırmacılar kanser hücrelerini kemoterapi, radyoterapi, çoklu ilaç kombinasyonları, hedefleme, immünoterapi, fotodinamik terapi, nanoparçacık hedefleme [25] vb. dahil olmak üzere farklı şekillerde tedavi etmeye odaklanmaktadır. Fotodinamik terapi, normal hücreleri etkilemeden sadece kanserli hücrelere odaklanan, kanser için geleneksel ve gelişmekte olan bir tedavidir. FDT ve nanoteknoloji temelli tedavilerin ve teşhisin bir kombinasyonu kanser için yeni ve etkilidir [26].

Fotodinamik terapi, ışığın sınırlı doku penetrasyonundan dolayı fotodinamik tedavinin etkili olabilmesi için prostat, servikal, özofagus, gastrik ve kolon kanser gibi yüzeysel kanser türlerinden temin edilen hücre hatları üzerinde çalışılmıştır [27]. Diğer kanser türlerinin ışığın sınırlı doku penetrasyonundan ve cerrahi müdahale gerektireceğinden dolayı tercih edilmemiştir. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda yüzeysel kanser hücre hatlarından HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücreleri tercih edilmiştir.

Fotodinamik terapinin temel prensiplerinden olan karanlıkta minimum toksik etki gösterirken ışık deneyinde maksimum bir ölüm gözlenmesidir. İki hücre hattında doğru bir karşılaştırma analizi yapabilmemiz için 0,5 mg/mL konsantrasyon değerlerinde ideal sonuçlar vermiştir. İki hücre hattında fotodinamik etkinliği karşılaştıracak olursak HT-29 hücre hattı, HCT-116 hücre hattına göre fotodinamik inaktivasyon etkinliği daha fazladır.

Bu yüzyılın ilk yıllarından itibaren FDT de klinik olarak kabul gören ftalosiyanimler bazı istenmeyen yan etkilerine rağmen bu bileşiklerle ilgili çalışmalar oldukça günceldir [28,29]. Yüksek toksisite gibi bir sınırlamayı en aza indirmeye yönelik olası bir yaklaşım, biyoyumlu ve fotoaktif bir bileşiğinin bu tedavi yöntemine eklenmesidir. Vitamin B12, DNA sentezi için kofaktör olarak görev yapan iyi kabul görmüş bir ilaç şekli olmuştur. Yakın bir zamanda B12, iyi bilinen terapötik ajanların yerine kullanılabilir ve ışığa duyarlı bir bileşik olarak yeniden piyasaya sürülmüştür [30]. B12 vitamini ile konjüge ftalosiyanimler bir FDT çalışmasında karanlıkta minimum toksisite gösterirken ışıkta maksimum toksisite göstermiştir. Aynı zamanda ftalosiyanimleri daha az konsantrasyonda kullanarak zararlı yan etkilerinden de kaçınılmıştır. Böylece çalışma daha düşük ftalosiyanim konsantrasyonlarında optimum FDT etkinliği ile sonuçlanmıştır [19]. Genel olarak, iki biyolojik ve fotoaktif bileşik (ftalosiyanim ve B12) içeren kombine FDT uygulamaları için ilgi konusu olacağını düşünmekteyim. Bu tür kombinasyonlar, ışığa duyarlı ftalosiyanim vb. bileşiklerin sınırlı seçiciliği ve karanlık toksisitesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olabilir. Bizim kendi çalışmamızda ise zararlı yan etkilere sahip olacak bir bileşik (ftalosiyanim vb.) kullanılmadan sadece Vitamin B kompleksi ile arzu edilen fotodinamik etkinlik gözlenmiştir.

Fotodinamik tedavinin temel prensibinde fotosensitizerler (vitamin B kompleksi) karanlıkta minimal toksisite gösterip ışık ile muamele edildiğinde singlet oksijen oluşturup kanserli hücreleri maksimum seviyede öldürmesidir. Bizim çalışmamızda MTT canlılık verilerini değerlendirecek olursak HCT-116 hücre hattında vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL'de karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran %50'lere düşmüştür (* $p < 0.05$). Vitamin B kompleksinin bu konsantrasyondaki verilerine bakacak olursak fotodinamik terapide arzu edilen bir performans bu hücre hattında görülmemiştir. HT-29 hücre hattında vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL'da karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran %35'lere düşmüştür (**** $p < 0.001$). Bu hücre hattında fotodinamik terapinin temel prensiplerine uygun bir performans görülmektedir. Bu sonuçlar kolon kanserlerinde vitamin B kompleksi kullanılarak fotodinamik terapi yapılabileceğini vaat etmektedir. Bu tedavi yönteminin klinikte de kullanılması için etki mekanizmalarının incelenmesi gereklidir. Akış sitometrisinde ölüm yollarının belirlenmesi için yapılan analizde HT-29 hücre hattında %60 oranında apoptozu seçtiği görülmektedir. HCT-116 hücre hattında ise %40 oranında apoptoz görülmüştür.

Lipozomlar hidrofilik ve hidrofobik bileşiklerin kapsüle edilmesini sağlayan ve ilaç, gıda, kozmetik ve kimya endüstrisinde kullanılan, polar nanoparçacıklardır [31]. Lipit tabakasının temel omurgası fosfolipitlerdir [32]. Lipozomların çapı 20 nm'den 20 000 nm'ye kadar değişebilir [33]. Bizim kendi çalışmamızda hazırladığımız lipozomlarımızın boyutu 100 nm olarak hücre zarından kolaylıkla geçebilecek boyuttadır. Fonksiyonel bileşenlerin lipozomlar içine hapsedilmesinin, ortamla etkileşimini ortadan kaldırdığı, kapsüllenen maddenin stabilitesini artırdığı böylece bozulmasına neden olacak ortamlarda uzun süre aktivitesini koruyabildiği gösterilmiştir [32]. Bu çalışmanın devamı niteliğinde ileri ki çalışmalarda hedeflediğimiz in-vivo deneylerde Vitamin B kompleksi herhangi bir zarara uğramadan kanserli dokuya kolaylıkla ve stabil olarak da ulaşmış olacaktır.

Yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar, B12 vitamini ile doğal olarak oluşan diatomların yüzeyini değiştirerek kanser hücre hatları (HT-29 ve MCF-7)' na karşı artan yapışma özelliklerine sahip yeni bir biyomateryal sentezlenmişlerdir. Sentezlenen biyomateryal sulu ortamda özellikle 5 güne kadar tutulmuş ancak hücre zarında olduğu gibi lipofilik ortamlarda kolayca salındığı gösterilmiştir. Genel olarak, sonuçları, bu tip B12 modifiye diatomların, ilacı vücuda vermeden önce ilgili bölgelerle güçlü bir şekilde etkileşime giren bir mikro mekik görevi görerek, suda çözünmeyen inorganik bileşiklerin tümör dokularına hedefli bir şekilde verilmesini sağlamak için umut verici bir araç olabileceğini göstermektedir [34].

Bizim çalışmamızda ışık deneylerinde sürekli lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazer ışınması dar dalga-boyu bant genişliğine sahip olması aktarılan ışık enerji miktarının kesinlikli olarak hesaplanmasını kolaylaştırmaktadır. Tek yönlü ışınma, kontrollü ışınma dozlarının ayarlanabilmesi ve hedeflenen organizmalara direk hedef odaklı çalışması nedeniyle FDT uygulamaları için çok iyi bir seçenektir [35,36]. Bu çalışmada, lazer ışığının eş zamanlı olarak vitamin B kompleksinin kolon kanser hücre hatlarında FDT etkisine bakılmıştır. İntravenöz yoldan kullanım için, ilacın vücutta birikeceği yeri tam

olarak bilmek ve ardından o bölgeyi lazer ışımaya maruz bırakmak önemlidir. Işığa maruz kalma süresi, vitamin B kompleksi konsantrasyonu ve lazer ışık dozu arasındaki dengenin araştırılması FDT verimliliğinin kontrol edebileceğini göstermektedir [37]. Vitamin B kompleks birikiminin zayıf olduğu perfüze olmayan dokular için, benzer bir terapötik etkiye izin vermek için ışınlama süresi uzatılmalıdır. Kansere hücrelerinde kullanılan ışığın dalga boyunun uzun olması, sağlıklı dokulardaki etkinliği göreceli olarak daha az olması kısa dalga boylu ışımaya göre bir avantajdır. Deneylerde ışık dalgaboyunun 650 nm olarak seçilmesi hücrelerde görece ışık maruziyetini en aza indirerek, kısıtlı ışık emilimiyle FDT uygulamasını gerçekleştirilebilmesi ve hücre ölüm oranlarında artış sağlanması gösterilmiştir. Bu yüzden maruz kalma süresi, hücre ölüm hızı üzerindeki etkilerle gözlemlenebileceği gibi, FDT aktivitesi için esastır.

Lipozumlu vitamin B kompleksinin karanlık ortamda kanser hücre hatlarında zararsız olmasına karşılık 7,5 J/cm² ışık dozunda toksik olmaları tedavide kullanılabileceklerini düşündürmektedir. Seçilen FDT ışık kaynağının dalgaboyu uzadıkça sağlıklı hücreleri etkilemesi o kadar az olacak ve gereksiz ışınlamalardan sağlıklı hücreleri koruyacaktır [38]. Aynı zamanda uzun dalgaboyunda olan ışığın dokularda absorpsiyonu düşük olduğundan dokulara nüfuz etme kabiliyeti giderek artacaktır. Burada vitamin B kompleksinin her ne kadar absorpsiyon değerleri uzun dalgaboylarında düşse de FDT etkinliği oluşturduğunu görmekteyiz. Bu çalışmada ortaya çıkan fotodinamik terapi yöntemiyle vitamin B kompleksinin anti-kanser potansiyeli ile birlikte bu tür etkileri potansiyel bir ilaç olarak yeniden konumlandırmaktadır. Verilerimiz kolon kanseri tedavisinde vitamin B kompleks kullanımını savunmaktadır. Kolon kanserleri tedavisinde vitamin B kompleksinin klinik etkinliğini araştırmak ve ilgili moleküler mekanizmaları doğrulamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışmada bana destek olan Melike Kefeli ve Zeliha Şekerli' ye teşekkür ederim.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. 2017. Cancer statistics 2017. CA Cancer J. Clin. 67 (1), 7–30.
- [2] Yoonjeong, C., Erez, T., Reynolds, I. J., Kumar, D., Jermaine, R., Gregory, K., et al. (2018). Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. Br. J. Pharmacol. 175 (2), 168–180.
- [3] Reddy, A.S., and Zhang, S. 2013. Polypharmacology: drug discovery for the future. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 6 (1), 41–47.
- [4] Lopez-Lazaro, M. What is the main cause of cancer? J. Cancer Stud. Ther. 2016, 1, 1–2.
- [5] Rebecca, L.S.; Kimberly, D.M.; Ahmedin, J. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 2019, 69, 7–34.
- [6] Deng, X., Shao, Z., Zhao, Y. Solutions to the drawbacks of photothermal and photodynamic cancer therapy. Adv Sci. 2021;8(3):2002504.
- [7] Suzuki, T., Tanaka, M., Sasaki, M., Ichikawa, H., Nishie, H., Kataoka, H. Vascularshutdown by photodynamic therapy using talaporfn sodium. Cancers.2020.
- [8] Russell-Jones, G., McTavish, K., McEwan, J., Rice, J., Nowotnik, D. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. J. Inorg. Biochem. 2004, 98, 1625–1633.
- [9] Vadlapudi, A.D., Krishna, R., Pal, D., Mitra, A.K. Molecular expression and functional activity of sodium dependent multivitamin transporter in human prostate cancer cells. Int. J. Pharm. 2012, 436, 324–331.
- [10] Patel, M., Vadlapatla, R.K., Shah, S., Mitra, A.K. Biotin uptake by T47D breast cancer cells: Functional and molecular evidence of sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT). Int. J. Pharm. 2013, 441, 535–543.

- [11] Juzeniene, A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2009, 6, 26630–26637.
- [12] Kamkaew, A., Cheng, L., Goel, S., Valdovinos, V.F., Barnhart, T.E., Liu, Z., Cai, W.B. Cerenkov radiation-induced photodynamic therapy using chlorin e6-loaded hollow mesoporous silica nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 26630–26637.
- [13] Peloi, L.S., Soares, R.R.S., Biondo, C.E.G., Souza, V.R., Hioka, N., Kimura, E. 2008. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue, *Journal of Biosciences.*, 33(2), 231–237.
- [14] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Knap-czop, K., Kotlinska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka, J. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharm.* 2018, 106, 1098–1107.
- [15] Pramualala, S., Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., Bergkvist, M., Jouan-Hureau, V., Arnoux, P., Frochot, C., Barberi-Heyob, M., Niamsiria, N. Polymer-lipid-PEG hybrid nanoparticles as photosensitizer carrier for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2017, 173, 12–22.
- [16] Ghosh, S., Carter, K.A., Lovell, J.F. Liposomal formulations of photosensitizers. *Biomaterials* 2019, 218, 119341.
- [17] Muddineti, O.S., Rompicharla, S.V.K., Kumari, P., Bhatt, H., Ghosh, B., Biswas, S. Lipid and poly (ethylene glycol)-conjugated bi-functionalized chlorine e6 micelles for NIR-light induced photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2020, 29, 101633.
- [18] Marangon, I., Ménard-Moyon, C., Silva, A.K.A., Bianco, A., Luciani, N., Gazeau, F. Synergic mechanisms of photothermal and photodynamic therapies mediated by photosensitizer/carbon nanotube complexes. *Carbon* 2016, 97, 110–123.
- [19] Mantareva, V., Iliev, I., Sulikovska, I., Durmuş, M., Angelov, I. Cobalamin (Vitamin B12) in Anticancer Photodynamic Therapy with Zn(II) Phthalocyanines. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(5):4400.
- [20] Yurtaş, G.A., Çınar K. P. Aeruginosa Bakterisinin Vitamin B Kompleksi ve Kırmızı Lazer Kullanılarak İnaktif Edilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2022; 13(3): 353-363.
- [21] Su, L., Huang, J., Li, H. Chitosan-riboflavin composite film based on photodynamic inactivation technology for antibacterial food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021;172:231-240.
- [22] Yurtaş, G.A., Gökdoğan, K., Hekim, S.N. 2022. Liposomes Loaded with Activatable Disulfide Bridged Photosensitizer: Towards Targeted and Effective Photodynamic Therapy on Breast Cancer Cells. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, Volume 12, Issue 1, 304 -325.
- [23] Birgül, K., Uba, A.İ., Çuhadar, O., Koçyiğit, S.S., Tiryaki, S., Tiber, P.M., Orun, O., Telci, D., Yılmaz, Ö., Kemal Yelekçi, K., Küçükgül, G.K. "Synthesis and molecular modeling of MetAP2 of thiosemicarbazides, 1,2,4-triazoles, thioethers derived from (S)-Naproxen as possible breast cancer agents". *J. Mol. Struct.* 1259 (2022) 132739.
- [24] Pham, T., Bui, L., Kim, G., Hoang, D., Tran, T., Hoang, M. Cancers in Vietnam Burden and Control Efforts: A Narrative Scoping Review. *Cancer Contr.* 2019, 26, 1–14.
- [25] Naidoo, C., Kruger, C.A., Abrahamse, H. Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2018, 17, 1–15.
- [26] Chen, D., Song, M., Huang, J., Chen, N., Xue, J., Huang, M. Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment. *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2020, 13, 2030009.
- [27] O'driscoll, L.; Clynes, M. Biomarkers and multiple drug resistance in breast cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 365–384.
- [28] Jackowska, A., Gryko, D. Vitamin B12 Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates. *Org. Lett.* 2021, 23, 4940–4944.
- [29] Abrahamse, H., Tynga, I. Nano-mediated photodynamic therapy for cancer: Enhancement of cancer specificity and therapeutic effects. *Nanomaterials* 2018, 9, 23, 1–14.

- [30] Choi, Y., Weissleder, R., Tung, C.H. Selective Antitumor Effect of Novel Protease-Mediated Photodynamic Agent. *Cancer Res.* 2006; 66(14), 7225-7229.
- [31] Gibis, M., Vogt, E., Weiss J. Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymercoated liposomes. *Food & Funct.* 2012; 3(3),246-254.
- [32] Oskouei, Z.M, Biçim, G., Yalçın, A.S. C vitamini, E vitamini ve polifenol ekstresi içeren lipozomların eldesi ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması. *Marmara Med J.* 2014; 27, 166-170.
- [33] Kırıl, E., Öztıp, M.H. Liposomes as an Encapsulation Agent for Food Applications: Structure, Characterization, Manufacture and Stability. *Akademik Gıda.* 2014; 12(4) ,41-57.
- [34] Slow-targeted release of a ruthenium anticancer agent from vitamin B 12 functionalized marine diatom microalgae. 2020. Accessed February 25, 2023.
- [35] Chun, J.Y., Choi, M.J., Min, S.G., Weiss, J. Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocoll.* 2013; 30(1), 249-257.
- [36] José, H. Correia, J.H., Rodrigues, J.A., Pimenta, S., Dong, T., Yang, Z., Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* 2021, 13(9), 1332
- [37] De Jode, M.L., Mcgilligan, J.A., Dilkes, M.G., Cameron, I., Hart, P.B., Grahn, M.F. A Comparison of Novel Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers in Medical Science.* 1997, 12:260-268
- [38] Yurttaş, A.G., Sevim, A.M., Çınar, K., Atmaca, G.Y., Erdoğmus, A., Gül, A. The effects of zinc(II)phthalocyanine photosensitizers on biological activities of epitheloid cervix carcinoma cells and precise determination of absorbed fluence at a specific wavelength. *Dyes Pigm.* 2022; 198, 110012

Dişlerdeki Renk Değişimine Dehidratasyon Süresinin Etkisi: Bir İn Vitro Çalışma

The Efficacy of Dehydration Time on Discoloration of Teeth: An In Vitro Study

Günseli KATIRCI ^{1*} 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z

Amaç: Bu in vitro çalışmanın amacı, dehidratasyon süresinin çekilmiş insan dişlerindeki renk değişimine etkisinin bir spektrofotometre kullanılarak belirlenmesidir.

Materyal-Metot: 15 adet çekilmiş insan üst keser dişi kullanıldı. Dişlere ait renk analizi bir spektrofotometre cihazıyla (SpectroShade Micro, MHT, İtalya) gerçekleştirildi. Başlangıç renk ölçümü, diş yüzeyindeki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra yapıldı. 2. ve 3. ölçümler sırasıyla, dişler 1 ve 2 saat kurutulduktan sonra gerçekleştirildi. Tüm ölçümler beyaz ve siyah olmak üzere iki farklı zemin kullanılarak yapıldı. Dişlerin L*, a* ve b* değerleri tespit edildi ve iki ayrı ölçüm aşaması arasında oluşan renk değişim (ΔE) değerleri hesaplandı. Farklı dehidratasyon zamanı arasındaki L*, a*, b* ve ΔE değerleri arasındaki fark karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz, genelleştirilmiş lineer model, Tukey HSD testi, iki yönlü Robust testi ve Bonferroni post-hoc düzeltmesi ile yapıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ idi.

Bulgular: Zaman ana etkisi, L* değerleri üzerinde istatistiksel fark yarattı. Başlangıç L* değerleri ortalaması; dehidratasyondan sonra elde edilen L* değerleri ortalamasından küçük idi ($p < 0,05$, Varyans analizi). Örneklerden, beyaz zeminde elde edilen b* değerlerinin ortalaması; siyah zeminde elde edilen b* değerlerinin ortalamasından daha düşük idi ($p < 0,05$, Varyans analizi). Farklı zaman aralıklarında ve farklı zeminlerde, örneklerden elde edilen ΔE değerleri arasında istatistiksel fark yoktu ($p > 0,05$, Robust testi).

Sonuç: Bu çalışmanın bulgularından, dehidratasyon süresinin dişlerin rengini etkileyebileceği ve dehidratasyondan 1 saat sonra ve daha uzun sürede diş renginin olduğundan daha açık görünebileceği sonucuna ulaşılabilir.

Anahtar Kelimeler: Dehidratasyon, renk, in vitro, estetik

Alınış / Received: 23.11.2022 Kabul / Accepted: 15.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Objective: The aim of this in vitro study was to evaluate the effect of dehydration and dehydration time on discoloration in extracted human teeth using a spectrophotometer.

Material-Method: 15 extracted human maxillary incisor teeth were used. The color analysis of teeth was performed using a dental spectrophotometer (SpectroShade Micro, MHT, Italy). The initial color measurement was conducted after removing excess water. The second and third color measurements were taken after drying teeth for 1 and 2 hours respectively. All measurements were performed with two different backgrounds white and black. The L*, a*, and b* values of samples were determined. Color differences (ΔE) values of samples were calculated at two different time intervals. The difference between L*, a*, b*, and ΔE values at different dehydration times were compared. Statistical analysis was performed with a generalized linear model, Tukey HSD test, two-way Robust test, and Bonferroni post-hoc correction. The significance level was $p < 0.05$ for all tests.

Results: The time main effect created a statistical difference in L* values. The initial L* values were lower than the L* values obtained after dehydration ($p < 0.05$, Anova). The b* values of the samples obtained on white background; were lower than the b* values obtained on black background ($p < 0.05$, Anova). There were no statistical differences between ΔE values in different time intervals and backgrounds ($p > 0.05$, Robust test).

Conclusion: From the findings of this study, it could be concluded that the dehydration time may impact teeth color and teeth turned lighter for 1 hour or longer.

Keywords: Dehydration, color, in vitro, aesthetic



1. Giriş

Son yıllarda toplumlarda, bireysel ağız ve diş bakımının önemine ait farkındalığın oluşması, dental tedaviler ile ilgili beklentilerin, dişlerdeki fonksiyonel eksikleri gidermesinin yanısıra estetik olarak da üstün nitelikte olması yönünde artmasına yol açmıştır [1,2]. Ağız içinde, iyi bir estetik görünüm elde edilebilmesi için, özellikle, anterior bölgede yer alan restorasyonlar, renk ve optik özellikler açısından sağlam diş sert dokularını taklit edebilmelidir. Ancak, doğal diş ile restoratif materyalin renk uyumunun sağlanabilmesi restoratif diş hekimliğinin en güç süreçlerinden biri olarak görülmektedir. Renk uyum süreci, indirekt restorasyonlar için; rengin belirlenmesi, dental laboratuvar ile ilişkinin kurulması ve restorasyon ile diş arasında renk uyumunun yakalanması aşamalarını içermektedir. Ayrıca, bu süreç direkt restorasyon yapımı esnasında, uygun materyalin seçimi ve renginin belirlenmesi ve doğru tekniğin uygulanması aşamalarını da içermektedir. Bu nedenle, diş hekimliği alanında, renk seçimi restoratif prosedürlerin birinci basamağı olarak kabul edilmektedir ve klinisyen tarafından doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir [3,4].

Diş hekimliği pratiğinde renk seçimi; renk skalaları, spektrofotometre, kolorimetre, spektrodijitometre ve dijital görüntü analiz yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır [3]. Renk skalası kullanılarak yapılabilen görsel renk seçim yönteminin, uyguna süresinin kısa olması ve maliyetinin düşük olması gibi avantajlarının olmasına rağmen, subjektif olmak ve yeterli etkinliğe sahip olmamak gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, yöntem ortam aydınlatması, göz yorgunluğu gibi çeşitli faktörlerden etkilenilmektedir [5]. Renk seçiminde görsel yöntemin kullanımı ile oluşabilecek bu dezavantajlar, spektrofotometre ve kolorimetre gibi sofistike cihazların kullanımı ile ortadan kaldırılabilmektedir. Bir spektrofotometre ile, dişten yansıyan ışığın spektral kompozisyonu ve miktarı sayısal olarak

ölçülebilmekte ve kaydedilebilmektedir [6,7]. Güncel diş hekimliğinde, spektrofotometre renk ölçümünde kullanılan en esnek ve güvenilir cihazlardan biri olarak kabul edilmektedir (8). Cihaz yardımıyla veriler kolayca toplanabilmekte birlikte, spektrofotometrenin yüksek maliyeti ve uygulanmasının görsel yöntemlere göre daha komplike olması kullanımının daha çok deneysel araştırmalarla sınırlanmasına yol açmıştır [1,9].

Çoğu dental prosedür dişlerde dehidratasyona, mine dokusunun opasitesinin artmasına, dolayısıyla da dişin olduğundan daha beyaz renkte görünmesine yol açmaktadır. Normal şartlar altında, dişlerde, mine dokusuna ait prizmalar arası boşluk su ile doludur ve ışık bu kristaller arasında dağılabildiği için mine dokusu yarı saydam özelliktedir. Dentin dokusu ise, renk açısından zengindir, koyu ve doygun bir renge sahiptir [3]. Dehidratasyon sırasında, dişlerdeki suyun kaybedilmesi mine prizmaları arasındaki boşluğun su yerine hava ile dolmasına yol açmaktadır [10]. Bu durum, ışığın diş yüzeyinde farklı şekilde kırılmasına, dolayısıyla da mine dokusunun saydamlığının azalıp parlaklığının artmasına neden olmaktadır. Bu şartlarda, dentin dokusunun renginin maskelenmesi dişlerin olduğundan daha açık renkte görünmesine yol açmaktadır [11]. Bu nedenle, diş hekimliğinde renk seçiminin restoratif prosedürlere başlamadan önce yapılması tavsiye edilmektedir [12]. Literatürde, restoratif prosedür esnasında renk seçiminin yapılmasının, diş ile restoratif materyal arasında renk uyumunun sağlanmasını önleyebileceği, sonucunun restorasyonun yenilenmesini gerektirebileceği ve maliyetini arttırabileceği belirtilmiştir [1]. Farklı klinik ve laboratuvar çalışmalarında, dişlerde dehidratasyonun renk değişimine etkisi değerlendirilmiştir ancak, çalışmalara ait sonuçlarda renk değişiminin derecesi açısından farklılıklar ortaya çıktığı tespit edilmiştir [4,12,13,14-15]. Bu in vitro çalışmanın amacı, dehidratasyon süresinin çekilmiş insan dişlerindeki renk değişimine etkisinin bir spektrofotometre kullanılarak belirlenmesidir.

2. Materyal-Metot

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu araştırma protokolünü 'İlaç Dışı Araştırmalar' kategorisinde değerlendirdi ve 26.08.2022 tarih ve 229 sayılı karar ile onayladı.

Örnek Seçimi

Çalışmada kullanılan diş sayısı, G*Power (G*Power Ver. 3.0.10, Almanya) paket programı kullanılarak belirlendi. Çalışmada, %95 güç, $\alpha=0.05$ ve etki büyüklüğü 1,12 alınarak, en az 13 diş yer alması gerektiği belirlendi (1). Olası veri kayıplarının önüne geçebilmek için 2 adet yedek diş eklenerek toplamda, 15 adet diş kullanılarak çalışmanın yapılmasına karar verildi.

Çalışmada, yeni çekilmiş insan üst ön keser dişleri kullanıldı. Çekilmiş diş yüzeylerindeki doku artıkları bir peridontal küret kullanılarak uzaklaştırıldı. Dişlerin temizliği pomza-polisaj lastiği ile sağlandı. Tüm dişlere ait yüzeyler gelişim defekti, çürük lezyonu ve çatlak içerip içermemesi açısından stereomikroskop (S4E, Leice Microsystems, Almanya) kullanılarak X40 büyütmede incelendi. Çalışmada, çürük, demineralizasyon bölgesi, restorasyon içeren dişler ve florozis bulunan dişler yer almadı (Thylstrup ve Fejerskov İndeksi, TFI 0) [16]. Aynı boyut ve yüzey yapısında olduğu gözle belirlenen 15 adet insan dişi, 24 saat süre ile distile su içinde saklandı.

Renk Analizi

Dişlere ait renk analizi bir dental spektrofotometre cihazıyla (SpectroShade Micro, MHT, İtalya) yapıldı. Tekrarlayan ölçümleri standardize etmek için, spektrofotometre cihazına her kullanımdan önce, üretici firmanın önerilerine göre standart kalibrasyon yapıldı. Renk ölçümleri, cihazın kalibrasyonundan sonra, kapısı kapalı olan ve penceresi olmayan bir odada ve bir operatör tarafından gerçekleştirildi. Ölçüm esnasında dişlerin palatinal yüzeyinin yerden yüksekliği 1 cm idi [17]. Renk ölçümleri, spektrofotometre cihazının ölçüm ucu örnek yüzeyine dik açı ile yerleşecek şekilde, her seferinde aynı mesafeden ve dişlerin bukkal yüzeyinin orta noktasından yapıldı. Her örnekten 3 kez spektrofotometre ile görüntü alındı ve örnekler için fotoğraflar spektrofotometre cihazına ait bilgisayar yazılımı kullanılarak (Spectroshade Micro-Software-Version 3.01, MHT, İtalya) açıldı ve tüm fotoğrafların kaydı gerçekleştirildi.

Tüm ölçümler beyaz ve siyah olmak üzere iki farklı zemin üzerinde gerçekleştirildi. Örnekler için renk ölçümü; oda sıcaklığında (23°C) üç aşamada yapıldı. Başlangıç renk ölçümü diş yüzeyindeki fazla su filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra ve 2. ve 3. ölçümler sırasıyla, dişler 1 ve 2 saat oda sıcaklığında

doğal hava ile kurutulduktan sonra yapıldı. Örneklere ait renk analizleri, CIE L*a*b* renk sistemiyle yapıldı. Renk ölçümünden sonra, fotoğraflardan örneklerin, L*, a* ve b* değerleri tespit edildi ve iki ayrı zaman dilimi arasındaki ΔE değerleri hesaplandı. Örneklerin aydınlığını L* parametresi (beyaz-siyah aralığı), kırmızılığını a* parametresi (kırmızı-yeşil renk aralığı), sarılığını b* parametresi (sarı-mavi renk aralığı) temsil etti. ΔE^* ise, iki farklı dehidratasyon zamanı arasındaki renk değişimini gösterdi. Renk değişimi $\Delta E^* = [(L2^* - L1^*)^2 + (a2^* - a1^*)^2 + (b2^* - b1^*)^2]^{1/2}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Veri analizi IBM SPSS (Statistical Package for the social sciences, 23.0) istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk istatistik testi ile incelendi. Zaman ve zemine göre normal dağılılan verilerin karşılaştırılmasında genelleştirilmiş lineer model kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Tukey HSD testiyle yapıldı. Zaman ve zemine göre, normal dağılmayan verilerin karşılaştırılmasında iki yönlü Robust testi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Bonferroni post hoc düzeltmesi ile incelendi. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0,050$ olarak alındı [17,18].

3. Bulgular

Çalışmada yer alan dişlerden başlangıç, dehidratasyondan 1 ve 2 saat sonra elde edilen L*, a* ve b* değerlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 1' de sunulmuştur. Çalışmada zaman ana etkisi, L* değerleri üzerinde istatistiksel fark yarattı ($p=0,005$) (Tablo 2). Örneklere ait başlangıç L* değerleri ortalaması; dehidratasyondan 1 ve 2 saat sonra elde edilen L* değerleri ortalamasından küçük idi. Zaman ana etkisinin, a* ve b* değerleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,007$ ve $p=0,220$) (Tablo 3 ve Tablo 4). Zemin ana etkisi, L* ve a* değerleri üzerinde istatistiksel fark yaratmadı ($p=0,787$ ve $p=0,755$). Ancak, zemin ana etkisi, b* değerleri üzerinde istatistiksel fark yarattı ($p=0,008$) (Tablo 4). Beyaz zeminde dişlerden elde edilen b* değerlerinin ortalaması; siyah zeminde elde edilen b* değerlerinin ortalamasından daha düşük idi ($p=0,008$). Zaman-zemin etkileşiminin, L*, a* ve b* değerleri üzerindeki etkisi, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,824$, $p=0,220$ ve $p=0,412$).

Tablo 1: Farklı zaman ve zeminlerde elde edilen L*, a* ve b* değerlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri ve çoklu karşılaştırması

L* değerleri			
Zaman	Beyaz Zemin Ort±SS	Siyah Zemin Ort±SS	Toplam Ort±SS
Başlangıç	74,91±3,32	74,55±3,09	74,73±3,16 ^b
1 Saat Sonra	76,58±3,31	76,93±2,71	76,76±2,98 ^a
2 Saat Sonra	76,94±2,83	77,66±3,18	77,30±2,98 ^a
Toplam	76,14±3,22	76,38±3,23	76,26±3,21
a* değerleri			
Zaman	Beyaz Zemin Ort±SS	Siyah Zemin Ort±SS	Toplam Ort±SS
Başlangıç	3,26±2,27	2,63±1,22	2,94±1,82
1 Saat Sonra	3,19±1,99	2,62±1,02	2,88±1,58
2 Saat Sonra	3,61±1,22	2,67±1,10	3,14±1,24
Toplam	3,34±1,85	2,64±1,09	2,99±1,55
b* değerleri			
Zaman	Beyaz Zemin Ort±SS	Siyah Zemin Ort±SS	Toplam Ort±SS
Başlangıç	19,20±3,78	16,23±3,08	17,71±3,71
1 Saat Sonra	18,54±4,04	16,17±3,20	17,35±3,78
2 Saat Sonra	16,57±3,16	15,83±3,13	16,20±3,11
Toplam	18,10±3,77	16,08±3,07	17,09±3,57

Varyans analizi, Ort: ortalama, SS: standart sapma, a-b: dikey yönde aynı harfe sahip L* değerleri arasında fark yoktur

Tablo 2: Zaman ve zemine göre L* değerlerinin karşılaştırılmasına ait test istatistiği

	KT	SD	KO	F	p	KEK
Zaman	111,089	2	55,544	5,750	0,005	0,120
Zemin	0,711	1	0,711	0,070	0,787	0,001
Zaman x Zemin	3,756	2	1,878	0,190	0,824	0,005

Varyans analizi, KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler Ortalaması, F: Varyans analizi test istatistiği, KEK: Kısmi eta kare, R²=%12,47, Düzeltilmiş R²=%7,26, koyu renkle gösterilen p<0.05' dür.

Tablo 3: Zaman ve zemine göre a* değerlerinin karşılaştırılmasına ait test istatistiği

	KT	SD	KO	F	p	KEK
Zaman	1,356	2	0,678	0,280	0,755	0,007
Zemin	9,344	1	9,344	3,880	0,052	0,044
Zaman x Zemin	0,022	2	0,011	0,000	0,995	0,000

Varyans analizi, KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler Ortalaması, F: Varyans analizi test istatistiği KEK: Kısmi eta kare, R²=%5,03, Düzeltilmiş R²=%0,00, p>0,05.

Tablo 4: Zaman ve zemine göre b* değerlerinin karşılaştırılmasına ait test istatistiği

	KT	SD	KO	F	p	KEK
Zaman	37,220	2	18,610	1,540	0,220	0,035
Zemin	90,000	1	90,000	7,450	0,008	0,081
Zaman x Zemin	21,670	2	10,830	0,900	0,412	0,021

Varyans analizi, KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler Ortalaması, F: Varyans analizi test istatistiği KEK: Kısmi eta kare, R²=%12,80, Düzeltilmiş R²=%7,61, koyu renkle gösterilen p<0.05' dür.

Tablo 5' de, dehidratasyondan 1 saat ($\Delta E1$) ve 2 saat ($\Delta E2$) sonra, dişlerde gözlenen renk değişim değerlerine ait ortanca, minimum ve maksimum değerleri sunulmuştur. Zaman ve zemin ana etkilerinin ve zaman-zemin etkileşiminin; ΔE değerleri üzerinde, istatistiksel olarak fark yaratmadığı gözlemlendi (p=0,574, p=0,054 ve p=0,096) (Tablo 6). Çalışmada yer alan dişlerde; dehidratasyondan 1 ve 2 saat sonra, farklı zeminlerde oluşan renk değişimlerinin benzer olduğu belirlendi.

Tablo 5: Renk değişim değerlerine (ΔE) ait ortanca, minimum ve maksimum değerleri

ΔE (Renk Değişimi)	Beyaz Zemin Ortanca (Min-Max)	Siyah Zemin Ortanca (Min-Max)	Toplam Ortanca (Min-Max)
$\Delta E1$ (Başlangıç-1 Saat Sonra)	3,47 (2 - 6)	2,8 (2 - 24)	3,1 (2 - 24)
$\Delta E2$ (Başlangıç-2 Saat Sonra)	3,43 (3 - 4)	2,97 (2 - 5)	3,28 (2 - 5)
Toplam	3,43 (2 - 24)	2,67 (1 - 24)	3,08 (1 - 24)

Tablo 6: Zaman ve zemine göre renk değişim değerlerinin (ΔE) karşılaştırılmasına ait test istatistiği

	Test İstatistiği	p*
Zaman	0,556	0,574
Zemin	3,700	0,054
Zaman x Zemin	4,692	0,096

*Robust iki yönlü varyans testi, p>0.05

4. Tartışma

In vitro çalışmalarda, üst ön dişlere ait renk belirleme işlemi esnasında, görsel renk tespit yöntemleri ile karşılaştırıldığında, cihaz kullanılarak yapılan renk tespit metodunun daha hızlı, stabil, sayılabilir ve tekrar edilebilir olduğu rapor edilmiştir [19]. Spektrofotometre cihazının ise, renk tespitinde oldukça başarılı ve güvenilir bir cihaz olduğu bildirilmiştir [20]. Literatürde, Vita Easyshade' i (Vita Zahnfabrik, Almanya) ve SpektroShade' i (MHT, İtalya) içeren spektrofotometre (renk tespit) cihazları kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur [4,12,13-15]. Bir çalışmada, Vita Easyshade renk tespit cihazının tekrarlanabilirlik oranı %96,40 ve doğruluk oranının %80,20 iken, SpektroShade cihazının tekrarlanabilirlik oranının %96,90 ve doğruluk oranının %92,60 olduğu rapor edilmiştir [21]. Ayrıca, bir başka çalışmada, SpektraShade cihazının tekrarlanabilirlik oranının, Vita Easyshade cihazından daha yüksek olduğu bildirilmiştir [22]. Bu nedenle, çalışmamızda dehidratasyon süresinin diş rengine etkisi, SpektraShade renk tespit cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

Diş yüzeylerinde cihaz kullanılarak yapılan renk tespit metodunun çeşitli faktörlerden etkilenebileceği düşünülmektedir. Bu faktörler, renk tespit etme pozisyonu, ortam aydınlatması, dişin bütünlüğü, pulpanın vital olması, diş çürükleri, diş renklenmeleri, dehidratasyon ve cihazın geometrik şekli olarak sayılmaktadır. Ayrıca, diş yüzeyinde oluşmuş olan herhangi bir çürük veya demineralizasyonun dişlerde renk ölçümünü etkileyebileceği bildirilmiştir [15,19]. Bu nedenle, çalışmamızda mine bütünlüğü bozulmamış, kırık, çatlak veya demineralizasyon içermeyen üst ön keser dişler kullanılmıştır.

Literatürde, dehidratasyonun insan dişlerinde dentin dokusunun kırılabilirlik ve dayanıklılığını etkilediği iddia edilmiştir [14,23]. Ancak bir başka çalışmada ise, dehidratasyonun dişlere ait CIELAB değerlerini etkilediği bildirilmiştir. Bir çalışmada, dehidratasyondan sonra L* değerlerinin arttığı ve a* ve b* değerlerinin azaldığı rapor edilmiştir [4]. Burki et al. [12], klinik çalışmalarında dehidratasyondan 10 ve 30 dakika sonra, dişlerdeki L* a* ve b* değerlerinin tümünün değiştiğini, diş renginin açıklığını temsil eden L* değerinin arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarında, bu değişikliğin dehidratasyonun mine dokusunun opasitesinin artmasından dolayı oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, test ettikleri insan dişinde, dehidratasyonun mine prizmaları etrafındaki suyun hava ile yer değiştirmesine yol açabileceğini belirtmişlerdir. Dişlerde, dehidrate mine-hava iç yüzeyinde, mine-su iç yüzeyine oranla, diş yüzeyine gelen ışığa ait kırılma indeksleri arasında daha büyük bir fark oluştuğu ve daha fazla saçılma üretildiği rapor edilmiştir [12,24]. Mine dokusunun translusentliğinin azalmasının ise, yansıtma özelliğinin azalmasına yol açarak, alt tabakadaki dentin dokusunun renginin maskelenmesine sebep olabileceği bildirilmiştir [12,25]. Sonuç olarak dehidratasyondan sonra, diş renginin daha açık bir hale geldiği tespit edilmiştir [4,24]. Du et al. [14] in vitro çalışmalarında, 2 saat süre ile kurutulduktan sonra, dişlere ait L* değerlerinin arttığını ancak, a* ve b* değerlerinin değişmediğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da literatürle benzer şekilde, dehidratasyondan 1 ve 2 saat sonra L* değerlerinde artış olduğu, a* ve b* değerlerinde ise değişim olmadığı gözlenmiştir.

Kolorimetre renk ölçüm cihazı kullanılarak, dehidratasyonun diş rengine etkisinin ölçüldüğü bir in vitro çalışmada, renk ölçümü esnasında dişlerin altında bulunan zeminin renginin siyah, beyaz veya pembe renkte olmasının, diş renk parametreleri üzerinde bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun çalışma yapılan karanlık odada, kullanılan zeminlerin üzerinden cihaza ışık yansımamış olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir [19]. Bir in vivo çalışmada, SpektroShade renk tespit cihazının, kullanım esnasında doğru pozisyonlandırılmasını sağlayan bir ekrana sahip olmasının cihazla yapılan ölçümün doğruluk oranını arttırdığı rapor edilmiştir. Bu sayede, cihaz ile, çapraz-polarize görüntü oluşturulabileceği ve tüm diş yüzeyinin veya dişin gingival, orta ve insizal üçte birinin renk analizinin yapılabileceği belirtilmiştir. Ancak SpektroShade cihazının, renk ölçümü esnasında dişlerin üzerinde bulunduğu zeminin renginin, ölçümü yapılan dişe ait renk parametrelerini büyük ölçüde etkileyebileceği bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmada, renk analizi esnasında rubber-dam kullanılmamıştır [4]. Renk analizi için SpektroShade cihazı kullanıldığımız çalışmamızda, renk ölçümü esnasında kullanılan zeminin siyah veya beyaz olmasının, dişlerden elde edilen L*, a* ve ΔE değerleri üzerinde bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Bu durumun, ölçümün aydınlatma bulunmayan karanlık odada yapılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, zemin renginin dişlere ait b* değerlerini etkilediği ve siyah zeminden elde edilen değerlerin, beyaz zeminden elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum ise, SpektroShade ile renk ölçümü esnasında zemin renginin diş renk parametreleri üzerinde bir miktar etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Literatürde, dişlerde oluşan renk değişiminin gözle görülebilir hale gelmesi için renk değişimine ait sayısal değerlerin 1,5 ve üzerinde ($\Delta E \geq 1,5$) olması gerektiği rapor edilmiştir [19,26]. Hatırlı et al. [4] klinik çalışmalarında, dehidratasyondan 30 dakika sonra dişlerde gözle görülür renk değişimi ($\Delta E=2,81$) oluştuğunu bildirmişlerdir. Suliman et al. [13] ise çalışmalarında, 10 dakika dehidratasyon periyodundan sonra üst keser dişlerde büyük oranda renk değişimi ($\Delta E=5,11$) oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu bulgu, dişlerle ilişkili olarak yapılacak olan herhangi bir renk tespiti işleminin restoratif prosedürlere başlamadan önce yapılması gerektiği iddiasını desteklemiştir [5,12-28]. Ancak, dehidratasyondan 30 dakika sonra renk değişim oranının daha az olduğu ($\Delta E=2,81$) saptanmıştır. Bu durumun, dişlerin içerdiği su miktarından kaynaklanabileceği rapor edilmiştir [24]. Su miktarındaki değişikliklerin ise, çalışmada yer alan katılımcılara ait yaş ortalamasının ve dişlere ait su oranının, bireyler arasında farklılık göstermesine bağlı olabileceği rapor edilmiştir [4,27]. Çalışmamızda da literatürle benzer şekilde, dehidratasyondan 1 saat ($\Delta E1=3,10$) ve 2 saat ($\Delta E2=3,28$) sonra dişlerde çiplak gözle gözlenebilen ve benzer oranda renk değişimi oluştuğu saptanmıştır.

Bu in vitro çalışmanın sınırlamaları arasında, dişlerde dehidratasyon etkisinin uzun zaman aralıkları ile ölçülmesi ve küçük bir örneklem grubunun kullanılması yer almaktadır. Çalışmada yer alan dişlerin, aynı renkte olmaması, farklı yaş, cinsiyet ve etnik grupta bulunan bireylere ait olması gibi spesifik özelliklerinin olmaması da çalışmanın sınırlamaları arasında bulunmaktadır. Daha büyük bir örneklem grubu, aynı etnik köken-yaş grubunda yer alan bireylere ait olan ve benzer renkteki dişler kullanılarak yapılacak bir çalışma ile farklı dehidratasyon zamanında oluşabilecek renk değişimleri daha net bir şekilde ortaya çıkabilir [13]. Ayrıca, çalışmanın diğer sınırlamaları arasında, ağız ortamını tam olarak taklit edemediği düşünülen in vitro koşullarda, çekilmiş ve nemini kaybetmiş dişler kullanılarak gerçekleştirilmesi yer almaktadır [29]. Bu nedenle dehidratasyonun dişler üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için konuyla ilgili çok sayıda klinik araştırmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

5. Sonuç

Çalışmamızda dehidratasyondan 1 ve 2 saat sonra; dişlerde renk değişimi oluştuğu, dişlere ait L* değerlerinin arttığı ve a* ve b* değerlerinin ise değişmediği belirlendi. Bu çalışmanın bulgularından, dehidratasyon süresinin dişlerin rengini etkileyebileceği ve dehidratasyondan sonra dişlerin daha parlak ve açık renk görünebileceği, renk değişimlerinin çiplak gözle fark edilebileceği sonucuna varılabilir [14]. Bu nedenle, hekimler tarafından yapılacak olan renk seçiminin, restoratif prosedürlere başlamadan ve mümkün olduğunca hızlı yapılması gerektiği, diğer bir değişle doğru renk seçiminin diş minesinin dehidratasyon süresi ile ilişkili olabileceği söylenebilir.

Etik Beyanı

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

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu araştırma protokolünü ‘İlaç Dışı Araştırmalar’ kategorisinde değerlendirdi ve 26.08.2022 tarih ve 229 sayılı karar ile onayladı.

Kaynaklar

- [1] Ahmad TY, Almutairi AF, Alomran AS, Alkhayatt MN, Alsulaiman AS, Alohalı YS, Alhamdi AA. 2022. Dehydration time effect on tooth color measurement: An in vitro study. Eur J Dent,13, 1-6.
- [2] Carlsson GE, Johansson A, Johansson AK, Ordell S, Ekbäck G, Unell L. 2008. Attitudes toward dental appearance in 50- and 60-year-old subjects living in Sweden. J Esthet Restor Dent, 20(01), 46–55, discussion 56.
- [3] Joiner A, Luo W. 2017. Tooth color and whiteness: a review. J Dent, 67, 3-10.
- [4] Hatırlı H, Karaaslan ŞE, Yaşa B, Kılıç E, Yaylacı A. 2021. Clinical effects of dehydration on tooth color: How much and how long? J Esthet Restor Dent, 33, 364–370.
- [5] Summitt JB, Robbins JW, Hilton TJ, Schwartz RS, Dos Santos J Jr. 2006. Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach. 2nd, IL: Quintessence Pub. Chicago, 470s.

- [6] Chu SJ, Trushkowsky RD, Paravina RD. 2010. Dental color matching instruments and systems. Review of clinical and research aspects. *J Dent*, 38(Suppl 2), e2–e16.
- [7] Lagouvardos PE, Fougia AG, Diamantopoulou SA, Polyzois GL. 2009. Repeatability and interdevice reliability of two portable color selection devices in matching and measuring tooth color. *J Prosthet Dent*, 101(01), 40–45.
- [8] Paul SJ, Peter A, Rodoni L, Pietrobon N. 2004. Conventional visual vs spectrophotometric shade taking for porcelain-fused-to-metal crowns: a clinical comparison. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 24(03), 222–231.
- [9] Okubo SR, Kanawati A, Richards MW, Childress S. 1998. Evaluation of visual and instrument shade matching. *J Prosthet Dent*, 80 (06), 642–648.
- [10] Brodbelt R, O'brien W, Fan P, Frazer-Dib J, Yu R. 1981. Translucency of human dental enamel. *J Dent Res*, 60(10), 1749-1753.
- [11] Joiner A. 2004. Tooth color: a review of the literature. *J Dent*, 32, 3-12.
- [12] Burki Z, Watkins S, Wilson R, Fenlon M. 2013. A randomized controlled trial to investigate the effects of dehydration on tooth color. *J Dent*, 41(03), 250–257.
- [13] Suliman S, Sulaiman TA, Olafsson VG, Delgado AJ, Donovan TE, Heymann HO. 2019. Effect of time on tooth dehydration and rehydration. *J Esthet Restor Dent*, 31(2), 118-123.
- [14] Du RX, Li YM, Ma JF. 2012. Effect of dehydration time on tooth color measurement in vitro. *Chin J Dent Res*, 15(1), 37-39.
- [15] Russell M, Gulfranz M, Moss B. 2000. In vivo measurement of color changes in natural teeth. *J Oral Rehabil*, 27(9), 786-792.
- [16] Fejerskov O, Larsen MJ, Richards A, Baelum V. Dental tissue effects of fluoride. *Advances in Dental Research*. 1994;8(1):15-31.
- [17] The Jamovi Project. 2022. Jamovi (Version 2.3, Computer Software). <https://www.jamovi.org>, (Erişim tarihi: 02.11.2022).
- [18] R Core Team. 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 4.1). (R packages retrieved from MRAN snapshot 2022-01-01). <https://cran.r-project.org>. (Erişim tarihi: 02.11.2022).
- [19] Ma JF, Du RX, Wang SQ, Li YM. 2010. Effects of Background, Direction and Intensity of Ambient Light, Measuring Position, and Adjacent Teeth, on Anterior Tooth Colour Measurement In Vitro. *Chin J Dent Res*, 13(2), 147-52.
- [20] Borse S, Chaware SH. 2020. Tooth shade analysis and selection in prosthodontics: a systematic review and meta-analysis. *J Indian Prosthodont Soc*, 20(02), 131–140.
- [21] Kim-Pusateri S, Brewer JD, Davis EL, Wee AG. 2009. Reliability and accuracy of four dental shade-matching devices. *J Prosthet Dent*, 101(3), 193-199.
- [22] Khurana R, Tredwin C, Weisbloom M, Moles D. 2007. A clinical evaluation of the individual repeatability of three commercially available color measuring devices. *BDJ Open*, 203(12), 675-680.
- [23] Jamesson MW, Hood JA, Tidmarsh BG. 1993. The effects of dehydration and rehydration on some mechanical properties of human dentine. *J Biomech*, 26(9), 1055-65.
- [24] Brodbelt R, O'brien W, Fan P, Frazer-Dib J, Yu R. 1981. Translucency of human dental enamel. *J Dent Res*, 60(10), 1749-1753.
- [25] Fondriest J. 2003. Shade matching in restorative dentistry: the science and strategies. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 23, 467–480.
- [26] Setz J, Engel E. 1997. In vivo color stability of resin-veneered telescopic dentures: a double blind pilot study. *J Prosthet Dent*, 77(5), 486-491.
- [27] Toto PD, Kastelic EF, Duyvejonck KJ, Rapp GW. 1971. Effect of age on water content in human teeth. *J Dent Res*, 50(5), 1284-1285.

- [28] Roberson T, Heymann HO, Swift EJ Jr. 2006. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry. 4nd, A Harcourt Health Sciences Company, Mosby Inc, St. Louis, 484s.
- [29] Karaman E, Tuncer D, Yazıcı RA, Karahan S, Ertan A. 2015. Farklı adeziv sistemlerin dentine makaslama bağlanma dayanımı: in vitro çalışma. Acta Odontol Turc, 32(3):112-115.

Investigation of Functional Status of Foot/Ankle in Individuals with Rheumatoid Arthritis

Romatoid Artrit'li Bireylerde Ayak/Ayak Bileği ile İlgili Fonksiyonel Durumun İncelenmesi

Elif GÜR KABUL^{1*}, Sinem BOZCUK², Bilge BAŞAKCI ÇALIK², Sinem KURU², Murat YİĞİT³

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

² Pamukkale Üniversitesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Fakültesi, Denizli, Türkiye

³ Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Romatoloji Bilim Dalı, Denizli, Türkiye

ABSTRACT

Objective=The aim of this study was to examine the functional limitations of foot/ankle in terms of age in individuals with Rheumatoid Arthritis (RA).

Material-Method=Forty individuals diagnosed with RA were included in the study. Individuals with RA were divided into two groups (under 65 years old (n:24) and 65 years old and over (n:16)). Functional status of foot/ankle were evaluated with Foot and Ankle Outcome Score (FAOS), general health status with Visual Analogue Scale (VAS), and disability level with Health Assessment Questionnaire (HAQ). FAOS consists of five subtests: pain, other symptoms, activities of daily living, sport and recreational function, and foot/ankle related quality of life. Relationships between continuous variables were evaluated with Pearson Correlation Analysis.

Results=HAQ had low to moderate correlation with FAOS_pain (r:-0.435), FAOS_activities of daily living (r:-0.647), FAOS_sport and recreational function (r:-0.495) and FAOS_total (r:-0.582) in RA with under 65 years old while HAQ had moderate to high correlation with FAOS_other symptoms (r:-0.579), FAOS_pain (r:-0.702), FAOS_activities of daily living (r:-0.868), FAOS_sport and recreational function (r:-0.683) and FAOS_total (r:-0.806) (p<0.05) in RA with 65 years old and over. In addition, VAS had moderate correlation with FAOS_pain (r:-0.517), FAOS_activities of daily living (r:-0.590), FAOS_sport and recreational function (r:-0.550) and FAOS_total (r:-0.587) in RA with 65 years old and over (p<0.05).

Conclusion=Although functional limitations related to foot/ankle affect disability levels of RA of all ages, this effect is greater for RA aged 65 and over. In addition, functional limitations related to foot/ankle cause a worse perception of general health status of RA patients aged 65 and over.

Keywords: Foot, rheumatoid arthritis, ankle

Alınış / Received: 22.02.2023 Kabul / Accepted: 05.06.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Amaç=Bu çalışmanın amacı, Romatoid Artrit (RA)'li bireylerde ayak /ayak bileği ile ilgili fonksiyonel limitasyonların yaş açısından incelenmesi idi.

Materyal-Metot=Çalışmaya RA tanısı almış 40 birey dahil edildi. RA'lı bireyler iki gruba ayrıldı [65 yaş altı (n:24) ve 65 yaş ve üstü (n:16)]. Ayak/ayak bileği ile ilgili fonksiyonel durum Ayak Ayak Bileği Sonuç Skoru (FAOS) ile, genel sağlık durumu Visüel *Analog Skalası* (VAS) ile, özür düzeyi Sağlık Değerlendirme Anketi (SDA) ile değerlendirildi. FAOS beş alt testten oluşmaktadır: ağrı, diğer semptomlar, günlük yaşam aktiviteleri, spor ve eğlence faaliyetleri, ayak/ayak bileği ile ilgili yaşam kalitesi. Sürekli değişkenlerin birbiri ile ilişkisi Pearson Korelasyon Analizi ile değerlendirildi.

Bulgular=65 yaş altı RA'lılarda SDA; FAOS'un ağrı (r:-0.435), iş/günlük yaşam (r:-0.647), iş/spor/eğlence (r:-0.495) ve toplam skoru (r:-0.582) ile düşük ve orta düzeyde korele iken; 65 yaş ve üstü RA'lılarda FAOS'un belirtiler/tutukluk (r:-0.579), ağrı (r:-0.702), iş/günlük yaşam (r:-0.868), iş/spor/eğlence (r:-0.683) ve toplam skoru (r:-0.806) ile orta ve yüksek düzeyde korele idi (p<0,05). Ayrıca 65 yaş ve üstünde VAS; FAOS'un ağrı (r:-0.517), iş/günlük yaşam (r:-0.590), iş/spor/eğlence (r:-0.550) ve toplam skoru (r:-0.587) arasında orta düzeyde ilişkili idi (p<0,05).

Sonuç=Ayak/ayak bileği ile ilgili fonksiyonel limitasyonlar, her yaşta RA'lı bireylerin özür düzeylerini etkilese de; 65 yaş ve üzerinde bu etki daha fazladır. Ayrıca ayak/ayak bileği ile ilgili fonksiyonel limitasyonlar,65 yaş ve üstündeki RA'lılar tarafından genel sağlık durumlarının daha kötü algılanmasına sebep olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ayak, romatoid artrit, ayak bileği



1. Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common rheumatic disease of adulthood [1]. The incidence of RA may increase with age and peaks in the age range of 50-75 years [2].

Functional disorders and complications caused by RA seriously affect the daily life and quality of life of the individual [3]. Joint pain, swelling, and morning stiffness are the most common symptoms among RA patients [4]. Individuals with RA are also affected psychosocially due to reasons such as joint problems, limitations due to morning stiffness, loss of functional work force [5].

Although RA affects every joint in the body, it is most commonly involved in the hand (15.7%) and foot (14.7%) joints [6]. The first problems that come to mind in RA are in the hands and wrists, but 90% of long-term RA patients also have foot problems [7]. The first symptoms in 16-36% of RA patients begin in the foot area [8]. Pain and structural deformities related foot are the most common complaints of patients with RA. Foot-related complaints may develop at any stage of the disease and as the disease progresses, the frequency of foot involvement increases in individuals with RA [9,10]. Inflammation of the foot joints and synovial tissues causes joint damage and structural deformities. Wickman, in 2004, reported that serious negative effects on functionality, mobility in daily life and functional capacity began to be seen with RA starting to affect the foot [11].

The hand involvement and functions of individuals with RA have been frequently investigated in detail in the studies in the literature. However, the effect of foot problems seen in individuals with RA on

functionality and activities of daily living has been less studied. In recent years, the tendency towards foot/ankle problems in individuals with RA is increasing [11-13]. The foot problems seen in these patients create a great burden for the patients [14].

This study was planned to examine the functional limitations of foot/ankle involvement in terms of age in individuals with RA.

2. Material and Method

The study was planned as cross-sectional. The sample of the study consisted of individuals with RA who applied to Pamukkale University Rheumatology Clinic between 15.11.2021 and 15.05.2022 and met the inclusion and exclusion criteria.

Participants

Forty RA patients were included in the study and were divided into two groups [under 65 years old (n:24) and 65 years old and over (n:16)] Inclusion criteria: (a) Being diagnosed with RA according to the 2010 American College of Rheumatology/EULAR criteria. (b) being 18 years or older. (c) Volunteer to participate in the study. Exclusion criteria: (a) serious psychiatric conditions (eg psychotic disorders). (b) have a surgery within the past year. (c) Cognitive inability to cooperate (d) Being pregnant. (e) Concurrent autoimmune or inflammatory disease. (f) having central nervous system diseases (eg multiple sclerosis, parkinson's disease).

Confirmation that there is no ethical problem for this study was obtained from the local Clinical Research Ethics Committee (meeting dated 02.11.2021 and numbered 20). Verbal information was given to all individuals and an informed consent form was signed.

Evaluations

All evaluations were performed by the same researcher in a single session with face-to-face interview method in approximately 40-45 minutes. After obtaining demographic data, functional status of the foot/ankle were evaluated with the Foot and Ankle Outcome Score (FAOS), general health status with the Visual Analogue Scale (VAS), and disability level with the Health Assessment Questionnaire (HAQ).

Foot and Ankle Outcome Score (FAOS): FAOS is used to examine functional conditions related to the foot/ankle in individuals with 42 items and five subtests: pain (9 item), other symptoms (7 item), activities of daily living (17 item), sport and recreational function (5 item), and foot/ankle related quality of life (4 item). Scoring is done for each subtest and the scoring of each subtest is calculated out of 100. The higher the score on FAOS, the less functional limitations [15].

Visual Analogue Scale (VAS): VAS is used to convert the values that cannot be measured numerically by writing the evaluation parameters at both ends of a 10 cm line. The patient place a dot or pointing at the appropriate place for his/her condition on this line. VAS was used to evaluate the general health status of RA (0='best health condition', 10='worst health condition') in this study [16].

Health Assessment Questionnaire (HAQ): HAQ is used to evaluate the disability level. HAQ consists of 20 questions and eight subsections. Scoring is done between 0 and 3. Higher score means more disability [17].

Statistical Analysis

The data were analyzed with the IBM SPSS Statistics 22 package program. Continuous variables were given as mean \pm standard deviation and median (minimum/maximum) and categorical variables were given as numbers and percentages. Relationships between continuous variables were evaluated with Pearson Correlation Analysis. Correlation was categorized as low (r:0.100-0.499), moderate (r:0.50-0.69) or high (r:0.70-1.00) [18]. Statistical significance value was accepted as $p < 0.05$.

3. Results

Demographic and disease-related data of RA included in the study are shown in Table 1.

HAQ had negative low to moderate correlation with FAOS_pain ($r=-0.435$, $p=0.038$), FAOS_activities of daily living ($r=-0.647$, $p=0.001$), FAOS_sport and recreational function ($r=-0.495$, $p=0.016$) and FAOS_total ($r=-0.582$, $p=0.004$) in RA with under 65 years old whereas HAQ had negative moderate to high correlation with FAOS_other symptoms ($r=-0.579$, $p=0.024$), FAOS_pain ($r=-0.702$, $p=0.003$), FAOS_activities of daily living ($r=-0.868$, $p=0.000$), FAOS_sport and recreational function ($r=-0.683$, $p=0.005$) and FAOS_total ($r=-0.806$, $p=0.000$) in RA with 65 years old and over (Table 2).

In addition, VAS had no correlation with any of FAOS_subtests and FAOS_total in RA with under 65 years old ($p>0.05$) while VAS had negative moderate correlation with FAOS_pain ($r=-0.517$, $p=0.040$), FAOS_activities of daily living ($r=-0.590$, $p=0.016$), FAOS_sport and recreational function ($r=-0.550$, $p=0.027$) and FAOS_total ($r=-0.587$, $p=0.017$) in RA with 65 years old and over (Table 2).

Table 1: Demographic and descriptive data of individuals with rheumatoid arthritis

	Under 65 years old (n=24)		65 years old and over (n=16)	
	Mean±SD	Median(Min/Max)	Mean±SD	Median (Min/Max)
Age (years)	49.29±11.50	54.50 (21/63)	69.62±4.68	69.50 (65/80)
Height (m)	1.61±0.08	1.60 (1.47/1.78)	1.57±0.06	1.58 (1.50/1.70)
Body weight (kg)	74.56±14.01	70.50 (49/100)	69.84±7.15	70 (56/82)
BMI (kg/m ²)	28.15±5.29	27.97 (19.14/40)	28.67±4.15	28.89 (20.57/35.56)
Morning stiffness (min)	62.30±81.28	30 (0/300)	52.85±81.47	17.50 (0/240)
FAOS_other symptoms	74.08±21.19	80.50 (21/100)	71.87±23.99	82 (36/100)
FAOS_pain	72.16±19.78	76.50 (31/97)	72.81±21.78	79 (39/100)
FAOS_activities of daily living	76.00±19.10	80 (43/100)	70.68±25.99	79 (26/100)
FAOS_sport and recreational function	50.62±35.94	50 (0/100)	44.37±36.14	30 (0/95)
FAOS_foot and ankle related quality of life	57.66±29.74	56 (0/100)	56.37±27.74	47 (19/100)
FAOS_total	70.08±20.00	70 (33/98)	66.81±23.63	76.50 (27/96)
HAQ	1.04±0.74	1 (0/2.38)	1.10±0.90	0.62 (0/2.75)
VAS	5.29±2.14	5 (1.50/10)	5.07±1.90	4.95 (2.20/10)
Gender-Women n (%)	21 (87.5)		14 (87.5)	
-Men n (%)	3 (12.5)		2 (12.5)	

BMI=Body Mass Index. m:meter. kg:kilogram. min:minutes. SD: standard deviation. FAOS: Foot and Ankle Outcome Score. HAQ: Health Assessment Questionnaire. VAS: Visual Analogue Scale

Table 2: Correlation analysis results

	Under 65 years old				65 years old and over			
	HAQ		VAS		HAQ		VAS	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FAOS_other symptoms	-0.365	0.087	-0.311	0.139	-0.579	0.024	-0.477	0.062
FAOS_pain	-0.435	0.038	-0.266	0.208	-0.702	0.003	-0.517	0.040
FAOS_activities of daily living	-0.647	0.001	-0.271	0.200	-0.868	0.000	-0.590	0.016
FAOS_sport and recreational function	-0.495	0.016	-0.215	0.313	-0.683	0.005	-0.550	0.027
FAOS_foot and ankle related quality of life	-0.411	0.051	-0.221	0.299	-0.453	0.090	-0.342	0.194
FAOS_total	-0.582	0.004	-0.297	0.159	-0.806	0.000	-0.587	0.017

Pearson Correlation Analysis, FAOS: Foot and Ankle Outcome Score. HAQ: Health Assessment Questionnaire. VAS: Visual Analogue Scale

4. Discussion and Conclusion

This study showed that functional problems related to the foot/ankle affect the disability levels of RA of all ages. This effect is greater for RA aged 65 and over. In addition, functional problems related to the foot/ankle cause a worse perception of general health status of RA patients aged 65 and over.

From the onset of the disease, RA negatively affects individuals in many ways. Foot/ankle complaints are frequent in patients with RA and cause serious disability and limitation in daily life activities [19]. The problems experienced by RA can also affect their family, professional and social relationships [20,21]. This causes additional burdens for individuals who are already suffering from the disease.

Stolt et al. (2017), in their review, aimed to define the foot health of patients with RA and to determine how they care for their feet. They determined that foot/ankle problems have a high prevalence in patients with RA (especially pain and structural deformities). These foot problems are a big burden for patients. RA have difficulty taking care of their own feet and finding suitable shoes. The self-care abilities of RA patients may decrease. They also stated that future studies are needed for accuracy across cultures [14].

Yano et al. (2018) examined 5637 individuals with RA and concluded that clinicians should pay more attention to the foot/ankle joints of individuals with RA in daily practice [22].

Reinoso-Cobo et al. (2020), which they conducted with 229 RA and 73 healthy controls, reported that the presence of RA was associated with high pain score and the physical component of quality of life of advanced age and that the morphological and structural features of the foot were not necessarily associated with pain, disability and loss of function [23]. Faza et al. (2022) concluded that foot pain is common in RA patients (especially in the forefoot). There is a relationship between functional foot index and disability level (HAQ) and foot pain. And it can have significant effects on the quality of life. In addition, the feet need to be carefully examined and their functional effects evaluated [24].

Stating that studies focusing on foot problems in RA were mostly conducted in the adult population and there was insufficient evidence in the elderly population, Stolt et al. evaluated foot health in RA patients over 65 years of age with a mean age of 74 years in 2021. While they found the most common complaints as foot pain, dry skin and thickened toenails, they determined common structural complaints are foot deformities. They emphasized the relationship between daily walking or standing time and using walking or running shoes with the level of foot health. Foot problems limit patients' ability to perform daily activities. Because elderly with RA live with complex foot problems, they need health services related to foot problems. There is also need to develop and implement care practices to relieve foot pain and support foot health and functional ability in elderly with RA [25]. Parallel to current studies, our study

once again emphasized the negative effects of foot/ankle problems in individuals with RA and revealed that these problems increase with increasing age. In the light of these results, we recommend that more attention should be paid to foot/ankle problems in order to change the general perceptions of individuals with RA in a positive way.

Katarzyna et al. examined the relationship between static foot dysfunction assessed by plantoconturography and quality of life in 102 elderly patients with RA in remission. They found a relationship between static foot dysfunction and physical activity domain and emotional domain of quality of life in patients with RA [26]. Based on this result, we see that foot/ankle problems affect the psychosocial parameters of the person, and we think how important and necessary are the intervention methods for foot/ankle problems.

In parallel with the literature, in this study, we observed that the functional problems related to the foot/ankles of RA in all ages were associated with the level of disability, and this relationship was even stronger at the age of 65 and over. In addition to these, functional limitations related to the foot/ankle negatively affect the perspective of patients with RA on their health status and cause them to perceive their health worse at the age of 65 and over. Descriptive data show that RA patients with under 65 years old are exposed to morning stiffness for a longer time. Morning stiffness may be the cause of the association between foot/ankle functional problems and disability in this age group. Studies have reported that morning stiffness is associated with impaired morning function and functional disability [27,28].

The reason why the effects of RA are seen more intensely at the age of 65 and over may be due to the more severe damage caused by the disease in this age group, the greater physical and psychological exposure due to longer exposure to the disease, and/or the greater feeling of psychological vulnerability in this age group. Also, another reason may be problems in the musculoskeletal system. The immune system becomes non-specifically active with age, increasing inflammation and comorbidities. In individuals with RA, this occurs more rapidly and more intensely. [29]. Systemic inflammation accelerates age-related sarcopenia. Compared to healthy controls in their age group, elderly RAs have greater loss of muscle mass, muscle strength, and physical loss. [30].

The strength of the study is that it is possible to simultaneously access the evaluation results of individuals with RA, both under the age of 65 and the aged 65 and over. The other strength of the study is that the variables that could affect RA symptoms such as gender and BMI were similar between the groups. The limitation of the study is the failure to examine the relationship between subjective results and objective results by examining the structural changes in the foot/ankle with radiography.

Further studies can be planned longitudinally to investigate the effects of treatment/physiotherapy methods on foot/ankle function in patients with RA. In addition, we recommend that the biological, psychological and social effects of foot care education can be investigated by applying to RA patients of all ages, especially aged 65 and over.

As a result, although functional limitations related to the foot/ankle in individuals with RA affect the disability levels of individuals of all ages, this effect is greater for RA aged 65 and over and cause worse perception of their general health. For this reason, patient education including information about preventive foot/ankle problems, foot care, shoe selection and appropriate exercise approaches is important in the management of the disease in order to reduce the disability levels of individuals with RA and to change their perceptions about the disease in a positive way. In addition, more attention should be paid to foot/ankle care practices for all ages, especially aged 65 and over. Also, increasing the clinical skills of physiotherapists working in this field will contribute to minimizing the functional losses associated with foot/ankle involvement caused by RA.

Declaration of Ethical Code

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

Confirmation that there is no ethical problem for this study was obtained from the local Clinical Research Ethics Committee (meeting dated 02.11.2021 and numbered 20).

References

- [1] Symmons, D.P.M. 2002. Epidemiology of rheumatoid arthritis: Determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16(5), 707-22.
- [2] [Crowson, C.S., Matteson, E.L., Myasoedova, E., Michet, C.J., Ernste, F.C., Warrington, K.J., et al. 2011. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 63(3), 633-9.
- [3] Walker, R., Wong, F., Singh, S., Ajuied, A. 2019. The foot in systemic disease: management of the patient with rheumatoid arthritis or diabetes mellitus. *Orthopedics and Trauma*, 33(4), 249-62.
- [4] Harris, E.D., Firestein, G.S. 2009. Clinical features of rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Kelley WN. *Kelley's textbook of rheumatology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 1087-1118.
- [5] Yalman, A., Şen, E., Eskiuyurt, N., Budiman-Mak, E. 2014. Turkish Translation and Adaptation of Foot Function Index in Patients with Plantar Fasciitis. *Turk J Phys Med Rehab*, 60, 212-22
- [6] Baysal, Ö., Baysal, T., Altay, Z., Akyol, G. 2004. Foot Deformities in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 11(3), 173-176
- [7] Matsumo, T., Nakada, I., Juji, T., Nakamuro, I., Ito, K. 2016. Radiologic Patterning of Hallux Deformity in Rheumatoid Arthritis and Its Relationship to Flatfoot. *J Foot Ankle Surg*, 55: 948-954.
- [8] Bek, N., Kavlak, Y., Yağlı, V.N. 2006. Evaluation of foot deformities in women with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Fizyoter Rehabil*, 17(2), 70-77
- [9] Woodburn, J., Helliwell, PS. 1997. Foot problems in rheumatology. *Br J Rheumatol*, 36, 932–6.
- [10] van der Leeden, M., Steultjens, M., Dekker, J.H., Prins, A.P., Dekker, J. 2007. The relationship of disease duration to foot function, pain and disability in rheumatoid arthritis patients with foot complaints. *Clin Exp Rheumatol*, 25, 275–80.
- [11] Wickman, A.M., Pinzur, M.S., Kadanoff, R., Juknelis, D. 2004. Health-related quality of life for patients with rheumatoid arthritis foot involvement. *Foot Ankle Int*, 25(1), 19-26.
- [12] [Turner, D.E., Helliwell, P.S., Emery, P., Woodburn, J. 2006. The impact of rheumatoid arthritis on foot function in the early stages of disease: a clinical case series. *BMC Musculoskelet Disord*, 7, 102.
- [13] Karatepe, G.A., Günaydin, R., Adibelli, Z.H., Kaya, T., Duruöz, E. 2010. Foot deformities in patients with rheumatoid arthritis: the relationship with foot functions. *Int J Rheum Dis*, 13(2), 158-63.
- [14] Stolt, M., Suhonen, R., Leino-Kilpi, H. 2017. Foot health in patients with rheumatoid arthritis-a scoping review. *Rheumatol Int*, 37(9), 1413-1422.
- [15] Roos, E.M., Brandsson, M.D., Karlsson, J. 2001. Validation of the foot and ankle outcome score. *Foot Ankle Int*, 22, 788–794.
- [16] Wewers, M.E., Lowe, N.K. 1990. A critical review of visual analogue scales in the measurement of clinical phenomena. *Res Nurs Health*, 13, 227-236.
- [17] Fries, J.F., Spitz, P.W., Young, D.Y. 1982. The dimensions of health outcomes: the health assessment questionnaire, disability and pain scales. *J Rheumatol*, 9(5), 789-93.
- [18] Cohen, J., Cohen, P., West, S.G., Aiken, L.S. 2013. *Applied multiple regression/ correlation analysis for the behavioral sciences*. Routledge.
- [19] Wilson, O., Hewlett, S., Woodburn, J., Pollock, J., Kirwan, J. 2017. Prevalence, impact and care of foot problems in people with rheumatoid arthritis: results from a United Kingdom based cross-sectional survey. *J Foot Ankle Res*, 10, 46.
- [20] Katz, P.P. 1995. The impact of rheumatoid arthritis on life activities. *Arthritis Care Res*, 8(4), 272-8.

- [21] Griffith, J., Carr, A. 2001. What is the impact of early rheumatoid arthritis on the individual? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 15(1), 77-90.
- [22] Yano, K., Ikari, K., Inoue, E., Sakuma, Y., Mochizuki, T., Koenuma, N., et al. 2018. Features of patients with rheumatoid arthritis whose debut joint is a foot or ankle joint: A 5,479-case study from the IORRA cohort. *PLoS One*, 13(9), e0202427.
- [23] Reinoso-Cobo, A., Gijon-Nogueron, G., Caliz-Caliz, R., Ferrer-Gonzalez, M.A., Vallejo-Velazquez, M.T., Morales-Asencio, M.J., et al. 2020. Foot health and quality of life in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 10(5), e036903.
- [24] Fazaa, A., Triki, W., Ouenniche, K., Sellami, M., Miladi, S., Souabni, L., et al. 2022. Assessment of the functional impact of foot involvement in patients with rheumatoid arthritis. *Foot (Edinb)*, 52, 101907.
- [25] Stolt, M., Kilkki, M., Katajisto, J., Suhonen, R. 2021. Self-assessed foot health in older people with rheumatoid arthritis-A cross-sectional study. *Int J Older People Nurs*, 16(4), e12380.
- [26] Kaniewska, K., Kuryliszyn-Moskal, A., Hryniewicz, A., Moskal-Jasińska, D., Wojciuk, M., Dziecioł-Anikiej, Z. 2022. Static Foot Disturbances and the Quality of Life of Older Person with Rheumatoid Arthritis. *Int J Environ Res Public Health*, 19(14), 8633.
- [27] Khan, N.A., Yazici, Y., Calvo-Alen, J., Dadoniene, J., Gossec, L., Hansen, T.M., et al. 2009. Reevaluation of the role of duration of morning stiffness in the assessment of rheumatoid arthritis activity. *J Rheumatol*, 36, 2435-42.
- [28] Yazici, Y., Pincus, T., Kautiainen, H., Sokka, T. 2004. Morningstiffness in patients with early rheumatoid arthritis is associated more strongly with functional disability than with joint swelling and erythrocyte sedimentation rate. *J Rheumatol*, 31, 1723-6.
- [29] Lindstrom, T., Robinson, W. 2010. Rheumatoid arthritis: A role for immunosenescence? *J Am Geriatr Soc*, 58, 1565-75.
- [30] Baker, J.F., Von Feldt, J., Mostouf-Moab, S., Noaiseh, G., Taratuta, E., Kim, W., et al. 2014. Deficits in muscle mass, muscle density, and modified associations with fat in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*, 66, 1612-1618.

Comparison of the plaque removal efficacy of chewable, electric, and manual toothbrushes: A randomized clinical trial

Çiğnenebilir, elektrikli ve manuel diş fırçalarının plak uzaklaştırma etkinliklerinin karşılaştırılması: Randomize klinik çalışma

Tuğba YİĞİT ^{1*}, Fatih KARAASLAN ², Umut YİĞİT ², Ahu DİKİLİTAŞ ²

¹ Usak University, Faculty of Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, Usak, Turkey

² Usak University, Faculty of Dentistry, Department of Periodontology, Usak, Turkey

ABSTRACT

Objective: A comparative evaluation of the plaque removal efficacy of manual, electric, and chewable toothbrushes.

Material-Method: Our randomized and examiner-blinded clinical study involved 90 dental students. The students were divided into three groups: manual, electric, and chewable toothbrush users. The plaque removal efficiency of the brushes was evaluated using the Turesky modification of the Quigley–Hein Index (TMQHI).

Results: Ninety participants, consisting of 32 males and 58 females, aged between 21 and 23 years (average age 22 ± 0.47) were included in the study. The mean TMQHI score before brushing was 2.4 ± 0.49 in the manual brushing group, 1.81 ± 0.61 in the electric toothbrush group, and 1.93 ± 0.6 in the chewable brush group. The mean for the manual brushing group was thus higher than that of the other two groups ($p<0.001$). The mean TMQHI score after brushing was 1.37 ± 0.43 in the manual brushing group, 0.91 ± 0.52 in the electric toothbrush group, and 1.31 ± 0.67 in the chewable brush group. The effectiveness of the chewable brush in plaque removal in all regions of the mouth was lower than that of the other two ($p<0.001$). There was no statistical difference between the manual and electric toothbrushes.

Conclusion: The plaque removal efficiency of the chewable toothbrush was found to be lower than that of the electric and manual toothbrushes.

Keywords: Chewable toothbrush, dental plaque, electric toothbrush, manual toothbrush.

Alınış / Received: 09.04.2023 Kabul / Accepted: 07.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Amaç: Manuel, elektrikli ve çiğnenebilir diş fırçalarının plak uzaklaştırma etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

Materyal- Metot: Randomize ve araştırmacı-kör klinik çalışmamıza 90 diş hekimliği öğrencisi dahil edildi. Öğrenciler manuel, elektrikli ve çiğnenebilir diş fırçası kullananlar olarak 3 gruba ayrıldı. Fırçaların plak uzaklaştırma etkinliği, Quigley-Hein İndeksinin Turesky modifikasyonu (TMQHI) kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Yaşları 21-23 arasında (ortalama yaş $22\pm 0,47$), 32 erkek ve 58 kadın olmak üzere 90 katılımcı çalışmaya dahil edildi. Fırçalama öncesi ortalama TMQHI skoru manuel diş fırçası grubunda $2,4\pm 0,49$, elektrikli diş fırçası grubunda $1,81\pm 0,61$ ve çiğnenebilir diş fırçası grubunda $1,93\pm 0,6$ olarak tespit edildi. Fırçalamadan önceki plak miktarı ortalaması, manuel diş fırçası grubunda diğer iki gruptan daha yüksekti ($p<0.001$). Fırçalama sonrası ortalama TMQHI skoru manuel diş fırçası grubunda $1,37\pm 0,43$, elektrikli diş fırçası grubunda $0,91\pm 0,52$ ve çiğnenebilir diş fırçası grubunda $1,31\pm 0,67$ olarak tespit edildi. Çiğnenebilir diş fırçasının tüm bölgelerdeki plak uzaklaştırma etkinliği diğer diş fırçalarına göre düşük bulunurken ($p<0.001$), manuel ve elektrikli diş fırçaları arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

Sonuç: Çiğnenebilir diş fırçasının plak uzaklaştırma etkinliği elektrikli ve manuel diş fırçalarına göre daha düşük bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Çiğnenebilir diş fırçası, dental plak, elektrikli diş fırçası, manuel diş fırçası



1. Introduction

The main reason for caries and periodontal diseases is the presence of a non-mineral microorganism community and its organization within the organic mucopolysaccharide matrix as dental plaque, also called dental biofilm. It is necessary to break down this organization to establish dental health. It is possible to do this by using a conventional toothbrush, although mechanical toothbrushes are also effective in removing bacteria [1,2]. Different toothbrushes have been designed with different functional and scientific benefits [3]. Several meta-analyses and Cochrane reviews have shown that electric toothbrushes have slightly higher efficacy in terms of plaque reduction and gingivitis control [4,5,6]. According to these previous studies, electric toothbrushes may be a preferable alternative due to their high level of plaque removal relative to manual toothbrushes. However, effective brushing requires both the patient's compliance and adequate brushing techniques. Precise manual dexterity is necessary for effective manual brushing, although this will vary between individuals and will improve with age [7].

In some environments, neither manual nor powered tooth brushing can be performed correctly, for example, with disabled individuals and young children [8]. A chewable toothbrush is a recent innovation in oral hygiene. The Rolly Mini chewable toothbrush meets the requirements of the Framework Regulation (EC) laws concerning food contact materials (EU2002/72/EC). The chewable toothbrush, which contains fluoride and xylitol, removes food particles and plaque accumulated between the teeth

through the mechanical cleaning effect of its bristles [9]. However, it remains unclear whether these chewable toothbrushes have any beneficial effect on the reduction of plaque.

The purpose of this clinical trial was to compare the plaque removal capacity of manual, powered, and chewable toothbrushes.

2. Material and Method

Ethical Approval

This study was approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Usak (certificate number: 12-12-12). The informed consent of the participants was obtained before the study commenced.

Study Participants

The sample size was determined using G*Power software v. 3.1.9.2. According to a previous study by Joshi et al. [10], sample size estimation indicated that 87 patients were required to achieve a type I error (α) of 0.05 and an effect size of 0.34 at a power of 80%. Ninety participants were included in our study to allow for possible errors. Potential participants who had systemic disease, were regularly on antibiotics or other drugs, had serious periodontal disease, had oral soft tissue lesions, wore an orthodontic appliance, had crowding of the teeth, had missing teeth other than the third molar, or had more than three carious lesions were excluded from the study (Figure 1).

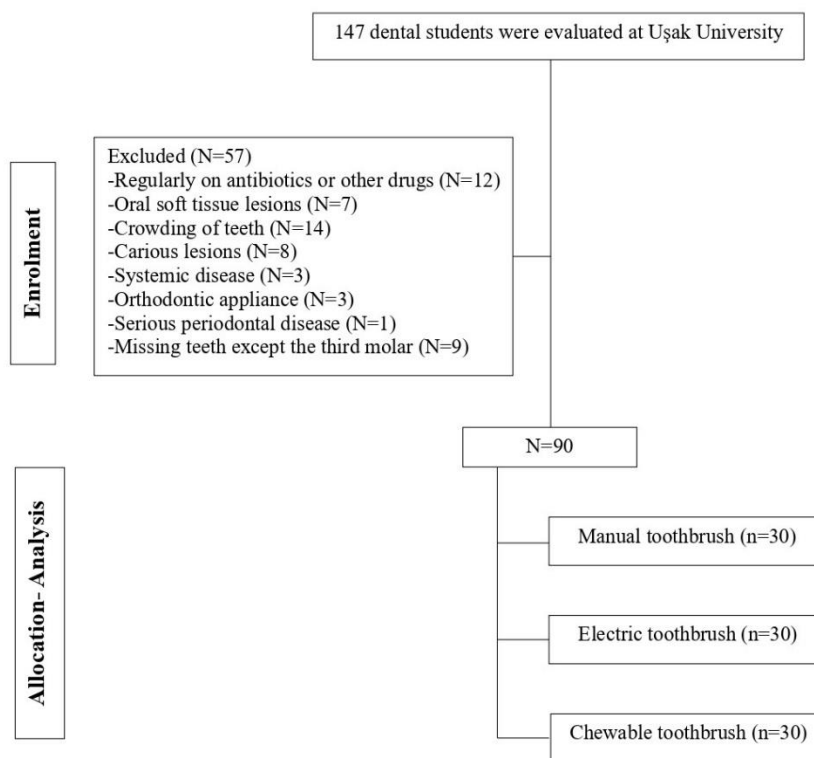


Figure 1. Flow chart of the study

Procedure

A total of 90 young people were selected and randomly categorized into three groups. A randomizing program was used to conceal their allocation (www.randomizer.org).

Group I: Using a manual toothbrush (Tepe Supreme Toothbrush) (n=30)

Group II: Using an electric toothbrush (Oral-B Electric Toothbrush) (n=30)

Group III: Using a chewable toothbrush (Rolly Mini Toothbrush) (n=30)

The participants avoided all oral hygiene procedures for 24 hours immediately prior to the study procedure, and they refrained from smoking, eating, or drinking for four hours before the procedure. The examinations were conducted after their lectures had ended (16.00–17.00 h). The participants were informed about the correct use of the various toothbrushes before they started the procedure with the help of videos and demonstrations. All groups brushed for two minutes. Group I was told to use the modified Bass technique [11] that they had observed in a demonstration. Group II was instructed to apply the electric brush head to each tooth surface, spending a few seconds on each surface. Group III was told to use the chewable toothbrush for two minutes, rolling it around their teeth using their tongue. To assess the plaque index, a basic 2% fuchsin solution was applied with a cotton swab both before and after brushing, and plaque accumulation was used to estimate the TMQHI (Turesky modification of the Quigley-Hein Index) [12]. Any excess marking material was rinsed off with water prior to brushing. For the post-brushing evaluation, the dentist was blinded to the type of toothbrush used.

Evaluation Tools

The TMQHI index evaluates the plaque revealed on the buccal and lingual surfaces all of the teeth. The TMQHI scores were recorded as follows: 0, dental plaque was not present; 1, isolated areas of dental plaque; 2, a thin band of dental plaque ≤ 1 mm; 3, dental plaque covered up to 1/3 of the tooth surface; 4, dental plaque covered between 1/3 and 2/3 of the tooth surface; and 5, dental plaque covered $\geq 2/3$ of the tooth surface. An index for the entire mouth was determined by dividing the total score by the number of surfaces examined.

Statistical Methods

The data were analyzed using IBM SPSS V23. Conformity to the normal distribution was evaluated with the Shapiro-Wilk test. One-way analysis of variance was used to compare the normal distribution of data according to the type of brush used in each group. Tukey's HSD test for multiple comparison tests was used. The analysis results are presented as means and deviations. The significance level was taken as $p < 0.05$.

3. Results

This prospective study involved 90 dental students from the University of Usak, aged between 21 and 23 (average age 22 ± 0.47 years), and it was performed between September and December 2021. Of the 90 participants included in the study, 32 were male and 58 were female (Table 1).

Table 1. Sociodemographic characteristics by groups

	Manual	Electric	Chewable	Total
Age				
mean \pm sd	22 \pm 0.88	22 \pm 0.94	21 \pm 0.12	22 \pm 0.47
Sex				
n(%)				
Male	13 (%40.62)	11 (%34.37)	8 (%25)	32 (%100)
Female	17 (%29.31)	19 (%32.75)	22 (%37.93)	58 (%100)

The mean TMQHI score before brushing was 2.4 \pm 0.49 in the manual brushing group, 1.81 \pm 0.61 in the electric toothbrush group, and 1.93 \pm 0.6 in the chewable brush group. The mean for the manual brushing group was thus higher than that of the other groups ($p < 0.001$). The mean TMQHI score after brushing was 1.37 \pm 0.43 in the manual brushing group, 0.91 \pm 0.52 in the electric toothbrush group, and 1.31 \pm 0.67 in the chewable brush group. Thus, the effectiveness of the chewable brush in removing plaque from all regions was lower than that of the other two. There was no statistical difference between the manual and electric toothbrush groups ($p < 0.001$) (Table 2).

Table 2. Brushing effectiveness of toothbrushes by region

	Manual	Electric	Chewable	Test statistics	p value
Lower					
Pre-brushing	2,53 \pm 0,54	1,93 \pm 0,66	2,06 \pm 0,67	7,5	
Post-brushing	1,52 \pm 0,51	1 \pm 0,53	1,39 \pm 0,72	6,211	
Difference	1,01 \pm 0,41 ^a	0,93 \pm 0,28 ^a	0,67 \pm 0,27 ^b	8,971	<0,001
Upper					
Pre-brushing	2,27 \pm 0,5	1,68 \pm 0,62	1,81 \pm 0,62	8,389	
Post-brushing	1,21 \pm 0,4	0,82 \pm 0,55	1,23 \pm 0,69	5,019	
Difference	1,05 \pm 0,38 ^a	0,86 \pm 0,25 ^b	0,58 \pm 0,25 ^c	19,151	<0,001
Posterior					
Pre-brushing	2,5 \pm 0,45	2,04 \pm 0,64	2,11 \pm 0,53	6,257	
Post-brushing	1,52 \pm 0,35	1,14 \pm 0,58	1,51 \pm 0,64	4,757	
Difference	0,98 \pm 0,37 ^a	0,89 \pm 0,25 ^a	0,6 \pm 0,25 ^b	13,502	<0,001

Anterior					
Pre-brushing	2,22 ± 0,65	1,46 ± 0,59	1,65 ± 0,68	11,17	
Post-brushing	1,16 ± 0,59	0,62 ± 0,47	1,04 ± 0,78	6,226	
Difference	1,06 ± 0,44 ^a	0,84 ± 0,28 ^b	0,61 ± 0,29 ^c	12,596	<0,001
Lingual					
Pre-brushing	2,4 ± 0,53	1,67 ± 0,54	1,84 ± 0,44	17,234	
Post-brushing	1,55 ± 0,5	0,9 ± 0,5	1,22 ± 0,57	11,552	
Difference	0,86 ± 0,35 ^a	0,77 ± 0,27 ^{ab}	0,62 ± 0,32 ^b	4,423	0,015
Buccal					
Pre-brushing	2,37 ± 0,55	1,94 ± 0,74	2,02 ± 0,82	3,033	
Post-brushing	1,18 ± 0,5	0,92 ± 0,61	1,4 ± 0,83	3,905	
Difference	1,19 ± 0,48 ^a	1,02 ± 0,26 ^a	0,63 ± 0,22 ^b	21,339	<0,001
Total					
Pre-brushing	2,4 ± 0,49 ^a	1,81 ± 0,61 ^b	1,93 ± 0,6 ^b	8,9	<0,001
Post-brushing	1,37 ± 0,43 ^a	0,91 ± 0,52 ^b	1,31 ± 0,67 ^a	6,149	0,003
Difference	1,03 ± 0,36 ^a	0,9 ± 0,22 ^a	0,62 ± 0,22 ^b	16,871	<0,001

When the teeth in the mandible, posterior, and buccal regions were examined, the manual and electric toothbrushes were found to be more effective in plaque removal than the chewable brushes ($p < 0.001$). In the upper jaw and anterior region, the manual brush was most efficient in removing plaque (1.05 ± 0.38 ; 1.06 ± 0.44), followed by the electric toothbrush (0.86 ± 0.25 ; 0.84 ± 0 , respectively), and finally, the chewable brush (0.58 ± 0.25 ; 0.61 ± 0.29) ($p < 0.001$). In the lingual region, the most effective brushing method was manual brushing (0.86 ± 0.35), while the chewable brush removed only a small amount of plaque ($p = 0.015$) (Table 2).

4. Discussion and Conclusion

Tooth brushing is the most important factor in maintaining oral and dental health. However, due to individual inadequacies, today's fast lifestyle, and intense work schedules, tooth brushing is pushed into the background, and oral hygiene is often not provided. In such cases, chewable toothbrushes have attracted attention because they do not require the use of water and toothpaste and are easy to use. However, in our study, it was evident that the brushing efficiency of chewable toothbrushes was less than that of either manual or electric toothbrushes.

Many factors, such as tooth brushing frequency, duration, technique, skill, and motivation, can affect the results of tooth brushing. Our study was conducted with dentistry students. The study aimed to evaluate the brushing effectiveness of the different materials by excluding individual factors and by ensuring the accurate application of the correct technique during tooth brushing. Additionally, the TMQHI plaque index was used with all teeth to measure brushing efficiency more accurately.

In a study comparing the effectiveness of manual and chewable toothbrushes among dentistry students, Mladenovic et al. [13] found that the manual toothbrush removed a significantly greater amount of plaque in the upper jaw only, in comparison to the chewable toothbrush. Unlike the results of our study, no significant differences were found between plaque removal efficiencies in the other regions or in the entire jaw. However, this result may have been associated with an insufficient number of participants.

In another study comparing manual and chewable toothbrushes in children aged 8-10 years, a chewable toothbrush was found to remove plaque more effectively after one week of use [14]. The success of the chewable toothbrush, especially on the lingual surfaces, was associated with the children's brief and ineffective use of manual toothbrushes. In another study conducted with children, Bezgin et al. [15] found that chewable toothbrushes were more effective on lingual surfaces, while manual toothbrushes were more effective on buccal surfaces. In another study conducted with children between the ages of 9 and 13, no statistical difference was found between the results for chewable and manual toothbrushes [10]. The results suggest that chewable toothbrushes increase children's motivation to chew. However, in our study, the fact that the participants were dental students who were able to use the manual toothbrush more professionally is assumed to have increased the effectiveness of manual tooth brushing. It is also thought that these results may be due to the Hawthorne effect with chewable brushes. In pilot studies conducted by Jeong et al. [16], in which the plaque removal efficiencies of the rolling and non-rolling techniques with the manual brush and chewable brushes were compared, the manual toothbrush method used with the rolling technique was found to be more effective than the chewable brush. However, no statistical difference was observed between the non-rolling technique and the chewable toothbrush. This study therefore showed the importance of using the correct brushing technique when using the manual method.

In a study by Aravind et al. [17], which compared three toothbrushes similar to those in our study, it was shown that electric toothbrushes were more effective than either manual or chewable toothbrushes in children, while the manual and chewable toothbrushes showed similar results. In this study, with children, the vibrating, oscillating, or rotating operation of the electric toothbrush depended less on individual competence than either the manual or chewable toothbrush.

A possible limitation of our study is that the initial difference in the amount of plaque between the groups was statistically significant. In our study, the preference of a brushing method with high plaque removal efficiency in manual tooth brushing may have increased the success of manual brushing. However, the preferred brushing method is a difficult technique and cannot be performed ideally in the whole population. Therefore, evaluation of manual brushing using different methods may provide more generalizable results. A positive aspect of our study is that the researcher evaluating the plaque index was blind to the particular brush used.

In our study, the plaque removal efficiency of the manual and electric toothbrushes to be superior, it was observed that the chewable toothbrushes also significantly reduced the plaque scores. An added advantage is that disposable toothbrushes, such as these, prevent microbial contamination. It is thought that chewable toothbrushes could be used as an alternative, especially for individuals who do not have the right brushing technique, or in children who are unable to perform toothbrushing effectively.

Declaration of Ethical Code

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

References

- [1] Selwitz, R.H., Ismail, A.I., Pitts, N.B. 2007. Dental caries. *Lancet*, 369(9555), 51–59.
- [2] Lamster, I.B. 2006. Antimicrobial mouthrinses and the management of periodontal diseases. Introduction to the supplement. *J Am Dent Assoc*, 137(Suppl), 5-9.
- [3] Van Swol, R.L., Van Scotter, D.E., Pucher, J.J., Dentino, A.R. 1996. Clinical evaluation of an ionic toothbrush in the removal of established plaque and reduction of gingivitis. *Quintessence Int*, 27(1), 389-394.

- [4] Sicilia, A., Arregui, I., Gallego, M., Cabezas, B., Cuesta, S. 2002. A systematic review of powered vs manual toothbrushes in periodontal cause-related therapy. *J Clin Periodontol*, 29(3), 39-54.
- [5] Heanue, M., Deacon, S.A., Deery, C., et al. 2003. Manual versus powered toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev*, 1(1), CD002281.
- [6] Van der Weijden, F.A., Campbell, S.L., Dörfer, C.E., González-Cabezas, C., Slot, D.E. 2011. Safety of oscillating-rotating powered brushes compared to manual toothbrushes: a systematic review. *J Periodontol*, 82(1), 5-24.
- [7] Williams, K., Ferrante, A., Dockter, K., Haun, J., Biesbrock, A.R., Bartizek, R.D. 2004. One- and 3-minute plaque removal by a battery-powered versus a manual toothbrush. *J Periodontol*, 75(8), 1107-1113.
- [8] Pujar, P., Subbareddy, V.V. 2013. Evaluation of the toothbrushing skills in children aged 6-12 years. *Eur Arch Paediatr Dent*, 14(1), 213-219.
- [9] Rolly toothbrush. 2022. Rolly toothbrush on the go. Available from: <http://www.rollybrush.co.uk/> (Accessed 4th November 2022).
- [10] Joshi, A.V., Dixit, U.B. 2018. Effectiveness of plaque removal with an experimental chewable brush in children between age 9 and 13 years. *Eur Arch Paediatr Dent*. 19(6), 417-421.
- [11] Bass, C.C. 1948. The optimum characteristics of toothbrushes for personal oral hygiene. *Dent Items Interest*, 70(1), 921-934.
- [12] Turesky, S., Gilmore, N.D., Glickman, I. 1970. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol*, 41(1), 41-43.
- [13] Mladenovic, R., Cvetkovic, A., Martinovic, B., et al. 2019. Efficiency of chewable toothbrush in reduction of dental plaque in students. *BMC Oral Health*, 19(1), 1-7.
- [14] Kayalvizhi, G., Radha, S., Prathima, G.S., Mohandoss, S., Ramesh, V., Arumugam, S.B. 2019. Comparative Evaluation of Plaque Removal Effectiveness of Manual and Chewable Toothbrushes in Children: A Randomized Clinical Trial. *Int J Clin Pediatr Dent*, 12(2), 107-110.
- [15] Bezgin, T., Dag, C., Özalp, N. 2015. How effective is a chewable brush in removing plaque in children? A pilot study. *J Pediatr Dent*, 3(2), 41-45.
- [16] Jeong, M.J., Shin, H.S., Jeong, S.J., Lim, D.S. 2017. Comparing Chewable and Manual Toothbrushes for Reducing Dental Plaque: A Pilot Study. *J Dent Hyg Sci*, 17(3), 267-274.
- [17] Aravind, A., Peedikayil, F.C., Chandru, T.P., Kottayi, S. 2018. Comparative evaluation of plaque removal efficiency of manual, electric and chewable toothbrush in children: a pilot study. *Int J Med Health Res*, 4(9), 51-55.

Bir Yaşlı Popülasyonunda Periodontal Durumun Fiziksel Aktivite, Beslenme ve Yaşam Kalitesi ile İlişkisi

The Relationship Between Periodontal Status and Physical Activity, Nutrition and Quality of Life in an Elderly Population

Erensu UZAR¹ , Kübra ERTAŞ¹ , Özgür KOŞKAN² , Zuhay YETKİN AY^{1*} 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD, Isparta, Türkiye

² Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü, Biyometri AD, Isparta, Türkiye



Ö Z

Yaşlı bireylerdeki dental/periodontal hastalıkların oluşma ve ilerleme durumunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi ile kontrol altına alınması, yaşlı bireylerin yaşam kalitesinin artırılmasında önemli bir etki oluşturacaktır. Bu çalışmanın amacı bir yaşlı popülasyonunda fiziksel aktivite, beslenme, ağız sağlığına bağlı yaşam kalitesi ile periodontal sağlık/hastalık durumu arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Çalışmaya 2021-2022 yılları arasında kliniğimize başvuran yaşları 65-74 arasında değişen 33 gönüllü birey katılmıştır. Katılımcıların klinik periodontal parametre kayıtları, sosyodemografik, antropometrik özellikleri kaydedilmiş ve Ağız Sağlığı Etki Profili Ölçeği (OHIP-14), Ağız Ve Diş Sağlığı İle İlgili Yaşam Kalitesi-Birleşik Krallık Ölçeği (OHRQoL-UK), Yaşlı Ağız Sağlığı Tanılama İndeksi (GOHAI), Yaşlılar İçin Fiziksel Aktivite Ölçeği (PASE), Mini Nutrisyonel Değerlendirme Testi (MNA) indeksleri, anket formları kullanılarak elde edilmiştir. Varyansların normal dağılımı ve homojenliği Shapiro-Wilk ve Levene testleri, gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi, korelasyonlar ise Spearman korelasyon testi ile analiz edilmiştir ($p<0,05$).

Çalışma popülasyonunda PASE skorları erkeklerde kadınlardan yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Periodontal durum test skorlarında anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır ($p>0,05$). Aylık gelir yükseldikçe PASE skorları yükselmiş ($p<0,000$), sistemik hastalık varlığında ve diş kaybı arttıkça OHQoL-UK skorları artmış ($p=0,025$, $p=0,026$), VKİ alt grupları arasında OHIP-14 skorları anlamlı farklılık göstermiştir ($p=0,002$).

Periodontal durum, incelenen geriatric popülasyonda yaşam stili ve kalitesiyle alakalı test skorları üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir. COVID-19 döneminde yürütülmüş bu çalışmanın bulguları daha geniş yaşlı popülasyonlarında farklılık gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Geriatri, periodontal sağlık, beslenme, yaşam, aktivite

Alınış / Received: 11.05.2023 Kabul / Accepted: 27.06.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Determining and controlling the factors affecting the occurrence and progression of dental/periodontal diseases in elderly individuals will have a significant impact on increasing the quality of life of elderly. The aim of this study is to investigate the relationship between physical activity, nutrition, oral health-related quality of life and periodontal health/disease status in an elderly population.

33 volunteers aged between 65 and 74 who applied to our clinic between 2021 and 2022 participated in the study. Clinical periodontal parameter recordings, sociodemographic and anthropometric characteristics of the participants were recorded and Oral Health Impact Profile Scale (OHIP-14), Oral and Dental Health-Related Quality of Life-UK (OHRQoL-UK), Geriatric Oral Health Assessment Index (GOHAI), Physical Activity Scale for Elderly (PASE), Mini Nutritional Assessment (MNA) indices were obtained using questionnaires. Normal distribution and homogeneity of variances were analyzed by Shapiro-Wilk and Levene tests, comparisons between groups were analyzed by Mann-Whitney U test and correlations were analyzed by Spearman correlation test ($p<0.05$).

In the study population, PASE scores were higher in males than females ($p<0.05$). There was no significant difference in periodontal status test scores ($p>0.05$). PASE scores increased as monthly income increased ($p<0.000$), OHQoL-UK scores increased in the presence of systemic disease and tooth loss increased ($p=0.025$, $p=0.026$), OHIP-14 scores differed significantly between BMI subgroups ($p=0.002$).

Periodontal status didn't have a significant effect on test scores related to lifestyle and quality of life in the geriatric population studied. The findings of this study conducted during the COVID-19 era may differ in larger elderly populations.

Keywords: Geriatrics, periodontal health, nutrition, life, activity



1. Giriş

Kronolojik olarak yaşlanma Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 65 yaş üzeri olarak kabul edilmiştir [1,2]. Dünya Sağlık Örgütü geropsikiyatrik yaşlılık dönemini değerlendirdiğinde 85 yaş ve üstünü "çok yaşlı", 65 yaş ve üzerini "yaşlı" olarak tanımlamıştır. Gerontologlar ise 85 yaş üzerini "ileri yaşlılık", 75-84 yaş arasını "orta yaşlılık" ve 65-74 yaş arası "geç yaşlılık" olarak sınıflamışlardır [1,2].

Yaşlılarda fiziksel inaktivite oranı %33' tür. Kas denervasyonu, kas lifi boyutu ile toplam kas lifi sayısının azalması, kas eksitasyon ve kontraksiyonu arasındaki dengenin bozulması nedeniyle yaş ile beraber kas gücü ve fonksiyonu %40 civarında azalmaktadır [3,4]. İleri yaşlarda fiziksel kapasite eşik değere yakın olup, minimal azalmalar bile günlük aktiviteleri olumsuz yönde etkilemektedir. Bu duruma ek olarak bir hastalık atağı; önceden sağlıklı olan yaşlı bireyi tamamen bağımlı ve hareketsiz yapabilir [3]. Öte yandan ileri yaşlarda yaşlıların giderek toplumsal ilişkilerden, yaşamdan ve günlük aktivitelerden kendilerini çektikleri, bu davranışların "normal" olarak algılandığı ve bu görüşü benimseyen toplumlardaki yaşlılarda başta sosyal ve ruhsal problemler olmak üzere pek çok sağlık sorunları oluşmaktadır [3,4].

Fiziksel aktivite bazı kronik hastalıkların önlenmesi veya ilerlemelerinin yavaşlatılmasıyla sağlıklı yaşlanmanın önemli bir parçasıdır. Fiziksel aktivitenin anti-inflamatuvar etkisi olduğu, C Reaktif Protein (CRP) ve lökositlerin dolaşımdaki düzeylerinin artışı ile ilgili risk değerlendirmelerinin düşük olduğu rapor edilmiştir [3]. Periodontal hastalıklar kronik seyirli olup, birincil etyolojik faktör olarak mikrobiyal

dental biyofilm kabul edilse de lokal ve sistemik hazırlayıcı faktörlerden ve konak immün yanıtından etkilenerek sert ve yumuşak periodontal dokularda yıkımla sonuçlanan hastalıklardır. Periodontal hastalıklarla beraber oluşan konak yanıtı doku yıkım miktarını etkilemektedir. Fiziksel aktivitenin periodontal hastalıklar nedeniyle oluşan aşırı konak inflamatuvar yanıtını azaltmada rolü olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır [1,4].

Türkiye' de yaşam süresinin arttığı (halen 78 olarak rapor edilmektedir) ve yaşlı nüfusun ülkemizin nüfusunun %8,2' si olduğu bildirilmiştir [2]. Ülkemize benzer şekilde, küresel olarak da tüm nüfusta yaşam süresi beklentisinde ve yaşlı nüfus sayısında bir artış olduğu rapor edilmiştir [5]. Geriatrik popülasyonun 2050'de dünyada günümüzden iki kat daha yüksek olması beklenmekte ve bu popülasyonun önceki nesillere göre konservatif diş uygulamalarına erişme şansı daha fazla olduğu için yaşlılıklarında daha fazla dişleri olacağı öngörülmektedir. [6] Bunun nedeni diş kaybının tipik bir yaşlanma sonucu olmayıp yaşam boyu süregelen oral ve dental olayların birikmiş bir sonucu olmasıdır [7].

Yaşlanan bireyler psikolojik, fizyolojik ve fonksiyonel değişimler yaşarlarken, bu değişimler uygun oral hijyen tekniklerinin uygulanmasını sınırlayabilmekte, dişeti enfeksiyonları, diş çürüğü ve periodontal hastalık riskini önemli ölçüde artırmaktadır [8]. Yaşlanma ile birlikte diş kaybında artış, ağız mukozasında ve kaslarda atrofi, salya akış hızında azalma meydana gelir. Ağız yapısındaki bu değişiklikler, yaşlı bireyin beslenme alışkanlıklarında ve çiğneme fonksiyonunda değişikliklere sebep olmaktadır. Beslenmenin bozulması ile birlikte farklı patolojik değişikliklerin gelişmesine zemin hazırlanmaktadır. Bu nedenle, yaşlanmaya bağlı olarak ağız içinde meydana gelen değişiklikler özellikle diş hekimleri için büyük önem taşımaktadır [9]. Özetle, yaşlı bireylerdeki dental ve periodontal hastalıkların varlığı ile sıklığının ve bu hastalıkların oluşma ve ilerleme durumunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi sonucunda kontrol altına alınması, yaşlı bireylerin yaşam kalitesinin artırılmasında önemli bir etki oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı bir yaşlı popülasyonunda fiziksel aktivite, beslenme, ağız sağlığına bağlı yaşam kalitesi ile periodontal sağlık/hastalık durumu arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (10.08.2020 tarih ve 15 /217 sayılı karar) onayıyla 2021 ile 2022 yılları arasında SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniği'nde kalifiye tek bir araştırmacı (KE) tarafından muayene edilen, yaşları 65-74 arasında değişen 33 gönüllü birey katıldı.

Çalışmadan hariç bırakılma kriterlerini son üç ay içerisinde periodontal parametrelerde farklılık oluşturabilecek anti-inflamatuvar ve/veya antibiyotik kullanmış olmak, 10' dan az sayıda dişi olmak, son altı ay içinde periodontal tedavi görmüş olmak, romatolojik ve aktif malign hastalık öyküsü olması, otoimmün hastalık veya kemoterapi ya da radyoterapi gibi immün yetmezlik durumu olması ve çalışmaya katılmayı reddetmek oluştu.

Çalışmamıza katılan hastaların klinik periodontal parametre kayıtları, ağız hijyeni alışkanlığı ve dental hikayesi (diş fırçalama sıklığı, diş kayıp nedeni), sosyodemografik özellikleri (yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, aylık gelir, sistemik sağlık, sigara kullanımı), antropometrik özellikleri (boy, kilo, vücut kitle indeksi (VKİ), bel, kalça, baldır ve kol ölçümleri) kaydedildi ve Ağız Sağlığı Etki Profili Ölçeği (OHIP-14), Ağız Ve Diş Sağlığı İle İlgili Yaşam Kalitesi-Birleşik Krallık Ölçeği (OHRQoL-UK), Yaşlı Ağız Sağlığı Tanılama İndeksi (GOHAI), Yaşlılar İçin Fiziksel Aktivite Ölçeği (PASE), Mini Nutrisyonel Değerlendirme Testi (MNA) indeksleri, anket formları kullanılarak elde edildi.

Periodontal tanı için periodontal hastalıkların güncel sınıflamasındaki evre ve derecelendirmeler baz alınmıştır. Çalışmamız pandemi döneminde yapıldığından ve geriatrik bireyler için riski azaltmak amacıyla intraoral periodontal parametre indeks ve ölçümleri yerine varsa periodontal hastalık tanısı (gingivitis veya periodontitis) ve varsa periodontitisin evrelendirilmesinde radyografik kemik kayıpları ve periodontal nedenli diş kayıpları; derecelendirme için ise kemik kaybıyla yaş oranı ve sigara-diyabet gibi risk faktörleri değerlendirilmiştir.

Yaşlılar İçin Fiziksel Aktivite Ölçeği (PASE); 65 yaş ve daha üstü bireyleri değerlendiren, epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan, kişinin kendi kendine skorlayabildiği, bir hafta içerisinde

gerçekleştirdiği ev işleri ve boş zaman aktivitelerine dayanan, telefon görüşmesi ile, posta yoluyla veya yüz yüze uygulanan kısa bir ölçektir. PASE skoru, boş zaman aktivitesi, ev işleri ve meşguliyet aktivitelerini içeren çoklu skorun toplanmasından oluşmaktadır [10]. Skorlama, toplumda yaşayan ve herhangi bir kurumsal ilişkisi olmayan yaşlılarda elektronik fiziksel aktivite monitörü, aktivite günlükleri veya kişinin kendi kendini değerlendirdiği aktivite düzeyinden elde edilecek verilerle yapılır. Bu skala yaşlılardaki fiziksel aktivite düzeyini değerlendirmek dışında yapılan müdahalenin etkinliğini değerlendirmek amacıyla da uygulanmaktadır. Yaşlılar İçin Türkçe Fiziksel Aktivite Ölçeği' nin kültürel uyarlamasını tanımlamayı ve ölçeğin yaşlı Türk yetişkinlerde geçerlilik ve güvenilirliğini Ayvat ve arkadaşları yapmış, çalışmanın sonuçları, PASE' nin Türkçe sürümünün güçlü ölçme niteliklerine sahip olduğunu, araştırma ve uygulama alanları için geçerli ve güvenilir bir ölçek olduğunu göstermiştir [11].

Ağız Sağlığı Etki Profili Ölçeği (OHIP-14); ağız sağlığı ile ilişkili yaşam kalitesi, bireyin ağız sağlığının kendi genel sağlığını ve yaşam kalitesini nasıl etkilediğinin kişisel olarak algılanmasıdır. OHIP-14 bu algılamayı fonksiyonel kısıtlılık, fiziksel, psikolojik ve sosyal yetersizlik, fiziksel ağrı, engel ölçüleri ve psikolojik rahatsızlığı 14 soru ile değerlendiren bir ölçek sistemidir. [12] OHIP-14 dahilindeki her soru için bireylere ilgili maddedeki sorunu ne oranda yaşadıkları sorulmaktadır. Sonuçlar Likert ölçeği ile değerlendirilmektedir (0: Hiç, 1: Nadiren, 2: Bazen, 3: Sıklıkla, 4: Çok sık). Toplam skor arttıkça problemin şiddetinin arttığı ve yaşam kalitesinin azaldığı sonucuna varılmaktadır [13].

Ağız ve Diş Sağlığı ile İlgili Yaşam Kalitesi-Birleşik Krallık Ölçeği (OHRQoL-UK); ilk kez 2000 yılında McGrath ve Bedi tarafından İngiltere' de oluşturulmuştur. Ağız sağlığının yaşam kalitesi üzerindeki etkilerini pozitif ve negatif alanda değerlendiren dört farklı kategoride 16 sorudan oluşmaktadır. Bu kategoriler; psikolojik durum, semptom, sosyal durum, fiziksel durumdur. Elde edilen düşük skor ağız sağlığı ile ilişkili yaşam kalitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Likert ölçeğine göre skorlanır, skor azaldıkça, yaşam kalitesinin azaldığı sonucuna varılmaktadır [14].

Yaşlı Ağız Sağlığı Tanılama İndeksi (GOHAI); 12 maddeden oluşmakta, fiziksel, psikososyal, ağrı ve rahatsızlığın boyutlarını değerlendirmektedir [15]. Katılımcılar son üç ay içindeki deneyimlerini Likert ölçeğine göre cevaplandırmaktadır. Toplam 0-60 arasında bir skor elde edilmektedir. <50 "düşük", 51-56 "orta", 57-60 "yüksek" olarak derecelendirilmektedir. Ağız sağlığı durumu iyi olan ve hiçbir problemi olmadığını belirten kişilerin skorları yüksek olarak kaydedilmektedir [16].

Mini Nutrisyonel Değerlendirme Testi (MNA); 1994'de Toulouse Üniversitesi, New Mexico Tıp Fakültesi ve İsviçre Nestle Araştırma Merkezi arasındaki işbirliği ile geliştirilmiştir. MNA yaşlı hastaları; normal beslenmiş (≥ 24), risk altında (17-23.5 arasında) veya belirgin malnütre (<17) şeklinde sınıflandırmaktadır. Testin en önemli özelliklerinden biri MNA değeri 17-23.5 arasında iken, vücut ağırlığı ve serum albümin düzeylerinde şiddetli değişiklikler oluşmadan önce malnütrisyon riskinin tespit edilebilmesidir [17-20].

Antropometri, insan vücudunun ölçümüdür. Beslenme durumunu değerlendirmek için kullanılan biyokimyasal, klinik ve diyet değerlendirmesini de içeren birkaç yaklaşımdan biridir. Antropometri, bir bireyde veya popülasyonda mevcut yetersiz beslenme türlerini belirlemeye ve iyileşmeye yönelik ilerlemeyi ölçmeye yardımcı olabilir. Geliştirme programlarında kullanılan yaygın antropometrik ölçümler boy/uzunluk, ağırlık ve orta-üst kol çevresinin ölçümünü içerir [21]. Çalışmamızda antropometrik ölçümler; Antropometrik Ölçümler Standart Yönergeleri'ne göre alınmıştır [22]. Bu ölçümlerden VKİ, boy ve kilo açısından obezitenin bir göstergesi olarak kullanılmış, kilogram cinsinden vücut kütesinin metre cinsinden vücut boyunun karesine bölünmesiyle hesaplanmaktadır [23]. Elde edilen sonuca göre 18,5' ten az ise "zayıf", 18,5-24,9 arasında ise "optimum", 25-29,9 arası "fazla kilolu", 30-34,9 arası "sınıf I obezite", 35-39,9 "sınıf II obezite", 40' tan fazla ise "sınıf III obezite" olarak kategorize edilmektedir. Antropometrik kayıt olarak ayrıca bel, kalça, baldır ve kol ölçümleri de yapılmıştır [24]. Bu ölçümler ise mezura yardımıyla bel, kalça baldır ve kolun en geniş bölgelerinden elde edilerek kayıt edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada üzerinde durulan özellikler bakımından elde edilen veriler parametrik testlerin ön şartlarından olan normal dağılım gösterme ve varyansların homojenliği sırasıyla Shapiro-Wilk ve Levene testleri testleriyle kontrol edildi. Varyans analizinden sonra gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Ayrıca sürekli değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin varlığı Spearman

korelasyon katsayısı hesaplanarak ortaya konuldu. İstatistiksel anlamlı önemlilik için p değeri 0,05 olarak kabul edildi ($p<0,05$).

3. Bulgular

Çalışma grubuna ait sosyodemografik özellikler, ağız hijyen alışkanlıkları, diş kayıp nedenleri, periodontal durum ve antropometrik değerlerin frekansı Tablo 1' de,

Tablo 1: Çalışma popülasyonunun sosyodemografik özellikleri, ağız hijyen alışkanlıkları, diş kayıp nedenleri, periodontal durum ve antropometrik değerleri

Periodontal Durum		Sosyodemografik Özellikler		Antropometrik Özellikler	
Diş fırçalama sıklığı	Yok: %33,3	Yaş	Min.: 65±3	Boy (cm)	Min.: 135
	Düzenli: %51,5		Max: 76±3		Maks.:182
	Düzensiz: %12,1		Ort.: 68±3		Ort± SS: 161±9,2
Diş kayıp nedeni	Çürük: %57,6	Cinsiyet	%36,4 kadın	Kilo (kg)	Min.: 53
	Periodontal: %12,1		%63,6 erkek		Maks.: 110
Periodontal durum	Gingivitis: %24,2	Eğitim Düzeyi	Yok: %6,1	Vücut Kitle İndeksi (%)	Ort ± SS: 79,5±11,9
	Periodontitis: %75,8		İlköğretim: %51,5		29> : 42,4
	Evre-1: %9,1		Ortaöğretim: %6,1		29≤ : 57,6
	Evre-2: %24,2		Lise: %9,1	Bel (cm): Ort ± SS: 106±11 Kalça (cm) Ort± SS:108±8,8 Baldır (cm) Ort±SS:52±7,9 Kol (cm) Ort±SS: 30±5,9	
	Evre-3: %15,2	Üniversite: %27,3			
	Evre-4: %30,3	Aylık Gelir	4.500 TL> :%60,6		
	Derece-A: %6,1	4.500 TL≤ : %9,1			
	Derece-B: %42,4	Sistemik Sağlık	Yok: %24,2		
	Derece-C: %30,3	Birden fazla: %3	Var: %72,7		
		Sigara Kullanımı	Yok: %97		
		Var: %3			

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma

Yaş ve antropometrik parametrelerin OHIP-14, OHRQoL-UK, GOHAI, PASE ve MNA ile korelasyonları tüm çalışma popülasyonu, ayrıca periodontal tanıya göre gingivitis ve periodontitisli gruptaki parametreler arası korelasyonlar Tablo 2' de verilirken, Tablo 3'de periodontitisli hastalarda, ağız hijyen alışkanlıkları, diş kayıp nedeni, sistemik hastalık varlığı, VKİ, sosyodemografik özellikler ve periodontitisin evre ve derecesinin OHIP-14, OHRQoL-UK, GOHAI, PASE, MNA ile olan korelasyonları sunulmuştur.

Tablo 2: Yaş ve antropometrik parametrelerin OHIP-14, OHRQoL-UK, GOHAI, PASE ve MNA ile tüm çalışma popülasyonu ve periodontal tanıya göre tüm hastalar, gingivitis ve periodontitisli gruplarındaki korelasyonları.

	OHIP-14			OHRQoL-UK			GOHAI			PASE			MNA		
	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P	T	G	P
Yaş	r:-0,15 p:0,4	r:0,19 p:0,66	r:-0,26 p:0,21	r:-0,1 p:0,6	r:-0,57 p:0,14	r:0,09 p:0,65	r:-0,25 p:0,15	r:-0,01 p:0,98	r:-0,36 p:0,08	r:0,24 p:0,18	r:-0,39 p:0,37	r:0,45 p:0,024*	r:-0,13 p:0,47	r:-0,73 p:0,039*	r:0,05 p:0,8
Boy (m)	r:-0,16 p:0,39	r:-0,1 p:0,82	r:-0,23 p:0,27	r:0,25 p:0,16	r:0,4 p:0,32	r:0,29 p:0,15	r:-0,48 p:0,004**	r:-0,4 p:0,33	r:-0,57 p:0,003**	r:0,38 p:0,028*	r:0,69 p:0,056	r:0,31 p:0,14	r:0,34 p:0,05	r:0,5 p:0,21	r:0,31 p:0,13
Kilo (kg)	r:0,21 p:0,24	r:0,25 p:0,55	r:0,19 p:0,36	r:0,05 p:0,79	r:-0,45 p:0,26	r:0,3 p:0,15	r:-0,37 p:0,034	r:-0,47 p:0,25	r:-0,34 p:0,1	r:-0,09 p:0,6	r:-0,44 p:0,27	r:-0,02 p:0,93	r:-0,002 p:0,99	r:-0,3 p:0,47	r:0,12 p:0,57
VKI (kg/m²)	r:0,32 p:0,07	r:0,35 p:0,4	r:0,34 p:0,1	r:-0,13 p:0,47	r:-0,63 p:0,091	r:0,09 p:0,68	r:0,016 p:0,93	r:-0,19 p:0,65	r:0,15 p:0,48	r:-0,24 p:0,187	r:-0,61 p:0,1	r:-0,12 p:0,58	r:-0,25 p:0,16	r:-0,48 p:0,23	r:-0,18 p:0,38
Bel (cm)	r:0,49 p:0,004**	r:0,65 p:0,08	r:0,4 p:0,049*	r:-0,19 p:0,28	r:-0,69 p:0,06	r:0,1 p:0,63	r:-0,15 p:0,396	r:-0,1 p:0,81	r:-0,21 p:0,31	r:-0,16 p:0,36	r:-0,55 p:0,16	r:-0,16 p:0,43	r:-0,05 p:0,79	r:-0,25 p:0,55	r:-0,03 p:0,9
Kalça (cm)	r:0,34 p:0,05	r:0,55 p:0,16	r:0,24 p:0,25	r:-0,17 p:0,34	r:-0,71 p:0,05	r:0,09 p:0,67	r:-0,25 p:0,168	r:-0,16 p:0,7	r:-0,29 p:0,16	r:-0,33 p:0,06	r:-0,59 p:0,12	r:-0,25 p:0,23	r:-0,16 p:0,36	r:-0,41 p:0,31	r:-0,06 p:0,78
Baldır (cm)	r:0,06 p:0,75	r:-0,12 p:0,78	r:0,1 p:0,64	r:0,16 p:0,37	r:-0,24 p:0,56	r:0,35 p:0,08	r:-0,3 p:0,09	r:-0,44 p:0,28	r:-0,21 p:0,32	r:-0,15 p:0,4	r:-0,17 p:0,7	r:-0,13 p:0,54	r:-0,12 p:0,51	r:-0,13 p:0,76	r:-0,13 p:0,54
Kol (cm)	r:0,34 p:0,05	r:0,65 p:0,08	r:0,31 p:0,14	r:-0,12 p:0,51	r:-0,63 p:0,094	r:-0,05 p:0,82	r:0,03 p:0,86	r:-0,05 p:0,09	r:0,1 p:0,61	r:-0,02 p:0,89	r:-0,35 p:0,39	r:0,1 p:0,64	r:0,08 p:0,64	r:-0,14 p:0,74	r:0,18 p:0,38

G: Gingivitis, GOHAI: Yaşlı Ağız Sağlığı Tanılama İndeksi, MNA: Mini Nutrisyonel Değerlendirme Testi, OHIP-14: Ağız Sağlığı Etki Profili Ölçeği, OHRQoL-UK: Ağız Ve Diş Sağlığı İle İlgili Yaşam Kalitesi-Birleşik Krallık Ölçeği, P: Perodontitis, PASE: Yaşlılar İçin Fiziksel Aktivite Ölçeği, T: Tüm Hastalar, VKİ: Vücut Kitle İndeksi (*anlamli korelasyon p<0,05 ** ileri düzeyde anlamli korelasyon p<0,01)

Tablo 3: Periodontitisli hastalarda, ağız hijyen alışkanlıkları, diş kayıp nedeni, sistemik hastalık varlığı, VKİ, sosyodemografik özellikler ve periodontitisin evre ve derecesinin OHIP-14, OHRQoL-UK, GOHAI, PASE, MNA ile korelasyonları.

	OHIP-14 p	OHRQoL-UK p	GOHAI p	PASE p	MNA p
Cinsiyet	0,34	0,73	0,41	0,001	0,78
Diş Fırçalama Sıklığı	0,89	0,73	0,95	0,11	0,79
Diş Kayıp Nedeni	0,08	0,03	0,06	0,29	0,08
Sistemik Hastalık Varlığı	0,92	0,02	0,29	0,42	0,09
VKİ (kg/m²)	0,002	0,11	0,29	0,09	0,46
Eğitim Düzeyi	0,95	0,63	0,26	0,12	0,3
Aylık Gelir (TL)	0,09	0,33	0,22	<0,0001	0,13
Periodontal Durum	0,37	0,14	0,37	0,73	0,92
Evre	0,17	0,12	0,35	0,22	0,77
Derece	0,55	0,18	0,83	0,60	0,81

GOHAI: Yaşlı Ağız Sağlığı Tanılama İndeksi, MNA: Mini Nutrisyonel Değerlendirme Testi, OHIP-14: Ağız Sağlığı Etki Profili Ölçeği, OHRQoL-UK: Ağız Ve Diş Sağlığı İle İlgili Yaşam Kalitesi-Birleşik Krallık Ölçeği, PASE: Yaşlılar İçin Fiziksel Aktivite Ölçeği, TL: Türk Lirası, VKİ: Vücut Kitle İndeksi

Çalışma popülasyonunda PASE skorları erkeklerde kadınlardan yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Periodontal durum test skorlarında anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır ($p>0,05$). Aylık gelir yükseldikçe PASE skorları yükselmiş ($p<0,000$), sistemik hastalık varlığında ve diş kaybı arttıkça OHRQoL-UK skorları artmış ($p=0,025$, $p=0,026$), VKİ alt grupları arasında OHIP-14 skorları anlamlı farklılık göstermiş ($p=0,002$), VKİ değeri 29' un üzerine çıktıkça, OHIP-14 değerleri de artmıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Ağız ve diş tedavileri için fakültemize başvuran bir yaşlı popülasyonunda fiziksel aktivite, beslenme, ağız sağlığına bağlı yaşam kalitesi ile periodontal sağlık/hastalık durumu arasındaki ilişkinin var olduğu hipotezi ile yapılan bu çalışmada; katılımcıların mevcut periodontal sağlık/hastalık durumları ile sosyodemografik ve antropometrik özellikleri kaydedilmiş, ayrıca bu özelliklerin OHIP-14, OHRQoL-UK, GOHAI, PASE ve MNA indeksleri ile olan korelasyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece yaşlılıkta yaşam kalitesini etkileyen dental, periodontal ve yaşam stili ile ilgili faktörlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Periodontal durum (gingivitis ya da periodontiti olmak) incelenen geriatric popülasyonda yaşam stili ve kalitesiyle alakalı test skorları üzerinde anlamlı bir etki göstermese de; PASE skorları ile cinsiyet ve aylık gelir, OHRQoL-UK ölçeği ile sistemik hastalık ve diş kaybı, OHIP-14 skorları ile ise VKİ alt grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Literatürde periodontal durumun hastaların yaşam kalitesi üzerinde etkisi olduğu ve daha iyi periodontal durumda olan kişilerin daha iyi yaşam kalitesine sahip olduğu gösterilmiştir [25]. Çalışmanın tasarımı esnasında kurulan hipotezlerden olan bu durum, elde edilen bulgular değerlendirildiğinde reddedilmiş; periodontal durum, incelenen geriatric popülasyonda yaşam kalitesiyle alakalı ölçüklerin skorları ile anlamlı bir ilişki göstermemiştir. Bu durumun nedenlerinden biri, çalışmanın COVID-19 pandemi döneminde yürütülmüş olması ve çok sınırlı bir yaşlı popülasyonlarında incelenmiş olmasıyla ve incelenen bu popülasyonda periodontal sağlık ve hastalık gruplarının sayılarının yeterli olmamasıyla ve hatta periodontal sağlıklı katılımcı bulunmamasıyla ilişkili olabilir.

OHIP' in kullanıldığı epidemiyolojik bir çalışmada eksik dişlerin, tedavi edilmemiş dişsel hastalıklar/bozuklukların, periodontal ataçman kaybının ve diş bakımı önündeki engellerin sağlıklı ya da iyi olma hali üzerinde etkileri olduğunu bildirmiştir [26]. Periodontitisin ağız sağlığı etki profili üzerindeki etkisini araştıran 2020 yılında yapılan bir meta-analizde 8 kesitsel çalışma ve 2 vaka kontrol çalışması incelenmiş ve periodontitisin OHIP-14 değerlerinin olumsuz yöndeki değişimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu gösterilmiş; bu ilişkinin, periodontal hastalığın ilerleme derecesi ve periodontal doku hasarının boyutuyla orantılı olarak doğrudan değiştiği gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, çalışmaya katılan hastalarda periodontitisin yol açabileceği en önemli problemler arasında psikolojik rahatsızlık, stres, kişilerarası ilişkilerde sorunlar ve hatta günlük aktivitelerde zorluklar sayılabileceği belirtilmiştir [27]. Bu da periodontal tedavinin hedeflerinin planlanmasında, hastanın hastalığı algılamasının psikolojik ve sosyal yönlerini de dikkate alan daha bütüncül bir yaklaşıma gereksinim olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda VKİ alt grupları arasında OHIP-14 skorları anlamlı farklılık göstermiştir. Bu durum, günlük aktivitelerde zorluklara sebep olabilecek yüksek VKİ değerlerinin ağız sağlığı ile ilişkili yaşam kalitesini, ağız sağlığının ise bireyin kendi yaşam kalitesi ve genel sağlığını etkilediğini göstermektedir.

Norveç'te 65 yaşındaki bir periodontitis popülasyonunda risk göstergelerini ve ağız sağlığı ile ilişkili yaşam kalitesi üzerindeki etkisini araştıran 2022 yılında yapılmış başka bir çalışmada da araştırmamıza benzer şekilde katılımcılar, doğdukları ülke, eğitim, diyabet varlığı, sigara içme alışkanlıkları, diş hekimine gitme sıklığı ve diş fırçalama alışkanlıkları ile ilgili bir anketi yanıtlamış ve ek olarak, OHRQoL, OHIP-14 ile değerlendirilmişler, çalışmamıza benzer şekilde periodontitis tanısı, klinik ve radyografik periodontal ölçümlere dayandırılmış ve 2017 Dünya Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkları ve Durumlarının Sınıflandırılması Çalışması'nın fikir birliği raporuna göre sınıflandırılmıştır. Çalışma sonucunda sonuçlar Oslo'daki 65 yaşındakiler arasında iyi bir OHRQoL'ye işaret etmiş, ancak periodontitisin şiddeti arttıkça OHRQoL'de azalma eğilimi gözlenmiştir [28]. Periodontitisin evre ve derecesinin ve hasta tarafından bildirilen semptomların ağız sağlığıyla ilişkili yaşam kalitesi üzerindeki etkisini araştıran 2022 yılında yapılmış başka bir çalışmada OHRQoL değerlendirmek için OHIP-14' ün Türkçe versiyonu kullanılmış ve katılımcılardan periodontal hastalıklarla ilişkili semptomlarını belirtmeleri istenmiş ve Evre IV ve Derece C periodontitisli katılımcıların en yüksek toplam OHIP-14 skorlarına sahip olduğu bulunmuştur. Bu da OHRQoL ile periodontitis arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Ayrıca periodontitisin evre-derecesi ve semptomları da düşük yaşam kalitesi ile ilişkilendirilmiştir [29]. Periodontal tedavi öncesi ve sonrasında periodontal risk taşıyan hastalarda OHQoL-UK araştıran İngiltere' de yürütülen bir çalışmada; çalışmaya katılan çoğu bireyin, ağız sağlığının yaşam kalitelerini etkilediğini ve OHQoL-UK' nin sosyodemografik ve ağız sağlığı faktörleriyle ilişkili olduğunu iddia edilmiştir [30]. Çalışmamızda periodontitis ile OHRQoL-UK ölçeği arasında anlamlı bir ilişki bulunmasa da, periodontitis ile ilişkili sistemik hastalık varlığında ve diş kaybı arttıkça OHQoL-UK skorlarının arttığı gösterilmiştir. Elde edilen düşük skorun ağız sağlığı ile ilişkili yaşam kalitesinin düşük olduğunu gösteren bu ölçek ile elde ettiğimiz sonuçlar sistemik hastalık varlığı ve diş kaybı sayısının fazla olduğu hastalarda diğer hastalara kıyasla yaşam kalitesinde azalma olduğunu göstermektedir.

Malezya' da 2019 yılında yapılan bir çalışmada, ağız sağlığıyla ilişkili yaşam kalitesi, katılımcıların beslenme durumu ile anlamlı bir şekilde ilişkili bulunmuş, ağız sağlıklarını zayıf algılayan yaşlı bireylerin, ağız sağlıklarını iyi olarak algılayanlara kıyasla daha iyi VKİ' ye sahip olma olasılığı daha yüksek görülmüştür [31]. Bu çalışmanın sonucu; bireyin, ağız sağlığının kendi yaşam kalitesi ve genel sağlığını nasıl etkilediğini kişisel olarak algıladığı ölçek olan OHIP-14 ile VKİ alt grupları arasında bulduğumuz anlamlı farklılığı destekler niteliktedir.

Kesitsel bir çalışmada OHQoL değerlendirmek için bir araç olan GOHAI, ağız sağlığının öznel bir ölçüsü olarak kullanılmış ve yaşlıların beslenme durumu ise MNA kullanılarak değerlendirilmiştir. Yaşlıların diş kaybı ve diş çürüğü için tedavi gereksiniminin karşılanmadığı durumda, kötü beslenme olasılığının arttığı gösterilmiş ve yaşam kalitesinden ödün verilmesiyle ilişkilendirilmiştir [32]. Tahran' da 2009 yılında 65 yaş üstü 221 hasta ile yapılan bir çalışmada, hastaların %3,2' si malnütre, %43,4' ü risk altında saptanmıştır [33]. 2013 yılında yapılan bir geçerlilik çalışmasında ise, çalışmaya alınan hastaların 214' üne MNA yapılmış; %55,1' inin normal, %29,9' unun riskli ve %15' inin malnütre olduğu belirlenmiştir [34] Bu çalışmaların bulguları çalışmamızdaki bulgularla (normal beslenmiş (≥ 24): %66,67, risk altında (17-23,5 arasında): %30,3 ve malnütre (<17): %3,03) benzer niteliktedir.

Schuit ve arkadaşlarının Hollandalı yaşlı bireyler üzerinde yaptığı bir çalışmada; kadınlar, erkeklerden daha yüksek PASE puanları almışlardır. Erkekler ve kadınlar arasındaki PASE puanları arasındaki farkın kadınların daha fazla ve ağır ev işi yapmaları ve başkalarının bakımından sorumlu olmaları nedeniyle ortaya çıktığını düşünmüşlerdir [35]. Washburn ve arkadaşlarının Amerikalı yaşlı bireyler üzerinde yaptığı başka bir çalışmada ise, erkeklerin özellikle daha fazla bahçe işlerine katılımı sebebiyle PASE puanlarının daha yüksek bulunduğu görülmüştür [36]. Çalışmamızda ise PASE skorları erkeklerde kadınlardan daha yüksek bulunmuş ve aylık gelir yükseldikçe bu skor artmıştır. PASE anketinin geçerliğinin ortaya konduğu bir çalışmada, çalışmamızda da olduğu gibi erkek hastaların kadınlara göre daha yüksek fiziksel aktiviteye katıldığı ve daha yüksek PASE puanı aldığı belirlenmiştir [37]. Bahsedilen çalışmalar arasındaki bu farklılıklar, Amerikalı, Hollandalı ve Türk katılımcılar arasındaki günlük yaşam ve kültürel farklılığa bağlı olabilir.

Çalışmamızın bulguları hem periodontal sağlık durumları hem de kullanılan indeks skorları değerlendirildiğinde, çalışma amacımıza uygun olarak değerli ön bilgiler veriyor olsa da çalışmamızın bazı limitasyonları bulunmaktadır. Kesitsel çalışmaların hepsinde olduğu gibi primer limitasyonumuz spesifik bir neden sonuç ilişkisi kurulamamasıdır. Ayrıca çalışma popülasyonumuz Akdeniz Bölgesi'nde bulunan ve Isparta' da yaşayan, ayrıca sadece hastaneye başvuran geriatric popülasyonu içerdiğinden, bunun yanı sıra dönemsel olarak normalde hastaneye başvuracak olan geriatric popülasyonun da büyük bir çoğunluğunun pandemi önlemleri çerçevesinde evden çıkmaktan kaçınması nedeniyle ne Isparta' nın ne de ülkemizin geriatric popülasyonunu temsil etmemektedir. Dolayısıyla bulgularımız konu ile ilgili bazı fikirler oluşturmakta olsa da genellenemez.

Yukarıda belirtildiği gibi Covid-19 döneminde yürütülen bir çalışma olduğu için popülasyonumuzun büyüklüğü sınırlı kalmış, planlanan sayıya ne yazık ki ulaşamamıştır. Bu durum yeni ve güncel sınıflamaya uygun olarak periodontitisin her evresinde yeterli sayıda bireyin olmamasının yanı sıra periodontal sağlıklı bireylerin de olmamasıyla sonuçlanmış ve periodontal durum ile bahsedilen ölçekler arasındaki korelasyonların yorumlanmasını güçleştirmiştir.

Ancak çalışmamızın güçlü yönleri de bulunmaktadır. Çalışmamız, geriatric bireylerin genel yaşam kalitesi ve günlük alışkanlıklarını beş ayrı indeks üzerinden geniş çaplı değerlendiren bir çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Sonuç olarak, periodontal durum, incelenen geriatric popülasyonda yaşam stili ve kalitesiyle alakalı test skorları üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir. COVID-19 pandemi döneminde yürütülmüş bu çalışmanın bulguları daha geniş yaşlı popülasyonlarında farklılık gösterebilir. Yaşlı bireylerdeki dental ve periodontal hastalıkların varlığı ile bu hastalıkların oluşma ve ilerleme durumunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve kontrol altına alınması; yaşlı bireylerin yaşam kalitesinin artırılmasına, koruyucu ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesine önemli bir etki oluşturacaktır. Ülkemizde yaşlı popülasyonun periodontal sağlık durumunu ve yaşam kalitesini etkileme potansiyeli olan faktörlerin değerlendirildiği daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

[1] WHO. 1972. Psychogeriatric, report of a WHO Scientific Group, Technical Reports Series 507, Geneva. Cited in Davise AM. Epidemiology 185, 14(1):9-21.

[2] TurkStat Publication Group. 2015. Turkey in Statistics In Turkish. Turkish Statistical Institute. TUIK publication, Ankara, 4431s.

[3] Duyar, I. 2008. Gerontolojinin Temelleri. ss 9-19. Mas, R., Işık, A. T., Karan, M. A., Beğler, T., Akman, Ş., Ünal, T. ed. 2008. Geriatri, Türk Geriatri Vakfı, Ankara.

- [4] Birren, J. E. 1959. Principles of research on aging. ss 3–42. Birren, J. E. (ed.), Handbook of Aging and the Individual: Psychological and Biological Aspects. University of Chicago Press, Chicago, 187s.
- [5] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390).
- [6] Scannapieco, F. A., Cantos, A. 2016. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: implications for the elderly. *Periodontology* 2000, 72(1), 153–75.
- [7] Lamster, I. B., Asadourian, L., Del Carmen, T., Friedman, P. K. 2016. The aging mouth: differentiating normal aging from disease. *Periodontology* 2000, 72(1), 96–107.
- [8] Velasco-Ortega, E., Segura-Egea, J. J., Córdoba-Arenas, S., Jiménez-Guerra, A., Monsalve-Guil, L., López-López, J. 2013. A comparison of the dental status and treatment needs of older adults with and without chronic mental illness in Sevilla, Spain. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 18(1), e71–75.
- [9] Koopmann, C. F., Jr, Coulthard, S. W. 1982. The oral cavity and aging. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 15(2), 293–312.
- [10] Dipietro, L., Caspersen, C. J., Ostfeld, A. M., Nadel, E. R. 1993. A survey for assessing physical activity among older adults. *Medicine And Science in Sports and Exercise*, 25(5), 628–642.
- [11] Ayvat, E., Kiliç, M., Kirdi, N. 2017. The Turkish version of the Physical Activity Scale for the Elderly (PASE): its cultural adaptation, validation, and reliability. *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 47(3), 908–915.
- [12] Locker, D. 1988. Measuring oral health: a conceptual framework. *Community Dental Health*, 5(1), 3–18.
- [13] Slade, G. D., Spencer, A. J. 1994. Social impact of oral conditions among older adults. *Australian Dental Journal*, 39(6), 358–364.
- [14] Muldoon, M. F., Barger, S. D., Flory, J. D., Manuck, S. B. 1998. What are quality of life measurements measuring? *British Medical Journal*, 316(7130), 542–545.
- [15] Tubert-Jeannin, S., Riordan, P. J., Morel-Papernot, A., Porcheray, S., Saby-Collet, S. 2003. Validation of an oral health quality of life index (GOHAL) in France. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 31(4), 275–284.
- [16] Yıldız, S., Işık, G. 2012. Effects of Prosthesis on Oral Health and Quality of Life in Geriatric Patients. *Istanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 46(1):11-16.
- [17] Vellas, B., Villars, H., Abellan, G., Soto, M.E., Rolland, Y., Guigoz, Y., Morley, J.E., Chumlea, W., Salva, A., Rubenstein, L.Z., Garry, P. 2006. Overview of the MNA--Its history and challenges. *The Journal Of Nutrition, Health & Aging*, 10(6):456-463.
- [18] Crogan, N.L., Pasvogel, A. 2003. The influence of protein-calorie malnutrition on quality of life in nursing homes. *The Journals of Gerontology Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 58(2):159-164.
- [19] Guigoz, Y., Vellas, B. 1999. The Mini Nutritional Assessment (MNA) for grading the nutritional state of elderly patients: presentation of the MNA, history and validation. *Nestle Nutrition Workshop Series Clinical Performance Programme*, 1, 3–12.
- [20] Rakıcıoğlu N. 2009. ss 115-120. Yaşlılık Döneminde Malnütrisyona Saptanması. *Geriatrici, yaşlı sağlığına multidisipliner yaklaşım, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, 21 s.*
- [21] Cashin, K., Oot, L. 2022. Guide to anthropometry: a practical tool for program planners, managers, implementers. Food and Nutrition Technical Assistance III Project (FANTA) <https://www.fantaproject.org/sites/default/files/resources/FANTA-Anthropometry-Guide-May2018.pdf> (Erişim Tarihi: 09.04.2022).
- [22] World Health Organization WHO. 2006. Anthro Survey Analyser and other tools. <http://www.who.int/childgrowth/software/en/> (Erişim Tarihi: 09.04.2022).

- [23] Sarlati, F., Akhondi, N., Etehad, T., Neyestani, T., Kamali, Z. 2008. Relationship between obesity and periodontal status in a sample of young Iranian adults. *International Dental Journal*, 58(1):36-40.
- [24] Sözmen, K., Ünal, B., Sakarya, S., Dinç, G., Yardım, N., Keskinılıç, B., Ergör, G. 2016. Türkiye'de Antropometrik Ölçüm Yöntemlerinin Kardiyovasküler Hastalık Riski İle İlişkisi *Dicle Medical Journal*, 43 (1), 99-106.
- [25] Ng, S. K., Leung, W. K. 2006. Oral health-related quality of life and periodontal status. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 34(2), 114–122.
- [26] Slade, G. D., Sanders, A. E. 2011. The paradox of better subjective oral health in older age. *Journal of Dental Research*, 90(11), 1279–1285.
- [27] Paśnik-Chwalik, B., & Konopka, T. 2020. Impact of periodontitis on the Oral Health Impact Profile: A systematic review and meta-analysis. *Dental and Medical Problems*, 57(4), 423–431.
- [28] Sødal, A. T. T., Skudutyte-Rysstad, R., Diep, M. T., Koldslund, O. C., Hove, L. H. 2022. Periodontitis in a 65-year-old population: risk indicators and impact on oral health-related quality of life. *BMC Oral Health*, 22(1):640.
- [29] Nisanci Yılmaz, M. N., Bulut, S., Bakırarar, B. 2022. Impact of stage-grade of periodontitis and selfreported symptoms on oral health-related quality of life. *International Journal of Dental Hygiene*, 20(2), 291–300.
- [30] McGrath, C., Bedi, R. 2002. Population based norming of the UK oral health related quality of life measure (OHQoL-UK). *British Dental Journal*, 193(9), 521–517.
- [31] Rosli, T. I., Chan, Y. M., Kadir, R. A., Hamid, T. A. A. 2019. Association between oral health-related quality of life and nutritional status among older adults in district of Kuala Pilah, Malaysia. *BMC Public Health*, 19(Suppl 4), 547-553.
- [32] Wu, L. L., Cheung, K. Y., Lam, P. Y. P., Gao, X. L. 2018. Oral health indicators for risk of malnutrition in elders. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 22(2), 254–261.
- [33] Amirkalali, B., Sharifi, F., Fakhrzadeh, H., Mirarefin, M., Ghaderpanahi, M., Larijani, B. 2010. Evaluation of the Mini Nutritional Assessment in the elderly, Tehran, Iran. *Public Health Nutrition*, 13(9), 1373–1379.
- [34] Sarıkaya, D. 2013. Geriatrik hastalarda mini nütrisyonel değerlendirme (mna) testinin uzun ve kısa (mna-sf) formunun geçerlilik çalışması. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 24s, Ankara.
- [35] Schuit, A. J., Schouten, E. G., Westertep, K. R., Saris, W. H. 1997. Validity of the physical activity scale for the elderly (PASE): according to energy expenditure assessed by the doubly labeled water method. *Journal of Clinical Epidemiology*, 50(5), 541–546.
- [36] Washburn, R. A., Smith, K. W., Jette, A. M., Janney, C. A. 1993. The physical activity scale for the elderly (PASE): development and evaluation. *Journal of Clinical Epidemiology*, 46(2), 153–162.
- [37] Washburn, R. A., McAuley, E., Katula, J., Mihalko, S. L., Boileau, R. A. 1999. The physical activity scale for the elderly (PASE): evidence for validity. *Journal of Clinical Epidemiology*, 52(7), 643–651.

Hidroksizinin Tablet Formülasyonunda Analizi için Yeni Bir RP-HPLC Tekniği

A Novel RP-HPLC Technique for the Analysis of Hydroxyzine in Tablet Formulation

İkbal Demet NANE ^{1*} 

¹ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kozmetik Teknolojileri Programı, Isparta, Türkiye



Ö Z

Alerji ilaçları, alerjik reaksiyonları hafifletmek ve semptomları kontrol altına almak için kullanılan farmasötik ürünlerdir. Günümüzde alerji ilaçlarının önemi, artan alerjik hastalık prevalansı ve semptomların etkili bir şekilde yönetilmesinin gerekliliği nedeniyle giderek artmaktadır. Bu çalışmada alerjik bir ilaç olan hidroksizinin tayin edilmesinde yeni bir metot önerilmiştir. Bu çalışmanın amacı, tablet formundaki piperazin türevi ilaç etken maddesi hidroksizini analiz etmek için bir RP-HPLC metodu geliştirmek ve doğrulamaktır. Optimum sıvı kromatografik ayırma koşullarını belirlemek için mobil faz pH'ı ile alıkonma süresi arasındaki korelasyona dayanan sistematik bir yaklaşım kullanılmıştır. Hidroksizinin tayini, Xbridge C18 kolonunda (3 µm, 150 x 4,6 mm, I.D.), pH 6'ya ayarlanmış %45 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımında sağlanmıştır. Çalışma 0,8 mL/dakika akış hızında, 37 °C kolon sıcaklığı ve 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksizin, metot validasyonu, piperazin, RP-HPLC

Alınış / Received: 06.05.2023 Kabul / Accepted: 22.06.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

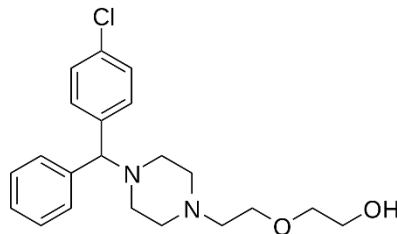
Allergy medications are pharmaceutical products used to alleviate allergic reactions and control symptoms. The importance of allergy medications in today's world is increasingly recognized due to the rising prevalence of allergic diseases and the necessity for effective symptom management. In this study, a new method is proposed for the determination of hydroxyzine, an antiallergic drug. The aim of this research was to develop and validate an RP-HPLC method to analyze the piperazine-derived drug active ingredient hydroxyzine in tablet form. A systematic approach based on the correlation between mobile phase pH and retention time was used to determine the optimum liquid chromatographic separation conditions. The determination of hydroxyzine was achieved on an Xbridge C18 column (3 µm, 150 x 4.6 mm, I.D.) in an acetonitrile-water binary mixture containing 45% (v/v) acetonitrile adjusted to pH 6. The run was performed at a flow rate of 0.8 mL/min, column temperature of 37 °C and wavelength of 230 nm.

Keywords: Hydroxyzine, method validation, piperazine, RP-HPLC



1. Giriş

Alerji maruziyetleri, hafif lokalize reaksiyonlardan hayatı tehdit eden anafilaksiye kadar değişmektedir. Yaş, cinsiyet, alerjinin türü gibi klinik faktörlerin bir araya gelmesiyle alerji büyük oranda tedavi edilebilmektedir [1]. Histamin, ani alerjik reaksiyonların önemli bir aracısıdır. Biyolojik bir amin olan histamin; vücuttaki etkisini 4 reseptöre (H1, H2, H3 ve H4) bağlanarak gösterir [2]. H1 reseptörleri alerji ve iltihaplanmalar ile ilgili bir bölgedir. Bu reseptör grubu sinirler, solunum epitel, hepatik hücreler, düz kas hücreleri, dendritik hücreler ve lenfositler dahil olmak üzere birçok doku ve hücre ile ifade edilir [3-4]. Histamin solunum yolundaki düz kasın kasılmasını sağlar, geçirgenliği artırır ve H1 reseptörünü aktive eder. Bu nedenle, eritem, kaşıntı ve ödem gibi deride gözlenen semptomlar da dahil olmak üzere hemen hemen tüm ani aşırı duyarlılık reaksiyonları, H1'in aktivasyonu ile ortaya çıkabilir [5-6]. Antihistaminikler ise histaminlerin dokularda bağlandıkları reseptörlere onlardan önce bağlanarak vücutta oluşabilecek semptomları önlemeye yardımcı olur. Bu çalışmada analizi yapılan hidroksizin; 2-[2-[4-[(4-klorofenil)-fenilmetil]piperazin-1-il]etoksietanol, kaşıntı, mide bulantısı, anksiyete ve gerginlik semptomları için kullanılan, çoklu farmakolojik etkilere sahip en sık reçete edilen antihistaminiklerden biridir. Aynı zamanda bu ilaç antihistaminik etkisi güçlü bir H1 reseptör antagonisti ve piperazin türevidir [7].



Şekil 1: Hidroksizinin kimyasal yapısı

Farmasötik bileşiklerin gerçek numunelerde saptanması ve izlenmesi çok önemlidir ve literatürde önerilen çeşitli yöntemler vardır. Hidroksizinin gaz kromatografisi [8], ince tabaka kromatografisi [9], miseller sıvı kromatografisi [10], kapiller elektroforez [11], voltametik yöntem [12], sıvı kromatografik-

kütle spektrometresi (LC-MS) [13]; potansiyometri [14-15]; gravimetri [16], titrimetri [17-19] ve ters faz sıvı kromatografi (RP-HPLC) [20-21] gibi pek çok farklı yöntemle analizi gerçekleştirilmiştir. Ters faz sıvı kromatografi haricinde bildirilen yöntemlerin çoğu, analizden önce numune ön işlemi ve ilaç ekstraksiyonu gerektirmektedir. Bu çalışmada tercih edilen ters faz sıvı kromatografi ile özellikle molekül yapılarında, yüksek polar yüzey alanına sahip olma özelliği sağlayan (-OH, -NH₂, COO⁻ ve NH₃⁺) grupları bulunduran analitlerin tayini yapılabilmektedir. Bu durum verimin maksimum, alıkonma süresinin minimumda olmasıyla ilişkilidir [22]. Çalışmada kullanılan hidroksizin, yapısında bulundurduğu fenil grupları ve piperazin halkasının konumundan dolayı RP-HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu yöntem, hareketli fazın moleküler yapı ile etkileşerek hidroksizin gibi yeni nesil ilaçlar için seçici, düşük maliyetli, kararlı ve kullanımı kolay bir analiz sunmaktadır.

Bu çalışmada hidroksizinin kalitatif tayini için sabit kolon sıcaklığında, mobil faz pH'ına ve mobil fazdaki organik modifiyer konsantrasyonuna bağlı olarak kapasite faktörü (k) değerlerindeki değişim incelenerek optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Bileşiklerin tayini için mümkün olan en kısa sürede analiz yapılması amacıyla geliştirilen metot ile Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) parametrelerine göre valide edilmiş ve daha sonra ilaç formülasyonunda kantitatif tayin yapılmıştır [23]. Daha önce geliştirilen analitik yöntemlere göre, hidroksizin tayini için sağlam, hızlı, hassas, seçici, doğru ve kesin RP-HPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Cihazlar

Bu çalışmada bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı (Shimadzu Teknoloji, Japonya) ile yapılmıştır. Kullanılan sistem UV dedektörü (SPD-20A), pompa (LC-20AD), kolon fırını (CTO-20A) ve degazer ünitesinden (DGU-20A3) oluşmaktadır. Kromatografik ayırma için hazırlanan mobil faz pH ölçümleri, Mettler Toledo pH/İyon analiz cihazı (Schwerzenbach, İsviçre) ve In Lab 413 Ag/AgCl pH elektrodu kullanılarak yapılmıştır. Ultra saf su ise, Direct-Q® 3 UV (Millipore, Bedford, MA, ABD) su arıtma sisteminden sağlanmıştır.

Kimyasallar

Bu çalışmada hidroksizin, siklizin (iç standart) ve urasil Sigma-Aldrich'ten (ABD) temin edilmiştir. Mobil fazın hazırlanmasında organik çözücü olarak asetonitril, mobil fazda tampon bileşenleri olarak o-fosforik asit, sodyum hidroksit, amonyum bikarbonat ve amonyak, elektrot kalibrasyonu için referans standart potasyum hidrojen ftalat Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Kromatografik Koşullar

Bu çalışmada, hidroksizinin kromatografik tayini için mobil faz olarak farklı pH değerlerinde, %45 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımları hazırlanmıştır. Mobil faz pH'sının ayarlanmasında tampon olarak fosfat ve amonyak-amonyum klorür tamponu tercih edilmiş ve mobil fazlar içerisinde kullanılan o-fosforik asit ve amonyum klorür derişimi 30 mM'da sabit tutulmuştur. Her bir enjeksiyon 20 µL olacak şekilde sabit hacimde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma, Xbridge C18 kolonunda (3 µm, 150 x 4,6 mm) gerçekleştirilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanıp, akış hızı 0,8 mL/dak ve enjeksiyon hacmi 20 µL'de tutulmuştur. UV dedektörü 230 nm dalga boyuna ayarlanmıştır.

Standart Maddelerin ve Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Analiz edilen bileşiğin ve iç standardın (100 µg/mL) stok çözeltileri mobil fazda çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler, güneş ışığından korumak için +4°C'de, karanlıkta saklanmıştır. Lineer çalışma aralığı belirlenen hidroksizin için kalibrasyon çözeltileri optimum su-organik ikili karışımda 5-25 µg/mL, konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği için iç standart metodu kullanılmıştır. Bunun için seçilen iç standart siklizin tüm çalışma boyunca 3 µg/mL derişimde sabit tutulmuştur.

Tablet Çözeltilisinde Analiz

Hidroksizinin kantitatif tayini için tablet analizi yapılmıştır. Bu yöntemde on adet tablet (Atarax® 25 mg) ezilerek toz haline getirilmiş ve 1 tablete eşdeğer miktarda tartılmıştır. Ardından bir adet tablet

miktarındaki toz, balon jöjeye aktarılarak mobil faz ilave edilmiş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örnek çözelti belirlenen ilaç etken maddelerinin çözülmesi için çözeltiler ultrasonik banyoda 20 dakika bekletilmiştir. Çözeltide herhangi çözünmeyen bir kısım kalmaması için süzme işlemi uygulanmıştır.

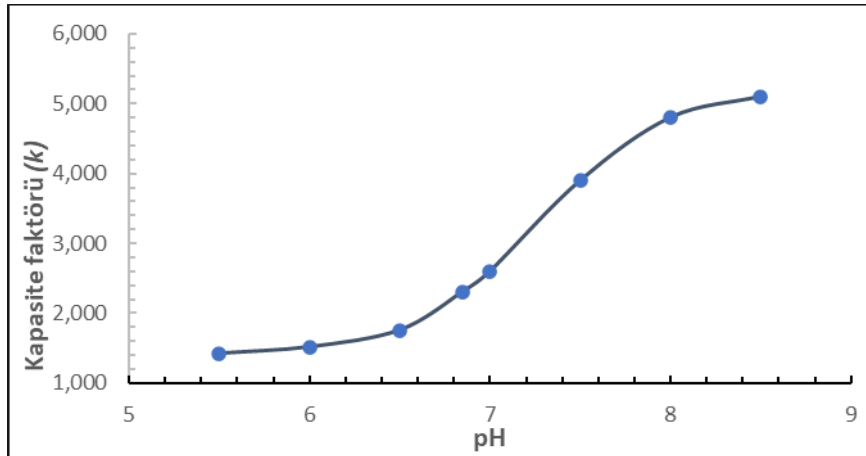
Geri Kazanım Çalışmaları

Çalışma kapsamında, yöntemin doğruluğunu belirlemek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Numuneler, sabit miktarda etken madde içeren tablet numunesine bilinen miktarda saf standart ve seçilen iç standart (siklizin) eklenerek analiz edilmiştir. Geri kazanım yüzdesi, numunedeki etken maddenin konsantrasyonu ve eklenen standart çözelti kullanılarak hesaplanmıştır.

3. Bulgular

Ayırma verimliliğini en üst düzeyde tutabilmek için analitlere uyumlu kolon seçimi yapılması gerekmektedir [24]. Bu çalışmada kullanılan ayırma yöntemi için seçilen kolon; analiz süresince analitlerin hem kantitatif hem de kalitatif olarak tayinlerinde en verimli sonuçları ortaya koymuştur. Yeni nesil kolonlardan bazik bileşiklerin analizine uygun XBridge C18 BEH kolon, (pH 1-12) tercih edilmiştir. Bu kolonların en iyi özelliği kolon içerisindeki silis bileşiğinin çapraz bağlarından dolayı pH, sıcaklık vb. değişimlere karşı çok dirençli olmalarıdır.

Bu çalışmada, alerjik hastalıkların tedavisinde kullanılan hidrosizinin RPLC yöntemi ile kantitatif tayininde optimum ayırma koşulunu belirlemek için mobil faz optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bileşiklerin pKa değerleri kullanılarak moleküler veya iyonize halde buldukları pH değerlerini belirlemek mümkündür. Bunun için pKa değerinin 1,5 birim üstü ve altındaki pH değerleri çalışma pH aralıkları olarak belirlenir. Bu amaçla kromatografik koşullar sabit tutularak kolon sıcaklığı, mobil fazın asetonitril konsantrasyonu ve pH değişiminin bileşiklerin kapasite faktörü üzerindeki etkileri araştırılmıştır [25-26]. Standart urasil çözeltisi (t_0), k değerinin hesaplanması için kullanılmıştır. İncelenen her bir pH değerindeki (5,5 – 8,5), k değerleri, %45 (v/v) içeren asetonitril-su ikili karışımındaki bileşiklerin t_R ve t_0 değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. %45 asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımında değişen pH değerlerine karşı kapasite faktörlerinin değişimi Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2: Hidrosizinin mobil faz pH'ı ile k değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoidal grafik

Sıvı kromatografik tayinde optimum kromatografik ayırma koşulunun sağlanabilmesi için; k değerinin ≥ 1 olması, seçicilik faktörü (α)nın 1,15'ten büyük ve ayırma gücü (R_s) değerinin 1,5'ten büyük olması beklenir. Ayırma işlemi, kromatografik analizde mümkün olan en kısa sürede gerçekleşmelidir. Bunun için, pH 6,0'a ayarlanmış %45 (v/v) asetonitril içeren bir asetonitril-su ikili karışımı, belirtilen kromatografik parametrelerin sağlandığı koşul olarak belirlenmiştir.

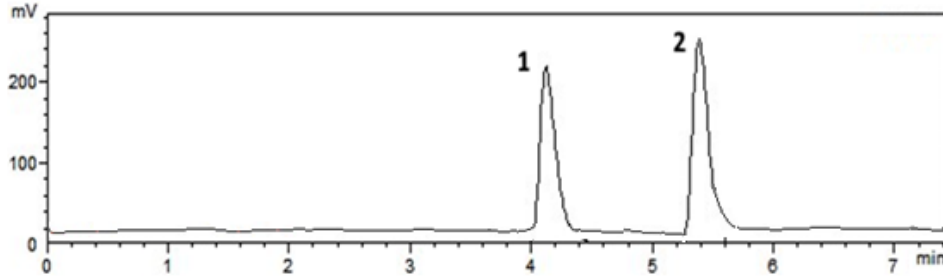
Kantitatif bir analizde analitik ölçümlerdeki hataları telafi etmek için iç standart (İS) metodu kullanılmalıdır. İlaç formülasyonlarındaki katkı maddeleri ve numune enjeksiyonu sırasındaki hacim hataları gibi sistematik ve rastgele hataları elimine etmek için İS yöntemi tercih edilmektedir [27-29]. İç

standart seçilirken; optimum ayırma koşulları altında belirlenen bileşiklerden kromatografik olarak ayrılması şartı aranmaktadır. Bu çalışmada İS olarak siklizinin seçilmiştir. Purnell eşitliği (Eş. 1); α , R_s ve k değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Belirlenen koşuldaki mobil faz ortamında, Purnell denkleminde göre hesaplanan değerler Tablo 1'de verilmiştir. Optimum ayırma koşulları altında elde edilen kromatogram ise, Şekil 3'te verilmiştir.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[\frac{\alpha-1}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{(1+k_2)} \right] \quad (1)$$

Tablo 1: Belirlenen optimum koşula ait değerler

Bileşik	k	α	$(\alpha-1)/\alpha$	$(k_2)/(k_2+1)$	$1/4\sqrt{N}$	R_s
Siklizin (İS)	1,167					
Hidroksizin	1,795	1,538	0,350	0,642	22,853	5,133



Şekil 3: Belirlenen optimum ayırma koşuluna göre elde edilen kromatogram 1) Siklizin (İS), 2) Hidroksizin

Bu çalışmada hidroksizinin kantitatif tayini için metot validasyonu yapılmıştır. Optimum ayırma koşulları belirlendikten sonra, kromatografik olarak sistem uygunluk parametreleri Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) yönergesine göre belirlenmiştir. Bu amaçla bileşikler HPLC sistemine üç tekrarlı olarak enjekte edilerek kromatografik parametreler hesaplanmış ve referans değerlere uygunluğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Bileşikler için sistem uygunluk parametreleri

Parametre	Siklizin (İS)	Hidroksizin	Referans değerler
Alıkonma zamanı (t_R)	4,268	5,505	-
Kuyruklanma faktörü (T_f)	1,957	1,321	≤ 2
Alıkonma (kapasite) faktörü (k)	1,168	1,796	≥ 1
Ayırma gücü (R_s)	-	5,133	≥ 2
Teorik tabaka sayısı (N)	4070	8356	> 2000
Seçicilik faktörü (α)	-	1,538	> 1
RSD% (t_R , alıkonma zamanı için)	0,129	0,064	≤ 1
RSD% (pik alanı için)	0,406	0,884	≤ 1

USP'ye göre sistem uygunluk parametrelerinin sonuçları (Tablo 2), geliştirilen kromatografik yöntemin analiz ve analitik yöntem validasyonu için uygun olduğunu göstermiştir. Sistem uygunluk testinde, bileşiğin alıkonma süreleri ve pik alanlarının %RSD'si %2'nin altındadır. Bu durum, tekrarlanabilir enjeksiyonlardaki değişimin küçük olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığını belirlemek için kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 3'te sunulmuştur. Hidroksizin için tayin limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ); 3,3:1 ve 10:1 sinyal/gürültü oranlarına göre belirlenmiştir. Sonuçlar, korelasyon katsayısının >0,999 olması gerektiğini belirten ICH yönergesine göre kabul kriterlerini karşılamaktadır.

Tablo 3: Hidroksizine ait kalibrasyon doğrusu parametreleri

Parametreler	Hidroksizin
Regresyon Denklemi	$y=0,424x-0,404$
Eğimin standart hatası	0,009
Kesimin standart hatası	0,149
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Derişim Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	5-25
Tayin limiti (LOD, $\mu\text{g/mL}$)	1,104
Kantitatif tayin limiti (LOQ, $\mu\text{g/mL}$)	3,347

Hidroksizinin analizi için yapılan kesinlik çalışmalarında gün içi ve günler arası analizler, iki farklı konsantrasyon için aynı gün, üç farklı zaman ve bu konsantrasyonların üç farklı günde enjekte edilmesi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar Tablo 4'te gösterilmiştir. Burada beş tekrarlı yapılan analizlerden hesaplanan sonuçların bağıl standart sapma (% RSD) değerleri %2'nin altındadır ve kesinlik verileri için yeterlidir.

Tablo 4: Hidroksizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları

Bileşik	Teorik derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Gün içi derişim ortalaması	% RSD ($\mu\text{g/mL}$)	Günler arası derişim ortalaması	% RSD ($\mu\text{g/mL}$)
Hidroksizin	10,000	10,254	0,117	9,790	0,358
	20,000	21,343	0,403	18,058	0,814

Analitik bir yöntemin doğruluğu, kabul edilen referans değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade etmektedir. Geri kazanım deneyleri, ticari formülasyonlara katkı yapılarak gerçekleştirilmiştir. 25 mg hidroksizin etken maddesini içeren Atarax ® tablet formülasyonunda kantitatif tayin ve geri kazanım çalışması üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Belirli bir derişimdeki standart madde eklenerek doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Hesaplanan veriler Tablo 5'te verilmiştir. Hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri, yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu ve numune ortamındaki yardımcı maddelerin herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

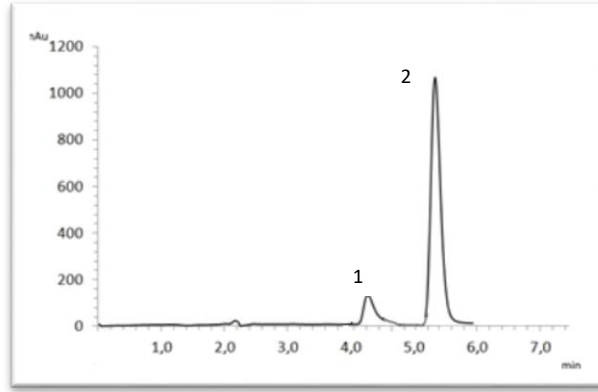
Hidroksizin için ortalama geri kazanım yüzdesi, bu değer %95-105 arasında olması gerektiğini belirten ICH yönergesine uygundur [23].

Tablo 5: Hidroksizinin tablet formülasyonunda gerçekleştirilen geri kazanım deneylerine ait bulgular

Hidroksizin		
	Bulunan miktar	Geri kazanım (%)
1	25,576	102,306
2	25,178	100,714
3	25,599	102,395
$X_{ort} \pm GS^*$	25,451 \pm 0,587	101,805 \pm 2,348
SS	0,233	0,236
BSS	0,979	0,929
%Hata	-1,805	-

*Güven aralığı %95 güven seviyesinde verilmiştir.

Tablet numunesinde gerçekleştirilen kromatografik tayini gösteren kromatogram Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4: Hidroksizin içeren Atarax® (25 mg) tablet için hazırlanan kromatogram, 1-Siklizin (3 µg/mL, İS); 2-Hidroksizin (20 µg/mL)

4. Tartışma ve Sonuç

Hidroksizinin tayini için literatürde deneme yanılma metodu ile yapılmış çalışmalar vardır. Bu çalışma ile mobil faz pH'sı ve bileşiğin kapasite faktörü değerleri arasındaki ilişkiden yararlanarak sistematik bir çalışma ile optimum tayin koşulu belirlenmiştir. Geliştirilen metodun kesinliği ve doğruluğunun yeterli olduğu metod validasyonun çalışması ile belirlenmiştir. RPLC analizi ile tablet formülasyonlarındaki bileşiğin kantitatif analizinde kesinliğin belirlenmesinde RSD değeri %2'nin altında hesaplanmıştır. Seçilen ticari tabletlerdeki hidroksizin miktarı (Atarax, 25 mg), hesaplanan miktarları ile uyum içinde bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar geliştirilen metodun rutin kullanıma uygun olduğunu göstermiştir.

Teşekkür

Bu projenin mali desteği için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (4826-D2-16) teşekkür ederim.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

- [1] Pettersson, M. E., Koppelman, G. H., Flokstra-de Blok, B. M., Kollen, B. J., & Dubois, A. E. 2018. Prediction of the severity of allergic reactions to foods. *Allergy*, 73(7), 1532-1540.

- [2] Maintz, L., & Novak, N. 2007. Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, 85(5), 1185-1196
- [3] Thurmond, R. L., Desai, P. J., Dunford, P. J., Fung-Leung, W. P., Hofstra, C. L., Jiang, W., ... & Karlsson, L. 2004. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1), 404-413.
- [4] Laszlo, V., Rothe, G., Hegyesi, H., Szeberenyi, J. B., Orsó, E., Schmitz, G., & Falus, A. 2001. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflammation Research*, 50, 428-434.
- [5] Simons, F. E. R. 2004. Advances in H1-antihistamines. *New England Journal of Medicine*, 351(21), 2203-2217.
- [6] Schaefer, U., Schmitz, V., Schneider, A., & Neugebauer, E. 1999. Histamine induced homologous and heterologous regulation of histamine receptor subtype mRNA expression in cultured endothelial cells. *Shock (Augusta, Ga.)*, 12(4), 309-315.
- [7] Dimitriadou, V., Pang, X., & Theoharides, T. C. 2000. Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. *International journal of immunopharmacology*, 22(9), 673-684.
- [8] Kintz, P., Godelar, B., & Mangin, P. 1990. Gas chromatographic identification and quantification of hydroxyzine: application in a fatal self-poisoning. *Forensic science international*, 48(2), 139-143.
- [9] Ackermann, H., Kretzschmann, F., Krüger, S., & Lexow, B. 1977. Thin-layer chromatographic technic for the semiquantitative determination of hydroxyzine residues in animal material. *Die Nahrung*, 21(7), 603-610.
- [10] Martinez-Algaba, C., Bermudez-Saldana, J. M., Villanueva-Camanas, R. M., Sagrado, S., & Medina-Hernández, M. 2006. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(2), 312-321.
- [11] Capella-Peiro, M. E., Bossi, A., & Esteve-Romero, J. 2006. Optimization by factorial design of a capillary zone electrophoresis method for the simultaneous separation of antihistamines. *Analytical biochemistry*, 352(1), 41-49.
- [12] Beltagi, A. M., Abdallah, O., & Ghoneim, M. M. 2008. Development of a voltammetric procedure for assay of the antihistamine drug hydroxyzine at a glassy carbon electrode: Quantification and pharmacokinetic studies. *Talanta*, 74(4), 851-859.
- [13] Zhou, N., Liang, Y. Z., Chen, B. M., Wang, P., Chen, X., & Liu, F. P. 2007. Development and validation of LC-MS method for the determination of hydroxyzine hydrochloride in human plasma and subsequent application in a bioequivalence study. *Chromatographia*, 66, 481-486.
- [14] Bouklouze, A., Elbouzekraoui, M., Cherrah, Y., Hassar, M., & Kauffmann, J. M. 2002. Potentiometric sensor for hydroxyzine determination. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14(19-20), 1369-1374.
- [15] Ciaccio, L. L., Missan, S. R., McMullen, W. H., & Grenfell, T. C. 1957. Nonaqueous titration of 1, 4-Disubstituted piperazines. *Analytical Chemistry*, 29(11), 1670-1673.
- [16] Pasich J, Stasiewska K. 1962. Simple gravimetric determination of hydroxyzine, diprophyllyne, chlorpromazine and ethionamide in suppositories. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 1962;(19):181-182.
- [17] Basavaiah, K., & Charan, V. S. 2002. Titrimetric and spectrophotometric assay of some antihistamines through the determination of the chloride of their hydrochlorides. *Il Farmaco*, 57(1), 9-17.
- [18] Rajendraprasad, N., & Basavaiah, K. 2013. Titrimetric assay of hydroxyzine dihydrochloride in pharmaceuticals and formulations in non-aqueous medium. *International Journal of PharmTech Research*, 5(1), 105-111.
- [19] Rajendraprasad, N., Basavaiah, K., Vinay, K. B., & Revanasiddappa, H. D. 2010. Sensitive and selective extractive spectrophotometric method for the determination of hydroxyzine dihydrochloride in pharmaceuticals. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 54(4), 233-239.
- [20] Péhourcq, F. 2004. A simple high-performance liquid chromatographic method for detection of hydroxyzine in human plasma after overdose. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 50(1), 41-44.

- [21] Sher, N., Siddiqui, F. A., Fatima, N., Perveen, S., & Shafi, N. 2015. New method development for hydroxyzine determination: application in stability studies, pharmaceutical formulations, and humane serum. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(8), 911-918.
- [22] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. 2011. *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- [23] ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) Harmonized Tripartite Guideline* 2005.
- [24] Daldal, Y. D., & Demiralay, E. Ç. 2022. Development of liquid chromatographic and UV-visible spectrophotometric methods for determination of pKa values of folic acid antimetabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 212, 114647.
- [25] Yılmaz, H., Üstün, Z., & Çubuk Demiralay, E. 2016. RPLC determination of acid dissociation constants and quantitative estimation for sulfasalazine. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 13, 103-110.
- [26] Demiralay, E. Ç., Ürer, F., Üstün, Z., & Daldal, Y. D. 2023. RPLC Method Development And Validation For The Simultaneous Determination Of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors In Tablet Formulations. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(2), 7-7.
- [27] Vonaparti, A., Kazanis, M., & Panderi, I. 2006. Development and validation of a liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric method for the determination of benazepril, benazeprilat and hydrochlorothiazide in human plasma. *Journal of mass spectrometry*, 41(5), 593-605.
- [28] Paszun, S. K., Stanisz, B., & Pawłowski, W. 2012. Rapid and simple stability indicating HPLC method for the determination of cilazapril in pure substance and pharmaceutical formulation in comparison with classic and derivative spectrophotometric methods. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(2), 193-201.
- [29] Kuzucanlı, E., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z., Konçe, İ., & Alsancak, A. G. (2022). Development and validation of RPLC method for the simultaneous analysis of ACE inhibitors in tablet formulations. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*, 4(2), 103-110.

Evaluation of Depression Level and Antidepressant Use of Faculty of Pharmacy Students

Eczacılık Fakültesi Öğrencilerinin Depresyon Düzeyi ve Antidepresan Kullanımının Değerlendirilmesi

Aslınur ALBAYRAK^{1*} , İbrahim EREN² 

¹ Suleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, Isparta, Türkiye,

² Suleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Department of Mental Health and Diseases, Isparta, Türkiye

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to evaluate the level of depression and the use of antidepressants in the faculty of pharmacy.

Material-Method: This study was an online cross-sectional survey and was conducted to Suleyman Demirel University Faculty of Pharmacy 4th and 5th grade students between 1-4 February 2023. The questionnaire consisted of questions about sociodemographic characteristics, Beck Depression Inventory (BDI), and antidepressant use. In the study, the cut-off point for depression was accepted as 17 and above.

Results: The median BDI score of the students was 14 (7-22). 39.2% of the students were depressed and 30.4% were minimally depressed, 29.6% were mildly depressed, 30.4% were moderately depressed and 9.6% were severely depressed. The father's education level and monthly household income were found to be statistically significant in those with a BDI score of 17 and above, compared to a BDI score of 16 and below ($p < 0.05$). Eighteen (14.4%) students were using antidepressants and 38.9% of the students using antidepressants stated that they did not use antidepressants regularly.

Conclusion: According to the results of our study, the level of depression in pharmacy faculty students was found to be high. Most of the students with moderate and severe depression were not taking antidepressant treatment. A significant portion of the students using antidepressants were using antidepressants irregularly. As the pharmacists of the future, they have important roles in patient education and patient compliance. Therefore, more emphasis should be placed on this subject in the courses in the faculty.

Keywords: Antidepressant use, depression, pharmacy students

Alınış / Received: 24.03.2023 Kabul / Accepted: 27.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Amaç: Bu çalışmanın amacı, eczacılık fakültesinde depresyon düzeyi ve antidepresan kullanımının değerlendirilmesidir.

Materyal-Metot: Bu çalışma çevrimiçi kesitsel bir anket olup, Suleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 4. ve 5. sınıf öğrencilerine 1-4 Şubat 2023 tarihleri arasında yapılmıştır. Ankette sosyodemografik özellikler, Beck Depresyon Ölçeği (BDÖ) ve antidepresan kullanımı ile ilgili sorular yer almaktaydı. Araştırmada depresyon için kesme puanı 17 ve üzeri olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: Öğrencilerin BDÖ puan ortancası 14 (7-22)'dir. Öğrencilerin %39,2'si depresifti ve %30,4'ü minimal depresif, %29,6'sı hafif depresif, %30,4'ü orta depresif ve %9,6'sı şiddetli depresiftir. BDÖ puanı 17 ve üzeri olanlarda, BDÖ puanı 16 ve altı olanlara göre babanın eğitim durumu ve aylık hane geliri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). On sekiz (%14,4) öğrenci antidepresan kullanmakta olup, antidepresan kullanan öğrencilerin %38,9'u düzenli olarak antidepresan kullanmadığını belirtmiştir.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarına göre eczacılık fakültesi öğrencilerinde depresyon düzeyi yüksek bulunmuştur. Orta ve ciddi depresyondaki öğrencilerin birçoğu antidepresan tedavi almamaktadır. Antidepresan kullanan öğrencilerin ise önemli bir bölümü antidepresanları düzensiz kullanmaktadır. Geleceğin eczacıları olarak hasta eğitimi ve hasta uyumunda önemli rolleri vardır. Bu nedenle fakültedeki derslerde bu konuya daha fazla ağırlık verilmelidir.

Keywords: Antidepresan kullanımı, depresyon, eczacılık öğrencileri



1. Introduction

Depression is the loss of positive affect, manifested by a range of symptoms such as sleep disturbance, lack of self-care, poor concentration, anxiety, and disinterest in daily life [1]. It is a common illness worldwide and approximately 280 million people are depressed [2].

Depression is also common in university students. A systematic review reported that the prevalence of depression in university students was between 10% and 84% in studies [3]. University years are a critical transition period when students move from adolescence to adulthood and can be one of the most stressful periods in one's life. University years are a critical transition period when students move from adolescence to adulthood and can be one of the most stressful periods in one's life [4]. University students face many problems such as trying to fit in, trying to get good grades, planning for the future and being away from home, worries about their future job and the challenges of working life [4, 5].

In Türkiye, there are studies on this subject that were generally conducted with university students and medical school students [5-9]. In the study conducted by Güler et al. [5] on medical school students, 28.3% of the students and in the study by Yıldız et al. [10] on university students, 16% of the students were found to have moderate depression.

Treatment of depression symptoms includes psychotherapy and the use of antidepressants. Although psychotherapy is the first choice in the treatment of minor symptoms, the use of antidepressants is increasing in young people [11,12]. However, students have little information about adherence with antidepressant treatment [13]. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs), Tricyclic antidepressants (TCAs), Monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), and atypical antidepressants are drugs used in the treatment of depression. SSRIs

are frequently used because of their few side effects [12, 14]. The U.S. Food and Drug Administration has issued a “black box” warning about SSRIs because of the risk of suicidal thoughts posed by these drugs [12, 15].

Pharmacy education includes an intensive curriculum. Intensive study, workload, financial inadequacy, and insufficient sleep are among the main stress factors determined by pharmacy students [16, 17]. Studies have found that depression is common in pharmacy students [18, 19]. In Türkiye, there is a lack of studies on this subject only with pharmacy students. Therefore, the aim of this study is to evaluate the level of depression and the use of antidepressants in the faculty of pharmacy.

2. Material and Method

Study Design and Setting

This study was an online cross-sectional survey and was conducted to Suleyman Demirel University Faculty of Pharmacy 4th and 5th grade students between 1-4 February 2023. The questionnaire was created with Google Forms and distributed to students via the WhatsApp application. On the first page of the questionnaire, information was given about the purpose and definition of the study. Students who wanted to participate in the survey gave their consent before answering the survey. Ethical approval of the study was received by the Suleyman Demirel University Clinical Research Ethics Committee. (Approval Number:23 Date:31.01.2023). In addition, permission was obtained from the dean of the university for the study.

Sample Size

The sample size was 120 people, with a 5% margin of error, 95% confidence interval, 50% response rate, according to the Raosoft sample size calculator [20].

Data Collection

The survey questions consist of 34 questions in total. The first 9 questions with their socio-demographic characteristics, 10-30. questions with depression level and 31-34. questions were about the use of antidepressants.

Beck Depression Inventory (BDI)

It was a self-assessment scale developed by Beck et al. in 1961 [21]. It consists of twenty-one items. Each item has 4 options and scores between 0-3. The depression score is obtained by summing these scores. The scores obtained from the scale range from 0 to 63, and an increase in the score means that the level of depression becomes more severe. According to the scale, 0-9 points were classified as minimal depression, 10-16 points as mild depression, 17-29 points as moderate depression and 30-63 points as severe depression [21]. The Turkish validity and reliability study of the scale was performed by Hisli in 1988 [22]. In the validity and reliability study conducted with university students, it was found that scores of 17 and above from the scale were the cut-off points that determined depression above normal [23].

Statistical Analysis

Descriptive statistics were expressed as frequency and percentage, and non-descriptive data as median interquartile range. Chi-square test was used for categorical variables and Mann Whitney U test (non-normally distributed) was used for non-categorical variables. In the study, the cut-off value for depression was accepted as 17 and above. Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 20. p value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Except for the students who took the same course again, the total number of students in the 4th and 5th grades was 172. The questionnaire was sent to all 4th and 5th grade students, but was answered by 125 (72.67%) students. Table 1 shows the characteristics of the students participating in the study. Of the students who answered the questionnaire, 30 (24%) were male and 95 (76%) were female. The median age of the students was 22 (22-33). The father and mother of most of the students were university graduates (48%, 31.2%, respectively). The majority of the students did not regularly use alcohol (88%) and did not smoke (76.8%).

Table 1: Characteristics of pharmacy students participating in the study

Variables	n (%)
Gender	
Male	30 (24)
Female	95 (76)
Age (years) (median)*	22 (22-33)
Year of study	
Fourth year	65 (52)
Fifth year	60 (48)
Father's education level	
Primary school	18 (14.4)
Secondary school	16 (12.8)
High school	26 (20.8)
University	60 (48)
Postgraduate	5 (4)
Mother's education level	
Primary school	33 (26.4)
Secondary school	18 (14.4)
High school	33 (26.4)
University	39 (31.2)
Postgraduate	2 (1.6)
Monthly household income level	
5000-10000 TL	55 (44)
10000-20000 TL	45 (36)
20000-30000 TL	14 (11.2)
≥30000 TL	11 (8.8)
Regular smoking	
Yes	29 (23.2)
No	96 (76.8)
Regular alcohol use	
Yes	15 (12)
No	110 (88)
Living place	
At home with family	12 (9.6)
At home with friends	80 (64)
Dormitory	33 (26.4)
Depression score	
BDI score (median)*	14 (7-22)
Minimal	38 (30.4)
Mild	37 (29.6)
Moderate	38 (30.4)
Severe	12 (9.6)
0-16 point	76 (60.8)
≥17 point	49 (39.2)
Antidepressant drug use	
Yes	18 (14.4)
No	107 (85.6)
If yes, how long have you been using antidepressant medication? (years)	
0-1	10 (55.6)
1-2	4 (22.2)
≥2	4 (22.2)
If yes, do you regularly use your antidepressant medication?	
Yes	11 (61.1)
No	7 (38.9)

* median-interquartile range, BDI: Beck Depression Inventory

Depression Levels

The median BDI score of the students was 14 (7-22). 30.4% of the students were minimally depressed, 29.6% were mildly depressed, 30.4% were moderately depressed and 9.6% were severely depressed. When the cut-off point was 17, 39.2% of the students were depressed. Eighteen (14.4%) students were using antidepressants. 55.6% of students using antidepressants were using antidepressants for less than 1 year and 61.1% were using antidepressants regularly (Table 1). Figure 1 shows the antidepressant drugs used by the students.

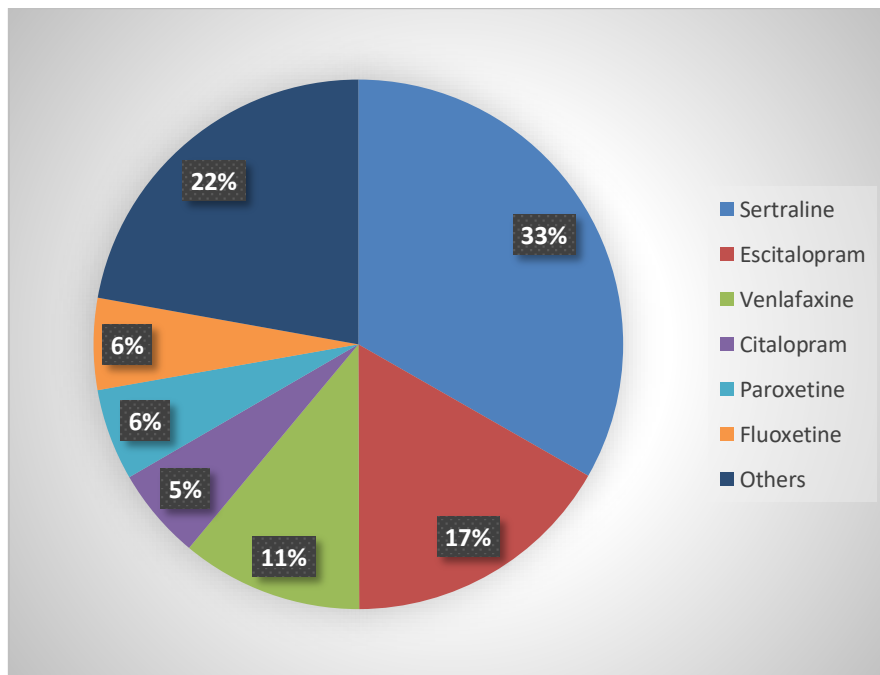


Figure 1: Antidepressant drugs used by pharmacy faculty students

Table 2 shows the comparison of students' characteristics in terms of BDI cut-off points. The father's education level and monthly household income were found to be statistically significant in those with a BDI score of 17 and above, compared to a BDI score of 16 and below ($p < 0.05$).

Table 2: Comparison of the characteristics of pharmacy students in terms of BDI score

	BDI score 0-16	BDI score ≥17	p
Gender			
Male	18 (23.7)	12 (24.5)	p=1
Female	58 (76.3)	37 (75.5)	
Age (years)(median)*	22 (22-23)	22 (22-23)	p=0.375
Year of study			
Fourth year	34 (44.7)	31 (63.3)	p=0.66
Fifth year	42 (55.3)	18 (36.7)	
Father's education level			
Primary school	5 (6.6)	13 (26.5)	p=0.003
Secondary school	13 (17.1)	3 (6.1)	
High school	13 (17.1)	13 (26.5)	
University and above	45 (59.2)	20 (40.8)	
Mother's education level			
Primary school	15 (19.7)	18 (36.7)	p=0.129
Secondary school	14 (18.4)	4 (8.2)	
High school	21 (27.6)	12 (24.5)	
University and above	26 (34.2)	15 (30.2)	
Monthly household income level			
5000-10000 TL	28 (36.8)	27 (55.1)	p=0.039
10000-20000 TL	31 (40.8)	14 (28.6)	
20000-30000 TL	7 (9.2)	7 (14.3)	
≥30000 TL	10 (13.2)	1 (2)	
Regular smoking			
Yes	13 (17.1)	16 (32.7)	p=0.073
No	63 (82.9)	33 (67.3)	
Regular alcohol use			
Yes	10 (13.2)	5 (10.2)	p=0.830
No	66 (86.8)	44 (89.8)	
Living place			
At home with family	8 (10.5)	4 (8.2)	p=0.907
At home with friends	48 (63.2)	32 (65.3)	
Dormitory	20 (26.3)	13 (26.5)	
Antidepressant drug use			
Yes	8 (10.5)	10 (20.4)	p=0.222
No	68 (89.5)	39 (79.6)	

* median-interquartile range

Table 3 shows the use of antidepressant drugs according to the depression levels of pharmacy students. There was no statistically significant difference in the use of antidepressant medication according to depression levels ($p>0.05$). The vast majority (44.4%) of students using antidepressant medication suffered from moderate depression and 11.1% suffered from severe depression.

Table 3: Antidepressant drug use by pharmacy students according to their depression levels

Depression levels	Antidepressant use	
	Yes n (%)	No n (%)
Minimal depression	1 (2.6)	37 (97.4)
Mild depression	7 (18.9)	30 (81.1)
Moderate depression	8 (21.1)	30 (78.9)
Severe depression	2 (16.7)	10 (83.3)

4. Discussion and Conclusion

In our study, we evaluated the level of depression and the use of antidepressants in the 4th and 5th grades of Suleyman Demirel University Faculty of Pharmacy. As far as we know, there is no study conducted in Türkiye on this subject only with pharmacy students. It is important to determine the depression level of pharmacy students in Türkiye. Our study was not performed on first, second, and third year students on the grounds that they might not know about antidepressant drugs.

The median BDI score of the students was 14 (7-22). According to the BDI cut-off point, 49 (39.2%) suffer from depression. In a study of pharmacy students in Malaysia (19), 51.1% of students, in a study of medical school students in China 19.9% of students (24), and in studies of university students in Brazil and China, 86.7% and 11.7% of students suffered from depression, respectively [25, 26]. These differences may be caused by the level of development, income level, university conditions, cultural and individual differences between countries [27].

When the studies conducted in Türkiye were examined, 28.3% and 21.9% of the students suffered from depression according to the BDI cut-off scores in two studies conducted with medical students [5, 6]. In two studies conducted with university students, the rate of depression was 26.2% and 35.2% (8, 9). In the study conducted by Yıldız et al. on university students, the mean BDI score was 13.16 ± 8.17 [10].

When the results of our study are compared with other studies, it is clear that the depression levels of pharmacy students in our study are higher. The difficulty and intensity of the lessons, stress, and anxiety about their future may have contributed to this situation [19]. We cannot compare the results of our study with the previous ones, as there was no study conducted on pharmacy students before. However, the increase in the number of pharmacy graduates, the restriction of opening pharmacies by legal regulations and the limited employment opportunities in the public may have caused depressive symptoms in pharmacy students [28, 29]. In the study of Kiran et al., 77.5% of the first-year pharmacy students are worried about the future of their profession due to these reasons [29].

In our study, the father's education level and monthly household income were found to be statistically significant in terms of BDI cut-off score. Similarly, low monthly income and lower father's education level showed more depressive symptoms in a study conducted at 33 universities in China [24]. In many studies, students with low monthly household income and economically disadvantaged were found to be more depressed [6, 26, 27, 30]. In our study, gender was not statistically significant in terms of BDI cut-off scores. While some studies have similar results [26, 30, 31], some studies have found that females have higher depression levels than males [5, 10, 19]. The authors attributed this to the fact that women were more emotional and had more complaints about physical and psychological symptoms [5, 19].

In our study, 14.4% of the students were using antidepressants and the most used antidepressants were sertraline (33%) and escitalopram (17%). While the use of antidepressants was 6.9% in the study by Marwat et al. [32], it was found 3.6% in the study by Dhami et al. [33] and 11% in the study by Yıldız et al. [10]. Although there was a higher rate of antidepressant use in our study compared to these studies, the depression level of the students in our study was high and there were students who did not receive treatment despite being depressed. In our study, 2 (16.7%) of 12 students with severe depression and 8 (21.1%) of 38 students with moderate depression were receiving antidepressant treatment. We did not question the reasons why students did not seek treatment. However, studies have shown that the belief that students will have a negative impact on their future careers, lack of time and the stigma of using mental health services are the reasons for not seeking treatment [34, 35]. Effectively treating depression is important because it can reduce the risk of suicide [36].

In our study, 38.9% of the students use antidepressants irregularly. Antidepressants should not be stopped abruptly and this leads to withdrawal syndrome, it is recommended to adjust the dose and discontinue the drug under the control of a psychiatrist [37]. This is also explained in pharmacy classes. However, the high rate of irregular use of antidepressants indicates that this should be emphasized more. As pharmacists of the future, they will have an important role in increasing the adherence of the patients and in patient education [38].

According to the results of our study, the level of depression in pharmacy faculty students was found to be high. Father's education level and monthly household income were among the risk factors for

depression. Most of the students with moderate and severe depression were not taking antidepressant treatment. In addition, a substantial number of students using antidepressants were using antidepressants irregularly. Therefore, more emphasis should be placed on this subject in the courses in the faculty. Also, if pharmacist students' depression is diagnosed and treated early, it can help future pharmacists lead healthier lives.

Declaration of Ethical Code

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

Ethical approval of the study was received by the Suleyman Demirel University Clinical Research Ethics Committee. (Approval Number:23 Date:31.01.2023).

References

- [1] National Institute for Health and Care Excellence (NICE). 2022. Depression in adults: treatment and management: National Institute for Health and Care Excellence; [NICE Guideline [NG222]. Available: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng222> (Accessed Date: 15.02.2023).
- [2] World Health Organization (WHO). 2021. Fact Sheets Depression. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression (Accessed Date: 15.02.2023).
- [3] Ibrahim AK, Kelly SJ, Adams CE, Glazebrook C. 2013. A systematic review of studies of depression prevalence in university students. *J Psychiatr Res*, 47(3),391-400.
- [4] Sarokhani D, Delpisheh A, Veisani Y, Sarokhani MT, Manesh RE, Sayehmiri K. 2013. Prevalence of depression among university students: a systematic review and meta-analysis study. *Depress Res Treat*.
- [5] Güler M, Demirci K, Karakuş K, Kişioğlu AN, Zengin E, Yozgat Z, et al. 2014. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencilerinde umutsuzluk-depresyon sıklığı ve sosyodemografik özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesi. *Int J Clin Med*, 2(1),32-37.
- [6] Kaya M, Genç M, Kaya B, Pehlivan E. 2007. Tıp fakültesi ve sağlık yüksekokulu öğrencilerinde depresif belirti yaygınlığı, stresle başa çıkma tarzları ve etkileyen faktörler. *Türk Psikiyatri Derg*, 18(2),137-146.
- [7] Konar NM. 2020. Factors associated with depression, anxiety and stress levels among medical students. *Ank Med J*, 20(1),90-104.
- [8] Özdel L, Bostancı M, Özdel O, Oğuzhanoğlu NK. 2002. Üniversite öğrencilerinde depresif belirtiler ve sosyodemografik özelliklerle ilişkisi. *Anadolu Psikiyatri Derg*, 3(3),155-161.
- [9] Çelikel ÇF, Erkorkmaz Ü. 2008. Üniversite öğrencilerinde depresif belirtiler ve umutsuzluk düzeyleri ile ilişkili etmenler. *Noro Psikiyatr Ars*, 45(4),122-129.
- [10] Yıldız E, Aksoy N, Rashida U. 2021. Evaluation of Antidepressant Medication Use and Determination of Risk Factors for Depression among University Students in Istanbul. *A J Health Sci*, 3(1),3-18.
- [11] Markowitz JC. 2008. When should psychotherapy be the treatment of choice for major depressive disorder? *Curr Psychiatry Rep*, 10(6),452-457.
- [12] Usala T, Clavenna A, Zuddas A, Bonati M. 2008. Randomised controlled trials of selective serotonin reuptake inhibitors in treating depression in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol*, 18(1),62-73.
- [13] Hammonds T, Rickert K, Goldstein C, Gathright E, Gilmore S, Derflinger B, et al. 2015. Adherence to antidepressant medications: a randomized controlled trial of medication reminding in college students. *J Am Coll Health*, 63(3),204-208.
- [14] Istilli PT, Miasso AI, Padovan CM, Crippa JA, Tirapelli CR. 2010. Antidepressants: knowledge and use among nursing students. *Rev Lat Am Enfermagem*, 18,421-428.

- [15] Korczak DJ, Society CP, Health M, Committee DD. 2013. Use of selective serotonin reuptake inhibitor medications for the treatment of child and adolescent mental illness. *Paediatr Child Health*, 18(9),487-491.
- [16] Votta RJ, Benau EM. 2014. Sources of stress for pharmacy students in a nationwide sample. *Curr Pharm Teach Learn*, 6(5),675-681.
- [17] Opoku-Acheampong A, Kretchy IA, Acheampong F, Afrane BA, Ashong S, Tamakloe B, et al. 2017. Perceived stress and quality of life of pharmacy students in University of Ghana. *BMC Res Notes*, 10(1),1-7.
- [18] Aluh DO, Abba A, Afosi AB. 2020. Prevalence and correlates of depression, anxiety and stress among undergraduate pharmacy students in Nigeria. *Pharm Educ*, 20,236-248.
- [19] Ibrahim MB, Abdelreheem MH. 2015. Prevalence of anxiety and depression among medical and pharmaceutical students in Alexandria University. *Alexandria J Med*. 51(2),167-173.
- [20] Raosoft Inc. (2004) RaoSoft® sample size calculator. <http://www.raosoft.com/samplesize.html>. (Accessed Date:1.12.2022).
- [21] Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. 1961. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, 4(6), 561-571.
- [22] Hisli N. Beck. 1988. Depresyon Envanterinin geçerliliği üzerine bit calisma (A study on the validity of Beck Depression Inventory.). *Psikoloji Dergisi*, 6,118-122.
- [23] Hisli N. 1989. The validity and reliability of Beck Depression Inventory for university students. *Psikoloji dergisi*, 7,3-13.
- [24] Pan X-F, Wen Y, Zhao Y, Hu J-M, Li S-Q, Zhang S-K, et al. 2016. Prevalence of depressive symptoms and its correlates among medical students in China: a national survey in 33 universities. *Psychol Health Med*, 21(7),882-889.
- [25] Falavigna A, de Souza Bezerra ML, Teles AR, Kleber FD, Velho MC, Steiner B, et al. 2011. Sleep disorders among undergraduate students in Southern Brazil. *Sleep Breath*, 15,519-524.
- [26] Chen L, Wang L, Qiu XH, Yang XX, Qiao ZX, Yang YJ, et al. 2013. Depression among Chinese university students: prevalence and socio-demographic correlates. *PloS One*, 8(3):e58379.
- [27] Steptoe A, ardle J, Tsuda A, Tanaka Y. 2007. Depressive symptoms, socio-economic background, sense of control, and cultural factors in university students from 23 countries. *IJBM*, 14,97-107.
- [28] T.C. Resmi Gazete, Eczacılar ve Eczaneler Hakkında Yönetmelik. <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.19569&sourceXmiSearch=eczac%C4%B1lar&MevzuatIiski=0>. (Accessed Date:15.02.2023).
- [29] Kiran B, Taşkıran E. 2015. Ege Üniversitesi eczacılık fakültesi 1. sınıf öğrencilerinin meslek tercihine etki eden faktörler. *Marmara Pharm J*, 19(2),159-167.
- [30] Othieno CJ, Okoth RO, Peltzer K, Pengpid S, Malla LO. 2014. Depression among university students in Kenya: Prevalence and sociodemographic correlates. *J Affect Disord*,165,120-125.
- [31] Grant K, Marsh P, Syniar G, Williams M, Addlesperger E, Kinzler MH, et al. 2002. Gender differences in rates of depression among undergraduates: measurement matters. *J Adolesc*, 25(6),613-617.
- [32] Marwat MA. 2013. Prevalence of depression and the use of antidepressants among third year medical students of Khyber Medical College, Peshawar. *J Postgrad Medical Inst*, 27(1).
- [33] Dhama DB, Singh A, Shah GJ. 2018. Prevalence of depression and use of antidepressant in basic medical sciences students of Nepalgunj medical college, Chisapani, Nepal. *Nepal Med Coll J*, 16(1),32-36.
- [34] Tjia J, Givens JL, Shea JA. 2005. Factors associated with undertreatment of medical student depression. *J Am Coll Health*, 53(5), 219-224.
- [35] Givens JL, Tjia J. 2002. Depressed medical students' use of mental health services and barriers to use. *Acad Med*, 77(9):918-921.
- [36] Mann JJ. 2005. The medical management of depression. *N Engl J Med*, 353(17),1819-1834.

[37] Schatzberg AF, Blier P, Delgado PL, Fava M, Haddad PM, Shelton RC. 2006. Antidepressant discontinuation syndrome: consensus panel recommendations for clinical management and additional research. *J Clin Psychiatry*, 67:27.

[38] Al-Jumah KA, Qureshi NA. 2012. Impact of pharmacist interventions on patients' adherence to antidepressants and patient-reported outcomes: a systematic review. *Patient Prefer Adherence*, 87-100.

Polifenol Oksidaz Enzim İnce Filminin Bakır Sülfat (CuSO_4) Sensörü Olarak Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Investigation of the Polyphenol Oxidase Enzyme Thin Film as a Copper Sulfate (CuSO_4) Sensor

Murat EVYAPAN ^{1*} 

¹ Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Balıkesir, Türkiye



Ö Z

Bu çalışmada spin kaplama tekniği kullanılarak çitosan-jelatin biyokompozit alt-tabakası üzerine polifenol oksidaz (PPO) enzimi ile ince filmler üretilmiştir. Biyo-kompozit malzeme, PPO enzim tabakasının altına üzerine kararlı ince film transferi amacıyla kullanılmıştır. Üretilen ince filmlerde PPO enzim tabakası aktif bölgeyi oluşturarak, ince filmin dış ortam ile direkt temas halinde olduğu kısımdır. Bu sayede ince filmin herhangi bir dış ortam değişimi, PPO enzim tabakası üzerine doğrudan etki etmektedir. PPO enzim tabakasının dış ortam değişimlerini duyarlılığını gözlemlemek amacıyla saf su çözütüsünde bakır sülfat (CuSO_4) çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltideki bakır sülfat kirletici olup tespit edilmek istenilen zararlı kimyasal görevindedir. Dolayısıyla, PPO enziminin bakır sülfata karşı tepkisi ölçülerek sensör uygulamalarındaki kullanılabilirliği araştırılmıştır.

İnce filmlerin üretim aşamaları elektriksel ve Kuartz kristal mikrobals (QCM) yöntemleriyle takip edilmiştir. Ayrıca elektriksel ölçümler ve QCM sistemi, ince filmlerin sıvı ortam sensör ölçümleri için kullanılmıştır. PPO enzim ince filminin zamana bağlı kirletici tepkisi kaydedilerek enzimlerin sensör uygulamalarında aktif tabaka olarak kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz enzimi, biyo-sensör, kuartz kristal mikrobals

Alınış / Received: 05.04.2023 Kabul / Accepted: 27.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

In this study, thin films were produced with the polyphenol oxidase (PPO) enzyme on chitosan-gelatine bio-composite via the spin coating technique. Bio-composite material was used for the PPO enzyme layer and for stable thin film transfer on the substrate. In the thin films produced, the PPO enzyme layer forms the active site and is the part where the thin film is in direct contact with the external environment. In this way, any external environmental change to the thin film directly affects the PPO enzyme layer. A copper sulfate (CuSO₄) solution in pure water solvent was used to observe the external changes in the environment of the PPO enzyme layer. The copper sulfate in this solution is a pollutant and is the harmful chemical to be detected. Therefore, its usability in sensor applications was investigated by measuring the response of the PPO enzyme to copper sulfate.

Production stages of thin films were followed by electrical and Quartz crystal microbalance (QCM) methods. In addition, electrical measurements and the QCM system have been used for liquid media sensor measurements of thin films. By recording the time-dependent contaminant response of the PPO enzyme thin film, the usability of enzymes as an active layer in sensor applications was studied.

Keywords: Polyphenol oxidase enzyme, bio-sensor, quartz crystal microbalance



1. Giriş

Hava ve çevre kirliliği son yıllarda gittikçe artmakta ve bazı bölgelerde tehlikeli boyutlar sınırına ulaşmaktadır. Atmosferde soluduğumuz hava kalitesinin azalmasının yanında, çevre kirliliğine sebep olan atıklar, gıda ve içme su kaynaklarını da olumsuz etkilemektedir. Bütün bu etkiler sonucunda hem kullanılabilir kaynak sayısı azalmakta hem de canlı sağlığı için tehlikeli durumlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle özellikle hava, gıda ve sudaki canlı sağlığını tehdit eden zararlı maddelerin tespit edilmesi son derece önem kazanmıştır.

Çeşitli ortamlardaki zararlı maddelerin tespiti için kullanılan sensörler üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır [1, 2]. Bu çalışmaların temel amacı, hedef maddeyi duyarlı, hızlı ve seçici olarak tespit edebilmektir. Ortamdaki kimyasalların yoğunluğu, türü ve sayısı ne kadar fazla olursa, istenilen maddenin tespiti de o derece zorlaşmaktadır. Dolayısıyla sensör çalışmaları hedef duyarlı (aktif) bölgenin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Duyarlı bölge, tespit edilmek istenilen zararlı kimyasal ile birebir etkileşime giren ve bu etkileşim sonucu fiziksel, kimyasal ve/veya elektriksel değişikliklere uğrayan bölüm olarak tanımlanabilir [3, 4]. Oluşan değişimlerin sürekli kontrolü sonucu sensör tepkisi anlık olarak verilebilmektedir.

Son yıllarda literatürdeki sensör çalışmalarında duyarlı bölge olarak organik malzemeler sıklıkla kullanılmaktadır. Organik malzemelerin düşük maliyetleri, kimyasal yapılarının kontrol edilebilir olması ve ince film üretimine uygunlukları sayesinde sensör araştırmalarında literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan organik malzemeler arasında porfirinler [5], polimerler [6], calixarenler [7] ve ftalosyaninler [3] gibi birçok farklı tür molekül sayılabilir. Sensörlerde duyarlı bölge olarak biyolojik malzemeler de son yıllarda kullanılmakta olup, özellikle biyosensör üretiminde büyük avantaj sağlamaktadır. Bu tip sensörlerde tespit edilmesi istenilen zararlı kimyasala bağlı olarak enzimler seçilmektedir. Birçok farklı enzim sensör sistemlerinde aktif tabaka olarak kullanılarak duyarlılık özelliklerinden faydalanılmaktadır [8]. Enzimler canlı metabolizmasındaki reaksiyonların çoğunu katalize eden organik maddelerdir. Reaksiyon durumunda değişikliğe uğrayabilirler fakat reaksiyonun sonunda eski hallerine geri dönmektedirler. Bu sayede sınırsız sayıda reaksiyona girebilirler. Son yıllarda sensör çalışmalarının büyük bir kısmı seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği arttırmak üzerine olmaktadır. Enzimlerin sahip olduğu bu iki özellik duyarlı tabakada aranan iki

özelliğidir. Dolayısıyla enzimler sensör çalışmalarında duyarlı tabaka olarak kullanımı ile bu avantajlarından faydalanarak sensör sistemleri içine entegre edilmeye çalışılmaktadır.

Metal iyonları (Cu, Pb, Zn, Ag, Cd, Co, Fe, Ni, Cr gibi), çevre kirliliğine neden olan tehlikeli faktörlerin önde gelenlerindedir. Bu tip iyonlarının toprak kirliliğine neden olması, çevreye verdiği en önemli ve en büyük zarardır [9]. Metal iyonlarının mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanlar gibi canlılar için toksik etkisi bilinmektedir [10, 11]. Önemli bir kirletici grubu olan bu iyonlar; canlı organizmalarda birikerek toksik ve kanserojen etkiler ortaya çıkarabilmektedir [10]. Dolayısıyla son yıllarda artan metal iyonlarının ekosistemlerde tespit edilmesi büyük önem kazanmıştır.

Bu çalışmada kirletici olarak bakır sülfat (CuSO_4) seçilmiştir. Bakır sülfat, tarım ve hayvancılık başta olmak üzere birçok alanda farklı amaçlarda kullanılmaktadır. Ancak kullanım miktarları kontrol edilmediği takdirde insan sağlığını tehdit edebilecek riskler ortaya çıkarabilmektedir. Bu sebeple, PPO enzimi katı yüzey üzerine ince film olarak üretilerek bakır sülfat tespitinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

İnce Film Malzemeleri

Bu çalışmada sensör sisteminde duyarlı tabaka olarak kullanılmak üzere Polifenol oksidaz (PPO) enzimi seçilmiştir. Enzimin zararlı kimyasal ile etkileşebilmesi ve bu etkileşimin fiziksel bir sinyal olarak ölçülebilmesi için katı bir yüzey üzerinde ince film haline getirilmesi gerekmektedir. PPO enziminin kararlı bir katı tabaka oluşturabilmesi amacıyla altında destek tabakası adını verebileceğimiz bir alt tabaka kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında üretilen ince filmlerin tamamında destek tabakası olarak çitosan ve jelatinden oluşan bir biyo-kompozit tabakası kullanılmıştır. Çitosan, kitin enzimlerle kolayca bağlanabilme özelliğine sahip doğal bir karbohidrat biyopolimeridir [12]. Jelatin ise yapışma özelliğine sahip, toksik olmayan doğal bir biyopolimerdir [13]. Bu çalışmada kullanılan PPO enzimi muzdan saflaştırılmıştır ve aşamaları daha önceki çalışmalarda detaylı olarak verilmiştir [14].

Spin (Döner) Kaplama Tekniği

İnce film üretim teknikleri arasında basitlik ve kullanılabilirlik açısından öne çıkan tekniklerden biri spin (döner) kaplama tekniğidir. Dakikada binlerce tur atabilen, titreşimsiz döner tablaya yerleştirilen alttaşa üzerine, ince film malzemesinin hazırlanan çözeltisinin serpilmesi sonucu dairesel hareketin etkisiyle çözeltinin alttaşa yayılması ve çözücünün de buharlaşması sağlanır. Elde edilen ürün, seçilen alttaşa üzerinde düzgün olarak ince film halinde yayılmış örnek malzemedir ibarettir.

PPO ince filmleri farklı dönme hızlarıyla (1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 rpm), IDE (interdigitated electrode) ve kuartz kristal üzerine kaplanmıştır. Döner kaplama cihazında hedef hıza ulaşan alttaşa üzerine 50 μl çözelti damlatılması ve bir dakikalık dönüş süresi sonucunda ince film transferi gerçekleştirilmiştir.

Kuartz Kristal Mikrobals (QCM) Tekniği

Kuartz kristal mikrobals tekniği nanogram mertebesinde kütle hassasiyetine sahip bir ölçüm tekniğidir. Çok ince ve uygun formda kesilmiş kuartz bir tabaka, iki altın elektrot arasına yerleştirilir ve uygun bir elektronik devre ile sabit bir f_0 rezonans frekansında titreştirilir. Sistem, kuartzın üzerine eklenen en küçük kütle değişimlerinde bile rezonans frekansından sapma göstererek bu değişimi analitik sonuçlara bağlayabilmektedir. Sauerbrey tarafından kütle ve frekans değişimi arasındaki bağıntı şu şekilde verilmektedir [15]:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{\rho_q^{1/2} \mu_q^{1/2} A} \Delta m \quad (1)$$

Burada f_0 rezonans frekansı (Hz), Δm kütle değişimi (g), A kuartzın alanı (cm^2), ρ_q kuartzın yoğunluğu (2.648 g cm^{-3}), μ_q kuartzın shear modülü ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$).

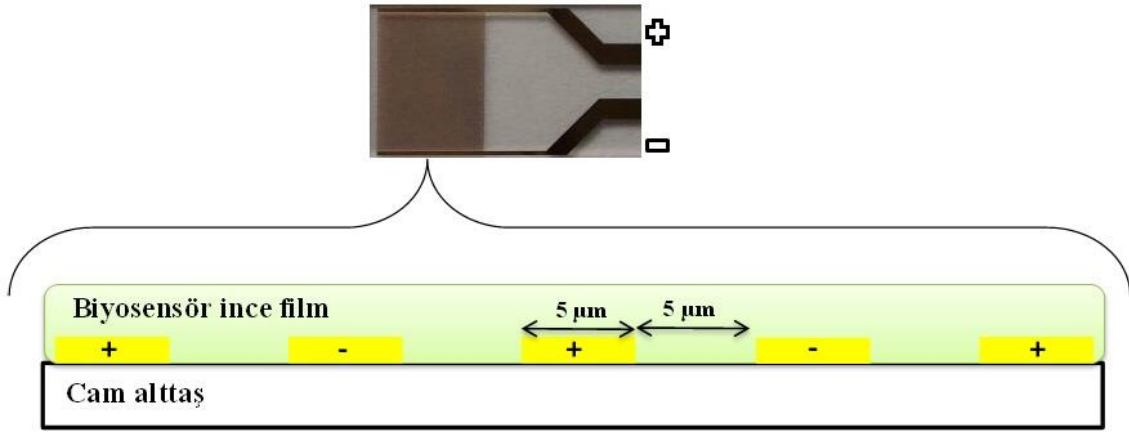
Bu yöntem yukarıdaki denklem yardımıyla kuartz kristal üzerine kaplanan ince filmin ağırlığını hesaplamakta kullanılabilir. Bunun yanı sıra ince film tabakalarının kalınlığı da aşağıdaki denklemde açıklanan kütle farkı yöntemi yardımıyla hesaplanabilir [16-18]:

$$d = \frac{\Delta m}{\rho \cdot A} \quad (2)$$

Burada Δm kaplanan ince film kütle değişimi, A kuartz kristal yüzey alanı ve ρ ince film maddesinin yoğunluğu.

Elektriksel Ölçümler

Elektriksel ölçümleri gerçekleştirmek için, alttaş olarak, cam üzerine kaplanmış birbiri içine geçmiş altın elektrot sisteminden oluşan interdigitated electrode (IDE) yapısı seçilmiştir. Bu elektrotlar ticari olarak Dropsens Company'den temin edilmiştir. Şekil 1'de şematik olarak gösterilen elektrot yapısında, her bir altın elektrotun ve aralarındaki boşluğun kalınlığı $5 \mu\text{m}$ ve elektrot sayısı 500'dür. Biyosensör filmin elektriksel iletkenlik özellikleri ± 4 volt arasında, akım-voltaj (I-V) değişimi kaydedilerek incelenmiştir. Ölçümler, oda sıcaklığında bilgisayar kontrollü Keithley 2400 Sourcemeter kullanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1: Altın elektrot kaplı cam alttaşın şematik gösterimi

3. Bulgular

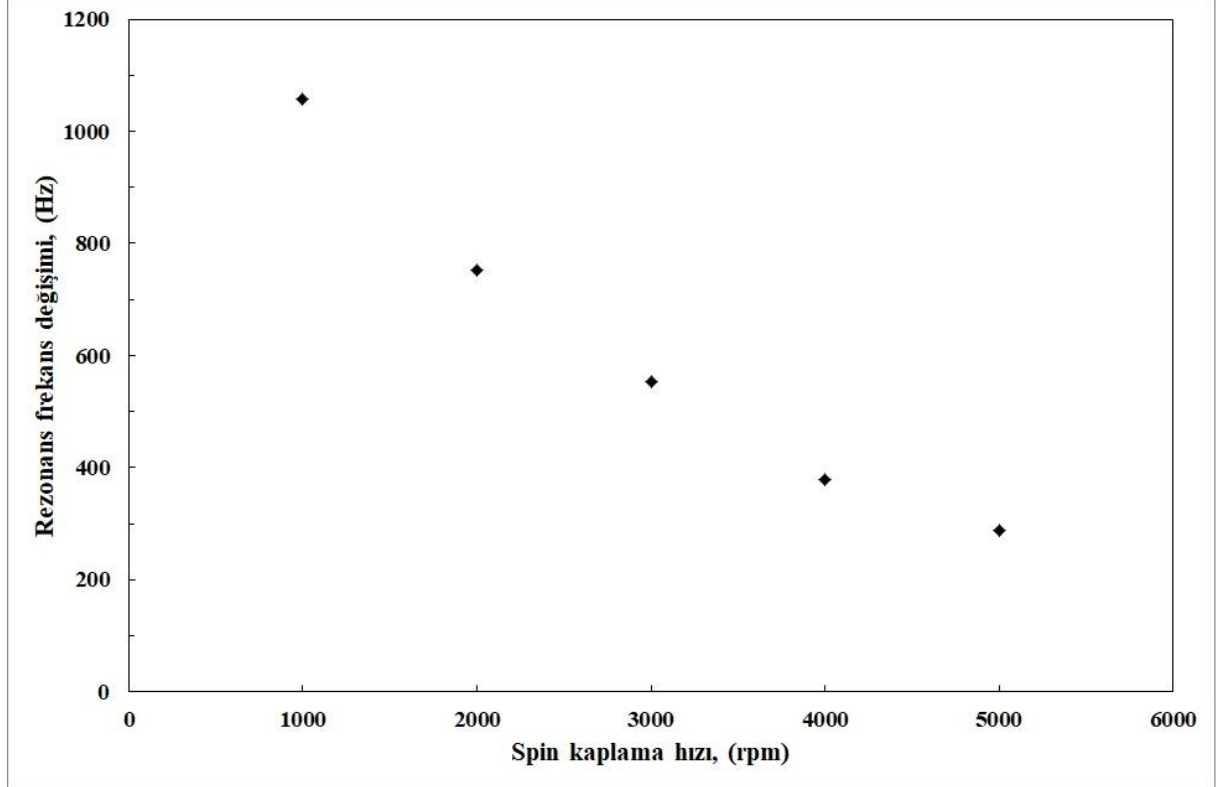
İnce Film Üretimi ve Karakterizasyonu

PPO enzim moleküllerinin katı yüzey üzerinde düzenli bir ince tabaka oluşturabilmesi amacıyla çitosan ve jelatinden oluşan biyo-kompozit malzeme alttaş üzerindeki ilk tabakayı oluşturmaktadır. Bu nedenle üretilen tüm PPO ince film katmanları bu biyo-kompozit tabaka üzerine transfer edilmiştir. 50 μl biyo-kompozit çözeltisi, hedeflenen hıza ulaşan alttaş üzerine mikro litrelik enjektör yardımıyla serpilerek çözeltinin katı yüzeye yayılması ve çözücünün buharlaşması sağlanmıştır. Transfer işlemi sonucunda biyo-kompozit kaplı alttaşın dış ortamdan izole bir şekilde kurumaması sağlanmıştır. Bu işlem, tüm alttaşlar üzerinde gerçekleştirilerek PPO enzim ince film transferi için hazır hale getirilmiştir.

Spin kaplama sisteminde dönme hızı üretilen ince filmin homojenlik ve kalınlık gibi özellikleri başta olmak üzere film özellikleri üzerinde doğrudan etki etmektedir [19]. Bu nedenle PPO enzim filmi üretimi için beş farklı dönme hızı (1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 rpm) seçilerek film kalınlığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Biyo-kompozit tabakasında olduğu gibi PPO ince filmde de hedeflenen hıza ulaşan alttaş üzerine 50 μl PPO çözeltisi serpilmiş ve yaklaşık 60 saniye devam eden dönme işlemi

sonucunda moleküllerin katı yüzey üzerine yayılması sağlanmıştır. Bu işlem tüm dönme hızları için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

İnce film üretim aşamalarının farklı metotlarla kontrolü amacıyla iki farklı alttaş seçilmiştir. 10 MHz kuartz kristal yüzey QCM sistemi kontrolü için, altın elektrot kaplı cam yüzey ise elektriksel ölçümlerde kullanılmıştır.



Şekil 2: PPO ince filmi spin kaplama hızına bağlı kuartz kristal mikrobalans rezonans frekans değişimi

Şekil 2'deki grafikte PPO moleküllerinin farklı dönme hızlarında kuartzın rezonans frekansında meydana getirdiği değişim verilmiştir. Grafikte artan dönme hızıyla frekans değişiminin azaldığı görülmektedir. Ayrıca Tablo 1'de, denklem 1 ve denklem 2 kullanılarak her bir dönüş hızına göre kaplanan PPO ince filmlerinin özellikleri listelenmektedir. Dönüş hızının artması sonucu rezonans frekansındaki kaymanın azaldığı ve dolayısıyla transfer olan kütle miktarının da azaldığı tablodan görülebilir. Bu beklenen bir sonuçtur ve literatürde dönüş hızının film özelliklerine etkileri gösterilmektedir [19]. Artan dönme hızı, PPO molekülleri üzerindeki kuvveti artırarak daha çok yayılmalarını ve daha ince bir katman oluşturmalarını sağlar. Yapılan hesaplar sonucu dönüş hızına bağlı kuartz üzerinde biriken kütle miktarı ve oluşan tabaka kalınlıkları da tabloda görülebilir. 1000 rpm dönüş hızıyla 38,80 nm PPO filmi oluşurken, 5000 rpm de bu kalınlık 10,52 nm ye kadar düşmüştür. Bu sonuçlar, PPO moleküllerinin katı yüzey üzerinde ince film olarak biriktirilebileceğini ve moleküler düzenlerinin de diğer organik ince film malzemeleri gibi kontrol edilebileceğini göstermiştir [20-22].

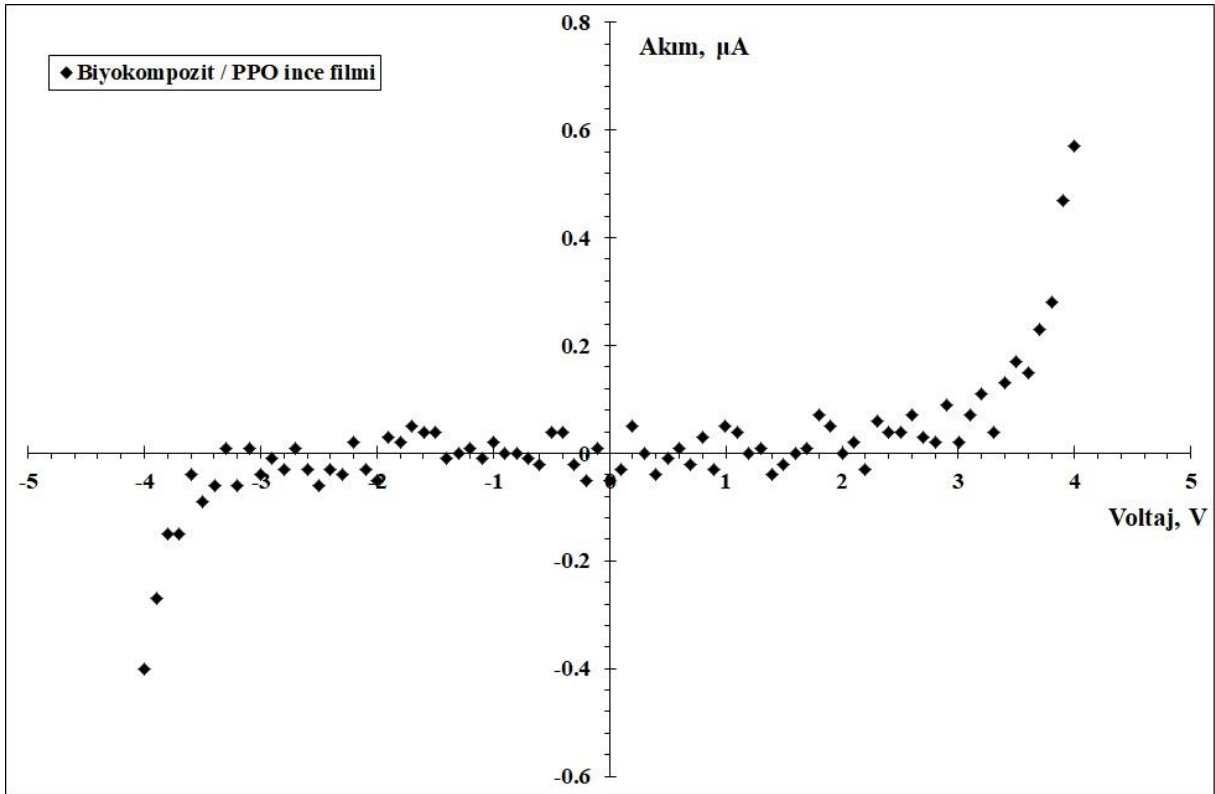
Tablo 1: Polifenol oksidaz enzimi spin kaplama hızına bağlı ince film özellikleri

PPO ince film	Spin kaplama dönüş hızı (rpm)				
	1000	2000	3000	4000	5000
Frekans değişimi (Δf , Hz)	1058,10	753,30	554,30	378,60	287,00
Transfer olan kütle (Δm , ng)	7078,00	5039,00	3708,00	2532,00	1920,00
Kalınlık (d, nm)	38,80	27,62	20,33	13,88	10,52

Sensör Ölçümleri

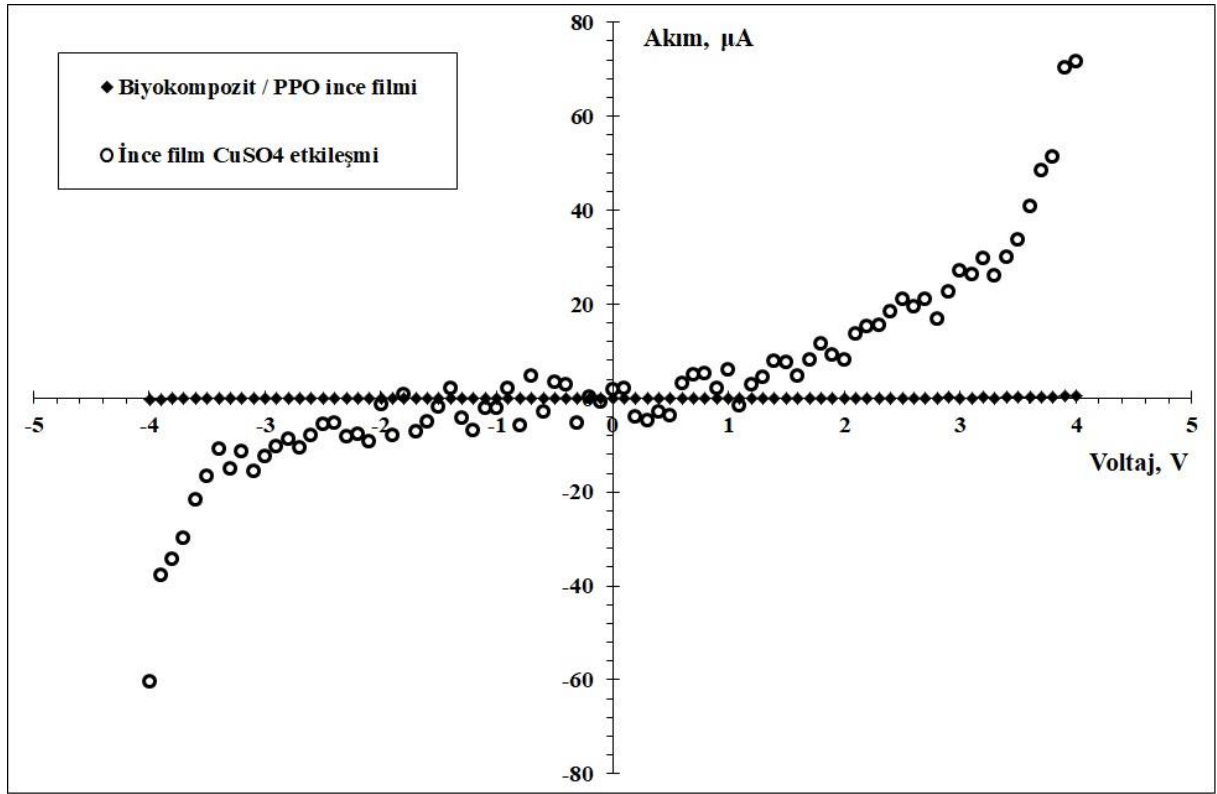
Polifenol oksidaz enzim ince filminin sensör olarak bakır sülfat tespitinde kullanılabilirliğini incelemek amacıyla hem elektriksel hem de QCM sisteminde sensör tepkileri kaydedilmiştir. Sensör olarak üretilecek filmler spin kaplama tekniğinde 3000 rpm hızında altın elektrotlu cam ve kuartz kristal üzerine üretilmiştir. Üretilen filmlerin şartları her iki alttaşı içinde aynı tutulmuştur.

Altın elektrotlu cam slaytlar üzerine kaplanan biyo-kompozit / PPO ince filmi, öncelikle referans olarak kaydedilmesi açısından $\pm 4V$ aralığında I-V ölçümü gerçekleştirilmiş ve eğri Şekil 3'de verilmiştir. Bu ölçüm enzim sensör ince filminin kontrol edilmesinin yanı sıra kirlenici ölçümleri için de referans niteliği taşımaktadır. Elde edilen eğri, karakteristik olarak daha önce yapılmış organik ince filmlerin I-V karakteristiği ile büyük benzerlik göstermektedir [23]. Ayrıca farklı enzimlerin ince film çalışmalarında elektriksel özellikleri incelenmiş ve akım-voltaj eğrilerinin Şekil 3'de verilen ile uyumlu olduğu görülmüştür [8].



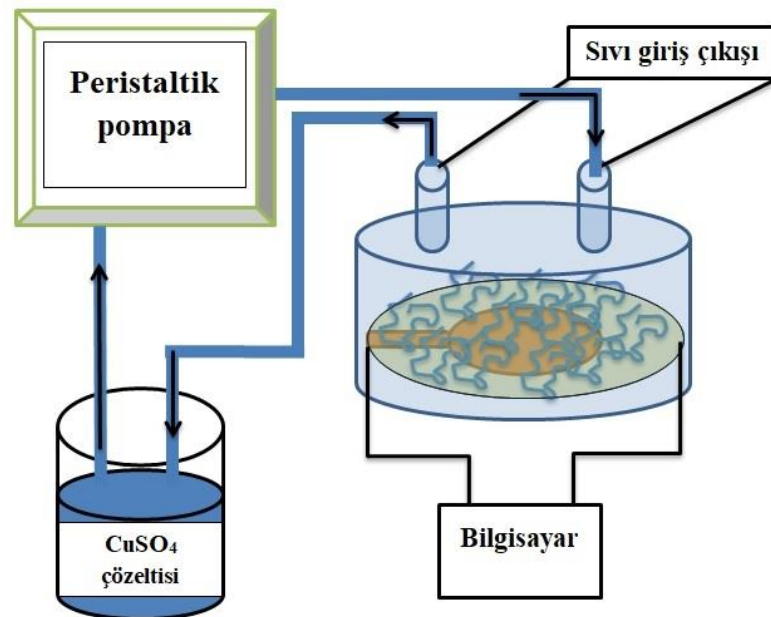
Şekil 3: Biyokompozit / PPO ince filmi akım-voltaj (I-V) grafiği

Enzim sensör ince filminin kirlenici olarak bakır sülfat tespitinde kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla elektriksel ölçüm sisteminde $CuSO_4$ etkileşimi incelenmiştir. Saf su ile hazırlanmış 1×10^{-3} mol/L $CuSO_4$ çözeltisi elektriksel ölçüm sisteminde PPO enzim filmi üzerine damlatılmıştır. Bakır sülfat etkileşimi sonucu PPO ince filmin I-V eğrisindeki değişim Şekil 4'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde eğri karakteristiği olarak etkileşim öncesiyle benzerlik göstermektedir. Ancak akımdaki artış PPO ince filmi tarafından $CuSO_4$ 'ın tutulduğunu göstermektedir. Akımdaki bu artış, enzim molekülleri ile kirlenici arasındaki etkileşim sonucu ince filmde iyon artışına bağlanabilir. $CuSO_4$ 'ın PPO sensör filmin elektriksel özelliklerinde meydana getirdiği bu değişim enzim ince filmin bu kirleniciye gösterdiği sensör tepkisi olarak yorumlanabilir. Dolayısıyla PPO enzimi ile üretilen sensör sistemi elektriksel olarak bakır sülfata duyarlıdır denilebilmektedir.



Şekil 4: Enzim ince filmin CuSO₄ etkileşimi sonrası akım-voltaj (I-V) grafiği değişimi

QCM sistemi çok küçük kütle değişimlerine duyarlı bir sistem olmasından dolayı sensör ölçümlerinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu çalışmada da PPO sensör filminin CuSO₄ duyarlılığını ölçmek amacıyla kuartz kristal üzerine üretilen enzim filmi bu kirleticiye maruz bırakılarak değişimler kaydedilmiştir. Şekil 5'de sıvı çözelti ile QCM sisteminin çalışma mekanizması şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5: Kuartz kristal mikrobals, sıvı çözelti ölçüm sistemi

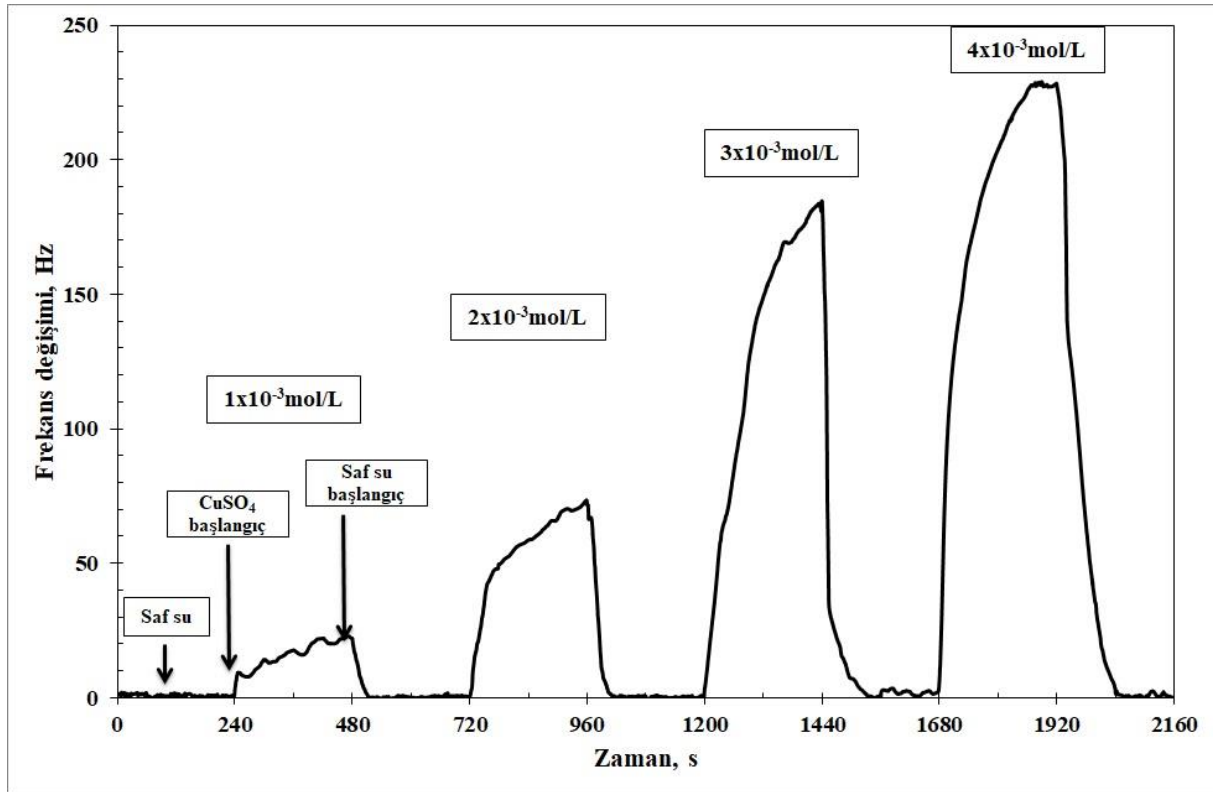
PPO ince film kaplı kuartz kristalin bulunduğu kapalı hücre içerisinde peristaltik pompa ile sırasıyla saf su ve CuSO_4 çözeltisi geçirilmektedir. Ölçüm süresince kuartzın rezonans frekansı zamana bağlı olarak kaydedilerek her türlü anlık değişim gözlem altında tutulur. Saf su ve CuSO_4 periyotları birbirini takip eden 4'er dakikalık çevrimler halinde uygulanmıştır.

Şekil 6'da PPO sensör filminin sıvı ortamda zamana bağlı CuSO_4 etkileşimi verilmiştir. İlk dört dakika saf su ortamında ölçüm başlatılmış ve dördüncü dakika sonunda 1×10^{-3} mol/L bakır sülfat çözeltisi kuartzın bulunduğu hücreye gönderilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi bakır sülfat çözeltisi PPO sensör filmi ile karşılaştığında frekansta dikkate değer bir değişim meydana getirmiştir. Frekanstaki bu değişim bakır sülfatın ortamda kaldığı dört dakika boyunca devam etmektedir. Bu durum PPO ince filmi tarafından, bu periyot süresince CuSO_4 'ün yakalanmaya devam ettiğini göstermektedir. PPO molekülleri tarafından oluşturulan ince film yapısı kuartzın yüzey alanına eşit bir yüzeye ve filmin kalınlığına bağlı belirli bir yüksekliğe sahiptir. İnce filmin üç boyutlu bu yapısı onu oluşturan PPO moleküllerinin arasında boşluklar kalmasına neden olur. Tespit edilmesi istenilen örnek kirletici ince film ile karşılaştığında öncelikle filmin yüzeyi ile etkileşime girer ve ince filmin aktif bölgeleri ile tutunur. Ortamdaki kirletici miktarı arttıkça bu moleküller ince filmin boşluklarından iç bölgelere nüfuz etmeye başlar. Böylece sensörün ürettiği tepki Şekil 6'da olduğu gibi artmaya devam etmektedir. Dört dakikalık kirletici periyodu sonucunda ortama tekrar saf su gönderilerek sensörün geri dönüşümlülüğü incelenmiştir. Ayrıca PPO enzim sensörün duyarlılığını incelemek amacıyla sonraki kirletici çevrimlerinde CuSO_4 konsantrasyonu artırılarak sensör tepkisindeki değişim gözlenmiştir. Şekil 6'daki grafikten de görüldüğü gibi, CuSO_4 konsantrasyonu arttıkça sensör tepkisi de artmaktadır. Konsantrasyona bağlı bu değişim, sensör sisteminin bakır sülfata karşı duyarlılığının yüksek olduğunu ifade eder ve maksimum tepki değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Konsantrasyon arttıkça sensör tepkisinin artması hala CuSO_4 ile etkileşime girebilecek aktif PPO bölgelerinin bulunduğunu göstermektedir. Bu bölgeler kirletici molekülleri tarafından dolduruldukça sensör doyum noktasına ulaşmaktadır. Grafikte görüldüğü gibi ilk üç konsantrasyon değeri için dört dakikalık periyot sonunda sensör doyum noktasına ulaşmamıştır. Ancak CuSO_4 konsantrasyonu 4×10^{-3} mol/L değerine ulaştığında sensör tepkisinin belirli bir seviyede sabitlendiği dikkat çekmektedir. Sabitlenme, yani doyuma ulaşma noktası ortama kirletici girdikten yaklaşık 200 s sonrasıdır. Bu noktada ulaşılabilir bütün aktif PPO noktaları kirletici molekülleri tarafından doldurulmuştur.

Sensör sistemlerinde dikkat edilmesi gereken önemli diğer bir nokta ise geri dönüşümdür. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki her bir kirletici çevriminden sonra ortama geri dönüşüm kontrolü için dört dakikalık zaman dilimi için saf su gönderilmiştir. Grafikten de açıkça görülmektedir ki sensörü temizlemek için gerçekleştirilen her adımda sensör başlangıçtaki rezonans frekansına geri gelmiştir. Bu nedenle üretilen sensör tekrar kullanılabilirlik özelliğine sahiptir yeni bir ölçüm için hazırdır. Burada dikkat çeken, kirletici konsantrasyonu arttıkça geri dönüş süresinin de artmasıdır. Konsantrasyona bağlı geri dönüş süreleri Tablo 2'de verilmektedir. Bu beklenebilen bir sonuçtur, çünkü yüksek konsantrasyonlarda PPO ince filmi ile etkileşime giren kirletici molekül sayısı da artmaktadır. Dolayısıyla ince filmin iç bölgelerine kadar giren bu moleküllerin film yapısından uzaklaşma süresi molekül sayısı ile doğru orantılıdır.

Tablo 2: PPO filminin CuSO_4 konsantrasyonuna bağlı sensör tepki özellikleri

CuSO_4 konsantrasyonu	1×10^{-3} mol/L	2×10^{-3} mol/L	3×10^{-3} mol/L	4×10^{-3} mol/L
Maksimum tepki	22,9 Hz	73,5 Hz	184,6 Hz	228,4 Hz
Geri dönüşüm süresi	32 s	52 s	94 s	134 s



Şekil 6: PPO enzim ince filminin CuSO₄ sıvı çözelti etkileşimi sonrası kinetik kuartz kristal mikrobalans sonuçları

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma kapsamında polifenol oksidaz enzimi ile ince film üretilmiş ve bu filmin kimyasal sensörlerde duyarlı tabaka olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Sensör ölçümlerinde kirletici olarak bakır sülfat (CuSO₄) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar öncelikle polifenol oksidaz enzimi ile başarılı bir şekilde ince film üretilbildiğini göstermiştir. Sensör ölçümleri için elektriksel ve kuartz kristal mikrobalans olmak üzere iki farklı teknik kullanılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan elektriksel sensör ölçümleri sonucunda PPO ince filmin CuSO₄ etkileşimi sonrası iletkenlik değerinin arttığı görülmüştür. Bu, PPO ince filmi tarafından tutulan CuSO₄ ile ince film yapısı içindeki iyon sayısının artmasına bağlanmıştır. Diğer bir teknik olan QCM sistemiyle sıvı ortamında zamana bağlı olarak PPO ince filmi ile CuSO₄ arasındaki etkileşim takip edilmiştir. Farklı kirletici konsantrasyonlarında yapılan bu ölçüm sonucu, üretilen enzim ince filmin bakır sülfata karşı duyarlı olduğu ve sensör tepkisinde kirletici konsantrasyonu ile arttığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra elde edilen tüm etkileşim sonuçlarının geri dönüşümlü olduğu ve sensörün tekrar kullanılabilirlik özelliğine sahip olduğu görülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan kimyasalların temin edilmesinde büyük katkıları bulunan Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Serap Beyaztaş Uzunoğlu ve altın kaplı elektrotların temin edilmesinde büyük katkıları sağlayan Fizik Bölümü'nden Tayfun Uzunoğlu'na teşekkür ederim.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

- [1] Silva L. F., Mastelaro V. R., Catto A. C., Escanhoela C. A., Bernardini S., Zilio S. C., Longo E., Aguir K. 2015. Ozone and nitrogen dioxide gas sensor based on a nanostructured SrTi_{0.85}Fe_{0.15}O₃ thin film. *J. Alloys and Compounds*, 638, 374-379.
- [2] Zhai Z., Sun Y., Hao X., Li C. 2023. Capacitive Gas Sensors Based on a ZIF-67/PAN Nanofiber Membrane to Detect Volatile Organic Compounds. *Applied Surface Sci.*, 621, 156833
- [3] Kılınc N., Ozturk S., Atilla D., Gurek A., Ahsen V., Ozturk Z. Z., 2012. Electrical and NO₂ sensing properties of liquid crystalline phthalocyanine thin films. *Sensors and Actuators B*, 173, 203-210.
- [4] Banimuslem H., Hassan A., Basova T., Esenpınar A. A, Tuncel S., Durmus M., Gürek A. G., Ahsen V., 2015. Dye-modified carbon nanotubes for the optical detection of amines vapors. *Sensors Actuators B*, 207, 224-234.
- [5] Wang B., Zhang L., Li B., Li Y., Shi Y., Shi T., 2014. Synthesis, characterization, and oxygen sensing properties of functionalized mesoporous silica SBA-15 and MCM-41 with a Pt(II)-porphyrin complex. *Sensors Actuators B*, 190, 93-100.
- [6] Hyodo T., Ishibashi C., Matsuo K., Kaneyasu K., Yanagi H., Shimizu Y., 2012. CO and CO₂ sensing properties of electrochemical gas sensors using an anion-conducting polymer as an electrolyte. *Electrochimica Acta*, 82, 19-25.
- [7] Koshets I. A., Kazantseva Z. I., Shirshov Y. M., Cherenok S. A., Kalchenko V. I., 2005. Calixarene films as sensitive coatings for QCM-based gas sensors. *Sensors Actuators B*, 106, 177-181.
- [8] Uzunoglu T., Evyapan M., Beyaztas S., Yildirim G., Kuskü T., 2020. Immobilization xanthine oxidase on interdigitated electrode for biosensor investigation. *Fresenius Environmental Buletin*, 29(8), 7122-7129.
- [9] Rai U. N., Tripathi R. D., Vajpayee P. 2002. Bioacumulation of toxic metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by seeds of euryale ferox salisb. (makhana). *Chemosphere*, 46, 267- 272.
- [10] Gu Y. G., Ning J. J., Ke C. L., Huang H. H., 2018. Bioaccessibility and human health implications of heavy metals in different trophic level marine organisms: A case study of the South China Sea. *Ecotoxicol Environ Saf*, 163, 551-557.
- [11] Pandey N., Sharma C. P., 2002 Effect of Heavy metals Co⁺², Ni⁺² and Cd⁺² on growth and metabolism of cabbage. *Plant Sci*, 163, 753-758.
- [12] Dinçer A., Becerik S., Aydemir T. 2012. Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 815-820.
- [13] Agarwal P., Dubey S., Singh M., Singh R. P. 2016. *Aspergillus niger* PA2 tyrosinase covalently immobilized on a novel eco-friendly bio-composite of chitosan-gelatin and its evaluation for L-Dopal. *Frontiers in Microbiology*, 7, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02088>.
- [14] Uzunoğlu S. B., Uzunoğlu T., Koçsuz S., Evyapan M., Arslan O. 2021. Metal ion effects Polyphenol Oxidase Covalently immobilized on a Bio-Composite. *Cellular and Molecular Biology*, 67, 50-55.
- [15] Sauerbrey G. 1959. The use of quartz oscillators for weighting thin layers and for microweighting, *Z. Phys.*, 155, 206.
- [16] Jundale D., Pawar S., Chougule M., Godse P., Patil S., Raut B., Sen S., Patil V. 2011. Nanocrystalline CuO thin films for H₂S monitoring: microstructural and optoelectronic characterization. *Journal of Sensor Technology*, 1, 36-46.
- [17] Mecea V. M. 2005. From quartz crystal microbalance to fundamental principles of mass measurements. *Analytical Letters*, 38, 753-767.
- [18] Koli P. B, Kapadnis K. H, Deshpande U. G, Tupe U. J, Shinde S. G, Ingale R. S. 2021. Fabrication of thin film sensors by spin coating using sol-gel LaCrO₃ Perovskite material modified with transition metals for sensing environmental pollutants, greenhouse gases and relative humidity. *Environmental Challenges*, 3, 100043.

- [19] Tyona M. D., 2013. A theoretical study on spin coating technique. *Advances in Materials Research*, 2(4), 195-208.
- [20] Pattananuwat P., Tagaya M., Kobayashi T. 2015. A novel highly sensitive humidity sensor based on poly(pyrrole-co-formyl pyrrole) copolymer film: AC and DC impedance analysis. *Sensors and Actuators B*, 209, 186-193.
- [21] Zhang F., Di C., Berdunov N., Hu Y., Hu Y., Gao X., Meng Q., Siringhaus H., Zhu D. 2013. Ultrathin Film Organic Transistors: Precise Control of Semiconductor Thickness via Spin-Coating. *Advanced Materials*, 25, 1401-1407.
- [22] Evyapan M., Hanoosh W. S., Hassan A. K. 2017. Determination of Volatile Organic Compounds by a Novel Polymer Spin-Coated Thin Film and Surface Plasmon Resonance. *Analytical Letters*, 50(16), 2579-2594.
- [23] Moiz S.A., Ahmed M. M., Karimov K. S., Mehmood M. 2007. Temperature-dependent current-voltage characteristics of poly-N-epoxypropylcarbazole complex. *Thin Solid Films*, 516, 72-77.

Omza Yönelik Ölçek Geliştirme Çalışmasında Kapsam Geçerliği Content Validity In The Scale Development Study For Shoulder

Hüsamettin KOÇAK^{1*}, Ertuğrul DEMİRDEL²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Atayalvaç Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Terapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Isparta, Türkiye
² Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Ankara, Türkiye



Ö Z

Araştırmalarda ölçme faaliyeti için hasta bildirimli veya klinisyen tarafından uygulanan ölçekler çokça tercih edilmektedir. Hastalığın, hastanın yaşamı üzerine gerçek etkisini ve kişiden kişiye değişiklik gösteren hastalık deneyimini anlamının karmaşık olması nedeniyle hasta bildirimli ölçekler literatürde çokça tercih edilmektedir. Türkiye’de omuz hastalıkları için kullanılan ölçeklerin tamamı uyarlama ölçeklerdir. Türk toplumuna özgü geliştirmeyi planladığımız ölçek geliştirme çalışması kapsamında yeni bir ölçek için kapsam belirleme, uzman görüşü alma ve kapsam geçerliğinin sağlanması aşamaları gerçekleştirildi. Literatür taraması, alan uzmanlarının görüşleri ve hasta bildirimleri dikkate alınarak geliştirilmek istenen ölçeğin kapsamı omuz fonksiyonelliğinin değerlendirilmesi olarak belirlendi. Omuz hastalarının ifade ettikleri semptomlar, literatürdeki hasta ifadelerine yönelik yer alan makaleler, literatürde yer alan omza yönelik geliştirilmiş ölçekler ve klinisyen görüşleri dikkate alınarak 34 maddelik madde havuzu oluşturuldu. Madde havuzunun kapsam geçerliği ve dil geçerliğini test etmek için 8 uzmandan oluşan uzman kurulu oluşturuldu. Madde havuzunda yer alan maddeler için Google Formlar platformu üzerinden dijital olarak iki kez uzman görüşü alındı. Birinci uzman görüşü sonrası 5 maddenin kapsam geçerlik oranı (KGO) 0,778 ve üzerindedi. Birinci uzman görüşleri ve maddelerin KGO doğrultusunda madde havuzu 21 madde olarak yenilendi. Yenilenen madde havuzu, tekrar değerlendirilmesi için ikinci kez aynı uzmanlara Google Formlar platformu üzerinden gönderildi. Uzman görüşleri sonrası tekrar maddelerin KGO hesaplandı. İkinci uzman görüşü sonrası 20 maddenin KGO’nun 0,778 ve üzeri bir değerde olduğu görüldü. 0,778 değeri altında bir KGO’na sahip 1 madde ölçekten çıkarıldı. Bu değerlere göre ölçeğin toplam kapsam geçerlik ölçütü (KGÖ) 0,984375 olarak hesaplandı ve 20 maddeden oluşan taslak ölçek son halini aldı. KGO, KGÖ kavramları örnek çalışmamız üzerinde anlatılarak ölçek geliştirme sürecinde nasıl kullanılacağı basit bir dille ifade edildi. Çalışmalarda KGÖ’nün farklı değerler referans alınarak kullanılması analiz edildi.

Anahtar Kelimeler: Ölçek, Kapsam Geçerliği, Kapsam Gerçerlik Oranı

Alınış / Received: 25.05.2023 Kabul / Accepted: 26.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

In research studies, patient-reported or clinician-administered scales are commonly preferred for measurement activities. Due to the complexity of understanding the true impact of a disease on a patient's life and the variability of the disease experience from person to person, patient-reported scales are widely used in the literature. All scales used for shoulder diseases in Turkey are adapted scales. In the scope of our planned scale development study specific to the Turkish population, the stages of scope determination, expert opinions, and ensuring content validity were conducted for a new scale. Through literature review, expert opinions, and patient reports, the scope of the intended scale to be developed was determined as the assessment of shoulder functionality. A pool of 34 items was created by considering symptoms expressed by shoulder patients, articles containing patient expressions in the literature, developed scales for the shoulder in the literature, and clinician opinions. An expert panel consisting of 8 specialists was established to test the content validity and linguistic validity of the item pool. Expert opinions were obtained twice digitally through the Google Forms platform for the items in the pool. After the first expert opinion, the content validity rate (CVR) for 5 items was 0,778 or higher. The first expert opinions and the items were revised based on the CVR, resulting in a revised pool of 21 items. The revised item pool was sent again to the same experts through the Google Forms platform for reevaluation. The CVR was calculated for the items again based on expert opinions. After the second expert opinion, it was observed that 20 items had a CVR value of 0,778 or higher. One item with a CVR value below 0,778 was removed from the scale. According to these results, the total content validity indeks (CVI) of the scale was calculated as 0,984375, and the draft scale consisting of 20 items reached its final form. The concepts of CVR and CVI were explained in simple terms in the context of our sample study to illustrate how they would be used in the scale development process. The use of different CVI thresholds in studies was analyzed.

Keywords: Scale, Content Validity, Content Validity Ratio



1. Giriş

Ölçme, araştırmacıların insanlar, nesnelere, olaylar ve süreçler hakkında bilgi edinmelerini sağlayan bilimin temel faaliyetlerinden biridir. Ölçekler, bazı sayısal boyutlardaki puanları doğrudan ölçülemeyen olaylara atfetmek için yararlı araçlardır. Doğrudan gözlemlenemeyen teorik değişkenlerin seviyelerini ortaya koyan maddelerden oluşurlar [1].

Araştırmalarda hasta bildirimli veya klinisyen tarafından uygulanan ölçekler uzun yıllardır oldukça tercih edilmektedir. Özellikle klinisyenlerin hastalığın, hastanın yaşamı üzerine gerçek etkisini ve kişiden kişiye değişiklik gösteren hastalık deneyimini anlamasının karmaşık olması, hasta bildirimli ölçeklerin popülerliğinin artmasına sebep olmuştur [2]. Ülkemizde omuz problemlerini değerlendirmede kullanılan ölçeklerin tamamı farklı kültürlerde geliştirilmiştir. Her ne kadar ölçeklerin Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışmaları yapılmış olsa da bu ölçeklerde yer alan maddelerin bir kısmının ülkemizdeki omuz hastaları tarafından tam olarak anlaşılmadığı klinisyenler/araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir. Kol, Omuz ve El Sorunları Anketi'nde [3] yer alan meyve taşıma, suda taş sektirme, çelik çomak oynama; L'Insalata Omuz Puanlama Anketi'nde [4] yer alan tenis servis topu atma, Penn Omuz Skoru'nda [5] yer alan yüzme, baş üstü raket sporları; Western Ontario Rotator Kaf Anketi'nde [6] yer alan şınav çekmek gibi örnekler Türkiye'de tedavi alan omuz hastalarının sık yapmadığı aktiviteler olarak düşünülmektedir. Yine bu ölçeklerden Kol, Omuz ve El Sorunları Anketi ve L'Insalata Omuz Puanlama Anketi 5'li Likert, Penn Omuz Skoru 5 li Likert ve Numerik, Western Ontario Rotator Kaf Anketi Vizüel Analog Skala gibi ölçeklendirme yöntemini kullanmaktadır. Klinik deneyimlerimiz göstermektedir ki, ölçekler içerisinde yer alan bazı ifadeler ve kullanılan ölçeklendirme yöntemleri hastalar tarafından anlaşılama problemine neden olmaktadır. Bu anlaşılama problemi; hastanın mevcut durumunu doğru ifade edememesine,

hastanın ölçeğe olan ilgisini kaybetmesine ya da hastaların klinisyen/araştırmacıya fazladan sorular yöneltmesine, klinisyen/araştırmacının açıklamak için daha fazla zaman harcamasına neden olabilmektedir. Omuz fonksiyonundaki kayıplar günlük aktiviteler başta olmak üzere birçok günlük yaşam aktivitesinde hastaları etkilemektedir. Bu nedenle omza yönelik fonksiyonel problemlerin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere Türk toplumuna uygun kolay anlaşılır bir ölçek geliştirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Çeşitli yazarlar, ölçek geliştirme sürecinin teorik ve metodolojik titizlik gerektiren karmaşık ve sistematik prosedürleri içerdiği konusunda hemfikirdir. Bu yazarlara göre ölçek geliştirme süreci üç temel adımda gerçekleştirilebilir. İlk aşama ölçek kapsamının belirlenmesi ve madde oluşturma aşaması olarak ifade edilir [7]. Madde oluşturmak için tümdengelim, tümevarım veya ikisinin bir kombinasyonunu içeren yöntemler kullanılabilir. Tümdengelim yönteminde kapsamlı bir literatür taraması ve var olan ölçeklere dayalı maddeler oluşturulur [8]. Tümevarım yönteminde ise oluşturulan maddeler, hedef popülasyon görüşlerinden elde edilen nitel bilgilere dayandırılarak oluşturulur [9]. Ayrıca araştırmacı ölçek içerisinde yer almasını düşündüğü her madde ile ilgilendiği gibi ölçek içerisindeki talimatlar, madde sayısının uygunluğu, ölçeğin genel görünümü, maddelerin dil yönünden uygun olması basit, açık bir dil kullanılarak oluşturulmuş olması gibi ölçeğin bütünü ile de ilgilenmelidir[10].

Genellikle teorik analiz olarak adlandırılan ikinci adımda ölçeğin kapsam geçerliği değerlendirilir ve oluşturulan madde havuzunun istenen yapıyı yansıtması sağlanır [11]. Kapsam geçerliğini sağlamak için maddeler hakkında farklı görüşlere ihtiyaç vardır. Bu görüşler, geliştirilmek istenen ölçeğin kullanılacağı alandaki uzmanlar ve ölçeğin kullanıcılarından alınabilir. Burada amaç geliştirilen ölçeğin ilgili yapıyı uygun bir şekilde temsil ettiğinden emin olmaktır [12]. Kapsam geçerliği için Lawshe [13] ve Davis teknikleri çalışmalarda tercih edilmektedir. Lawshe tekniğinde, 5 ila 40 arası uzmandan görüş alınır. Tüm maddeler için uzmanlardan “madde gerekli”, “madde gerekli ancak yetersiz” ya da “madde gereksiz” şeklinde değerlendirme yapmaları istenir. Kapsam geçerliğinin yanı sıra maddenin anlaşılabilirliği, hedef kitleye uygunluğu gibi durumların değerlendirilmesi amacıyla da aynı yöntem kullanılarak uzman görüşü alınabilir. Bu şekilde her bir madde için uzmanların görüşleri doğrultusunda kapsam geçerlik oranları (KGO) hesaplanır. KGO her madde için “Gerekli” görüşünü belirten uzman sayısının (Nu), maddeye ilişkin görüş belirten toplam uzman sayısının (N) yarısına oranından 1 çıkarılmasıyla hesaplanır (Şekil 1). KGO sıfır veya negatif bir değer alır ise bu değere sahip maddenin kapsam geçerliği yoktur, ölçekte yer almamalıdır sonucu çıkmaktadır [14, 15]. Lawshe'ye [13] göre pozitif bir değere sahip her bir madde için $\alpha=0,05$ anlamlılık düzeyinde KGÖ'ne bakılması gerektiği ve uzman sayısına göre referans alınması gereken en düşük KGÖ Tablo 1'de belirtilmiştir. Ayre ve Scally [14] bu yaklaşımı incelemiş ve uzman sayısına göre oluşan KGÖ'yü tekrar belirlemişlerdir (Tablo 2). Her iki çalışmada da uzman görüşüne göre hesaplanan KGO, uzman sayısına göre hesaplanan KGÖ'nden yüksek olan maddelerin ölçekte yer alması uygun görülmektedir [13, 14].

$$KGO = \frac{Nu}{N/2} - 1$$

Şekil 1. Kapsam geçerlik oranı hesaplama formülü [12].

Tablo 1. Lawshe tarafından uzman sayısına göre hesaplanan KGÖ değerleri [9].

Uzman Sayısı	Minimum Değer	Uzman Sayısı	Minimum Değer	Uzman Sayısı	Minimum Değer	Uzman Sayısı	Minimum Değer
5	1,000	14	0,571	23	0,391	32	0,375
6	1,000	15	0,600	24	0,417	33	0,333
7	1,000	16	0,500	25	0,440	34	0,353
8	0,750	17	0,529	26	0,385	35	0,314
9	0,778	18	0,444	27	0,407	36	0,333
10	0,800	19	0,474	28	0,357	37	0,297
11	0,636	20	0,500	29	0,379	38	0,316
12	0,667	21	0,429	30	0,333	39	0,333
13	0,538	22	0,455	31	0,355	40	0,300

Tablo 2. Ayre ve Scally tarafından uzman sayısına göre hesaplanan KGÖ değerleri [10].

Uzman Sayısı	Minimum Değer	Uzman Sayısı	Minimum Değer	Uzman Sayısı	Minimum Değer	Uzman Sayısı	Minimum Değer
5	1,000	11	0,571	16	0,391	22	0,375
6	1,000	12	0,600	17	0,417	22	0,333
7	1,000	12	0,500	18	0,440	23	0,353
7	0,750	13	0,529	18	0,385	23	0,314
8	0,778	13	0,444	19	0,407	24	0,333
9	0,800	14	0,474	19	0,357	24	0,297
9	0,636	15	0,500	20	0,379	25	0,316
10	0,667	15	0,429	20	0,333	26	0,333
10	0,538	16	0,455	21	0,355	26	0,300

Davis yönteminde ise “Gerekli”, “Madde hafifçe gözden geçirilmeli”, “Madde ciddi olarak gözden geçirilmeli” ve “Gerekli değil” şeklinde derecelenmektedir. Bu yöntemde gerekli ve hafifçe gözden geçirilmeli seçeneğini ifade eden uzman sayısının, toplam uzman sayısına bölünmesiyle maddenin KGO belirlenmektedir. Lawshe yönteminden farklı olarak uzman sayısına göre hesaplanan bir KGÖ bulunmamaktadır. KGÖ değeri sabit 0.80 kabul edilerek bu değer üzerinde KGO’na sahip maddelerin ölçekte yer alması uygun görülmektedir [17].

Son adım olan psikometrik analizde araştırmacı ölçeğin yapı geçerliği ve güvenilirliğe sahip olup olmadığını değerlendirir. Yapı geçerliği, aracın gerçekte en çok neyi (Ölçümdeki puanın, performansın altında yatan yapı, özellik veya kavram) ölçtüğünü sorgular [18]. Ölçme aracının ölçtüğü faktörler, ölçme aracının diğer ölçme araçlarıyla ilişkisi, farklı iki grup arasındaki farklar incelenir. Yapı geçerliği için faktör analizi veya benzer ölçek geçerliği yöntemleri sıklıkla kullanılır [19]. Benzer ölçek geçerliği, ölçeğin sorguladığı alana ait puanının, aynı kavramı sorguladığı iddia edilen benzer bir ölçeğin sonuçları ile yüksek korelasyon göstermesi ile gerçekleştirilmektedir [20]. Faktör analizi yöntemi ise ölçek maddelerine cevap verenlerin maddelere verdiği tepkiler arasındaki düzeni incelemek için kullanılan bir tekniktir [21].

Çalışmamızda omuz problemi yaşayan hastalara yönelik hasta bildirimli, kolay anlaşılabilir yeni bir ölçek geliştirmek amacıyla planlanan bir çalışmada, ölçek geliştirme sürecinde madde havuzu oluşturulması, uzman görüşü alınması ve KGO hesaplanması hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmamız için Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu’ndan 06.01.2022 toplantı tarihli 35 karar numarası ile izin alındı. Literatür taraması [22, 23], alan uzmanlarının görüşleri ve hasta bildirimleri dikkate alınarak geliştirilmek istenen ölçeğin kapsamı omuz fonksiyonelliğinin değerlendirilmesi olarak belirlendi. Ölçek içerisinde olması planlanan maddeler için tümevarım ve tümdengelim yöntemlerinin ikisi de kullanıldı. Tümevarım yönteminde omuz problemi olan 47 hastanın şikayetlerini açık uçlu olarak, kendi ifadeleri ile nasıl tanımladıklarını sorguladığımız ön çalışmada hastalar tarafından ifade edilen semptomlar madde oluşturulurken dikkate alındı. Tümdengelim yönteminde ise literatürde yer alan omuz ölçekleri incelendi [22] [2] [23]. Bu ölçeklerin 13 tanesi omza yönelik geliştirilmiş Türkçe geçerlik güvenilirliği yapılmış hasta bildirimli ölçeklerdi. Alanda çalışan omuz konusunda deneyimli klinisyenlerin görüşleri de bire bir görüşme yöntemiyle alınarak 34 maddeden oluşan madde havuzunun ilk hali oluşturuldu.

Literatürde yer alan ölçeklerde çoğunlukla Likert, Vizüel Analog Skala, Numerik Skala gibi ölçeklendirme yöntemleri kullanılırken bir ölçekte ise evet/hayır yöntemi tercih edildiği görüldü. Bizim çalışmamızda ise toplumun geniş kesimlerince daha kolay anlaşılabilmesi ve cevaplanabilmesi açısından Likert sisteminin yaptığı çoklu değerlendirmeyi dört madde ile eşleştirerek evet/hayır şeklinde cevap almayı hedefleyen bir yapı oluşturuldu. Oluşturulan yapıda aynı fonksiyonu kolaydan zora doğru sıralayarak değerlendiren maddeler yer aldı (Şekil 2). Oluşturulan taslak ölçek, özellikle omuz eklemine de ilgilendiren üst ekstremitenin günlük yaşamdaki fonksiyonları ile ağrı ve uyku durumuna yönelik maddeleri içermekteydi. Madde havuzu ve ölçeklendirme yöntemi tasarlandıktan sonra uzman görüşü alınma aşamasına geçildi.

- a. Elimi kalçamın yan tarafına götürmekte zorlanıyorum.
- b. Elimi kalçamın arkasına götürmekte zorlanıyorum.
- c. Elimi belime götürmekte zorlanıyorum.
- d. Elimi belimden sırtıma kadar götürmekte zorlanıyorum.



Evet Hayır

Evet Hayır

Evet Hayır

Evet Hayır

Şekil 2. Ölçek içerisinde yer alması planlanan madde örneği.

Uzman görüşü alınmasındaki amaç ölçeğin kapsam geçerliği ve dil geçerliğinin sağlanmasıydı. Çalışmamızdaki ifadelerin Türkçe yazımı ve anlaşılabilirliğinin kontrolü açısından uzman kurulunda 1 dil bilimciye yer verildi. Bununla birlikte omuz konusunda klinik deneyimleri olan 1 ortopedi ve travmatoloji uzmanı ile 6 fizyoterapistin de katılımı ile 8 kişiden oluşan uzman kurulu oluşturuldu (Tablo 3).

Tablo 3. Uzman kurulu

	Branş	Unvan	Kurum
1.	Fizyoterapist	Profesör	Hacettepe Üniversitesi
2.	Fizyoterapist	Profesör	Süleyman Demirel Üniversitesi
3.	Fizyoterapist	Doçent	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
4.	Dil Bilimci	Doçent	Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
5.	Ortopedist	Doçent	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
6.	Fizyoterapist	Doktor Öğretim Üyesi	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
7.	Fizyoterapist	Doktor Öğretim Üyesi	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
8.	Fizyoterapist	Araştırma Görevlisi	Cardiff Üniversitesi

Uzmanlardan her madde için Lawshe tekniğine göre “gerekli”, “gerekli ama yetersiz”, “gereksiz” değerlendirmeleri ve bu değerlendirmelerin gerekçelerini belirtmeleri istenen form Google Formlar platformu üzerinden uzmanlara gönderildi. Uzmanlardan, günlük yaşamda sık kullanılan, klinik ortamında deneyimlenebilen, somut olarak derecelendirilebilen, toplumun her kesimine hitap edebilen, dörtlü evet/hayır cevabının alınabildiği maddelere yer verildiğini bu kapsamda madde havuzunu değerlendirmeleri talep edildi. Uzman görüşleri sonrası maddelerin KGO'ları Şekil 1'deki formüle göre hesaplandı (Tablo 2).

Ayre ve Scally'nin (10) hesapladıkları KGÖ'ye göre 8 uzmandan oluşan bir çalışmada her maddenin en düşük KGO'nun 0,778 olması gerekmektedir. Tüm maddelerin KGO'nun toplanarak madde sayısına bölünmesi ile ölçeğin toplamına ait KGÖ elde edilmektedir. Bu değer 0.80 ve üzerinde olması kabul edilebilir değer olarak ifade edilmektedir [24]. Bizde çalışmamızda uzman görüşü sonuçlarından 0,778 ve üzeri KGO değeri alan maddeleri ölçeğe dahil ettik.

3. Bulgular

Birinci uzman görüşü süreci sonrası maddelerin KGO'ları Şekil 1'deki formül ile Excel programı kullanılarak hesaplandı. Bu hesaplama sonucu 34 maddeden 5 tanesinin KGO 0,778 ve üzeri bir değerdedi (Tablo 4).

Birinci uzman görüşleri sonrası çalışmanın KGÖ 0,42 olarak hesaplandı. Birinci uzman görüşleri doğrultusunda yapılan değerlendirmede; kıyafet çıkarma aktivitesinin derecelendirilememesi, mutfak tezgahından eşya taşınmasına yönelik maddeyi her hastanın günlük hayatında yapmıyor olabileceği, omzumdaki rahatsızlık aklıma geliyor maddesi fonksiyonelliği ölçmediği, yıkanmak sorusunun derecelendirilemediği, ağırlık aktarma sorusunun anlaşılmıyor olması, kıyafet giyme aktivitesinin başka maddelerde sorgulandığı, kolu koruyarak hareket etmenin kinezyofobiye değerlendirmeyeceği ve hastanın sayısal olarak ifade edemeyeceği, kol ile her yöne uzanma sorusunun diğer maddeleri kapsadığı, fermuar kapatma ve düğme ilikleme sorusunun diğer maddelerde sorgulandığı, kurulanma sorusunun derecelendirilemediği, omzu ovma sorusuna her hastanın farklı yaklaşım geliştirebileceği, diş fırçalama sorusunda dominant kullanımın farklı olabileceği gibi görüşler nedeniyle 13 madde madde havuzundan çıkarıldı. Uzman görüşleri doğrultusunda 34 madde içeren madde havuzu 21 madde olarak yenilendi.

Tablo 4. Birinci uzman görüşü sonrası oluşan maddelerin KGO.

	KGO		KGO		KGO
1.Md.	0,1875	13.Md.	0,25	25.Md.	1
2.Md.	0,0625	14.Md.	0	26.Md.	0
3.Md.	0,6875	15.Md.	0,125	27.Md.	0
4.Md.	0,1875	16.Md.	0,3125	28.Md.	0,375
5.Md.	0,4375	17.Md.	-0,1875	29.Md.	1
6.Md.	0,25	18.Md.	0,75	30.Md.	1
7.Md.	0,625	19.Md.	0,25	31.Md.	1
8.Md.	0,5	20.Md.	0,375	32.Md.	1
9.Md.	0,125	21.Md.	0,4375	33.Md.	0,5
10.Md.	0,5625	22.Md.	0	34.Md.	0,75
11.Md.	0,6875	23.Md.	0,75		
12.Md.	0,1875	24.Md.	0,0625		

KGO: Kapsam Geçerlik Oranı, Md.: Madde

Yenilenen madde havuzu, tekrar değerlendirilmesi için 2. kez aynı uzmanlara Google Formlar platformu üzerinden gönderildi. Uzman görüşleri sonrası tekrar maddelerin KGO hesaplandı (Tablo 5). İkinci uzman görüşü sonrası 20 maddenin KGO'nun 0,778 ve üzeri bir değerde olduğu görüldü. 0,778 değeri altında bir KGO'ya sahip 1 madde ölçekten çıkarıldı. Çıkarılan madde için günlük hayatta sık kullanılan bir aktivite olmaması gerekçe olarak belirtilmişti. Bu değerlere göre ölçeğin toplam KGÖ 0,98 olarak hesaplandı ve 20 maddeden oluşan taslak ölçek son halini aldı.

Tablo 5. İkinci uzman görüşü sonrası oluşan maddelerin KGO.

	KGO		KGO		KGO
1.Md.	1	8.Md.	1	15.Md.	1
2.Md.	1	9.Md.	1	16.Md.	1
3.Md.	0,9375	10.Md.	1	17.Md.	1
4.Md.	1	11.Md.	0,4375	18.Md.	1
5.Md.	0,8125	12.Md.	1	19.Md.	1
6.Md.	1	13.Md.	0,9375	20.Md.	1
7.Md.	1	14.Md.	1	21.Md.	1

KGO: Kapsam Geçerlik Oranı, Md.: Madde

4. Tartışma ve Sonuç

Omuz problemlerini değerlendirmede yeni bir ölçek geliştirilmesi amacıyla planladığımız çalışmamız sonucunda, oluşturulan madde havuzunun uzman görüşü alınması süreci sonrasında madde havuzunda yer alan maddelerin 20'sine ait KGO değerinin 0,778 üzerinde olduğu belirlendi.

Türkiye'de kültürel adaptasyonları yapılarak kullanılan omuz ölçekleri incelendiğinde Amerikan Omuz ve Dirsek Cerrahları Standart Omuz Değerlendirme ölçeğinde [25] çalışmamızdan farklı olarak kapsam geçerliği için tavan-taban etkisi yöntemi kullanılmıştır. Omuz Ağrı Dizabilite İndeksi anketinin Türkçe geçerlik ve güvenilirliğinde [26] kapsam geçerliğine yer verilmemiş ancak Alman kültürel adaptasyon çalışmasında [27] KGO 0,68 ila 0,89 arasında olduğu, KGÖ'nün 0,94 olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda da KGO 0,81 ila 1 değeri arasında ve KGÖ 0,98 hesaplanarak kapsam geçerliğinin sağlandığı literatürle uyumlu olarak ortaya koyuldu. KGO, KGÖ kavramları örnek çalışmamız üzerinde anlatılarak ölçek geliştirme sürecinde nasıl kullanılacağı basit bir dille ifade edildi.

Literatürde uzman sayısına bağlı olarak hesaplanan KGÖ'nde fikir birlikteliği oluşmadığı görülmüştür. Ölçek geliştirmede kullanılan kapsam geçerliği başlıklı çalışmada, Ayre ve Scally'in [14] çalışmaları kaynak gösterilerek 8 kişilik bir uzman kurulunda KGÖ'nün en az 0,75 olması gerektiği belirtilmiştir [16].

Geçkil ve Tikici [28] ise Lawshe'nin [13] çalışmasını referans göstererek 8 kişilik bir uzman kurulunda KGÖ'nün 0,78 olması gerektiğini belirtmişlerdir. Lawshe ve Ayre'nin çalışmaları incelendiğinde; KGÖ hesaplanmasını ilk olarak 1975 yılında Lawshe'nin hesapladığı ve 2014 yılında Ayre ve Scally'in bu hesaplama yöntemini analiz ederek güncelleme yaptıkları belirlenmiştir. Lawshe 8 kişilik bir uzman kurulunda KGÖ'nün 0,75 olması gerektiğini, Ayre ve Scally ise 8 kişilik bir uzman kurulunda KGÖ'nün 0,778 olması gerektiğini çalışmalarında belirtmişlerdir. Çalışmalardaki bu farklılığın Ayre ve Scally'in makalelerinde yer alan karşılaştırmalı tablo okumasındaki hatadan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bizim çalışmamızda da Ayre ve Scally'in hesapladığı gibi KGÖ 0,778 kabul edilerek madde analizleri yapılmıştır.

Madde havuzunda yer alan maddelerin dijital ortamda Google Formlar platformu kullanılarak uzman görüşleri alınmış ve KGO'ları hesaplanmıştır. Uzman görüşünün, fiziki formlar kullanılarak değil de dijital olarak Google Formlar platformu kullanılarak alınmasının fiziki yöntemlere göre daha kolay olduğu uzmanlar tarafından ifade edilmiştir. Bu yöntemin kâğıt israfını önlemek ve kırtasiyeciliği azaltmak açısından daha yaygın kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

İlk uzman görüşü alınma sürecini takiben, hesaplanan KGO değerlerinde beklenen değer altında kalan maddeler için, uzmanların önerileri de dikkate alınarak yapılan değişiklikler sonucu maddelerin KGO değerleri ve ölçeğin toplam KGÖ değerinin yükseldiği belirlendi. Bu durumun yapılan değişiklikler ile ölçekte yer alan maddelerin hastalar tarafından daha kolay anlaşılabilir olması ve değerlendirilmesi hedeflenen parametrelerin ölçülmesinde daha güvenilir hale gelmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamız bu yönüyle ikinci kez uzman görüşü alınarak KGO hesaplanabileceğini gösteren literatürdeki sayılı çalışma içerisinde yer almıştır.

Çalışmamızda uzman kurulu oluşturulması sürecinde alanda ölçüğü kullanabilecek farklı disiplinlerden profesyonellere yer verilmemiş olması çalışmamızın bir limitasyonu olarak ifade edilebilir.

Bu çalışma ölçek geliştirme çalışmalarında kapsam belirleme, uzman görüşü alınması ve kapsam geçerliğinin sağlanması aşamalarını örnek bir çalışma ile göstermiştir. Ölçek geliştirmede uzman sayısına göre dikkate alınan KGÖ'nün kullanımında referans kaynaklara dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Teşekkür

Bu çalışma; TÜBİTAK 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programları kapsamında desteklenmektedir.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

[1] Morgado FF, Meireles JF, Neves CM, Amaral A, Ferreira ME. Scale development: ten main limitations and recommendations to improve future research practices. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. 2017;30.

[2] Jayakumar P, Williams M, Ring D, Lamb S, Gwilym S. A systematic review of outcome measures assessing disability following upper extremity trauma. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons Global Research & Reviews*. 2017;1(4).

[3] Düger T, Yakut E, Öksüz Ç, Yörük S, Bilgutay B, Ayhan Ç, et al. Reliability and validity of the Turkish version of the Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) Questionnaire. *Turkish Journal of Physiotherapy Rehabilitation-Fizyoterapi Rehabilitasyon*. 2006;17(3).

[4] Yaşar P. Linsalata omuz puanlama anketi Türkçe versiyonunun psikometrik özellikleri: Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

[5] Hazar Kanik Z, Gunaydin G, Pala OO, Sozlu U, Alkan ZB, Citaker S, et al. Translation, cultural adaptation, reliability, and validity of the Turkish version of the Penn Shoulder Score. *Disability and Rehabilitation*. 2018;40(10):1214-9.

- [6] El O, Bircan C, Gulbahar S, Demiral Y, Sahin E, Baydar M, et al. The reliability and validity of the Turkish version of the Western Ontario Rotator Cuff Index. *Rheumatology international*. 2006;26:1101-8.
- [7] Slavec A, Drnovšek M. A perspective on scale development in entrepreneurship research. *Economic and business review*. 2012;14(1):3.
- [8] Hinkin TR. A review of scale development practices in the study of organizations. *Journal of management*. 1995;21(5):967-88.
- [9] Kapuscinski AN, Masters KS. The current status of measures of spirituality: A critical review of scale development. *Psychology of Religion and Spirituality*. 2010;2(4):191.
- [10] Pasquali L. *Instrumentação psicológica-fundamentos e práticas (Artmed)*. Porto Alegre. 2010.
- [11] Arias MRM, Lloreda MVH, Lloreda MJH. *Psicometría: Alianza Editorial*; 2014.
- [12] Nunnally JC. *Psychometric theory*. 1967.
- [13] Lawshe CH. A quantitative approach to content validity. *Personnel psychology*. 1975;28(4):563-75.
- [14] Ayre C, Scally AJ. Critical values for Lawshe's content validity ratio: revisiting the original methods of calculation. *Measurement and evaluation in counseling and development*. 2014;47(1):79-86.
- [15] Wilson FR, Pan W, Schumsky DA. Recalculation of the critical values for Lawshe's content validity ratio. *Measurement and evaluation in counseling and development*. 2012;45(3):197-210.
- [16] Yeşilyurt S, Çapraz C. A road map for the content validity used in scale development studies. *Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*. 2018;20(1):251-64.
- [17] Davis LL. Instrument review: Getting the most from a panel of experts. *Applied nursing research*. 1992;5(4):194-7.
- [18] Churchill Jr GA. A paradigm for developing better measures of marketing constructs. *Journal of marketing research*. 1979;16(1):64-73.
- [19] Karakoç AGDFY, Dönmez L. Ölçek geliştirme çalışmalarında temel ilkeler. *Tıp Eğitimi Dünyası*. 2014;13(40):39-49.
- [20] Yılmaz E, Eser E, Sekuri C, Kultursay H. Miyokart Enfarktüsü Boyutsal Değerlendirme Ölçeği (MIDAS) Türkçe sürümünün psikometrik özellikleri. *Anatolian Journal of Cardiology/Anadolu Kardiyoloji Dergisi*. 2011;11(5).
- [21] Tavşancıl E. *Tutumların ölçülmesi ve SPSS ile veri analizi*. 2010.
- [22] Giesinger JM, Kesterke N, Hamilton DF, Holzner B, Jost B, Giesinger K. Development of an item list to assess the forgotten joint concept in shoulder patients. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2015;16:1-8.
- [23] Karakaya PYSYIÇKMG. Omuz Ağrısının Değerlendirilmesinde Kullanılan Hasta Bildirimli Sonuç Ölçümleri. 2nd International Health Science And Life Congress (IHSIC 2019) Burdur, Turkey. 2019.
- [24] Polit DF, Beck CT. The content validity index: are you sure you know what's being reported? Critique and recommendations. *Research in nursing & health*. 2006;29(5):489-97.
- [25] Michener LA, McClure PW, Sennett BJ. American Shoulder and Elbow Surgeons Standardized Shoulder Assessment Form, patient self-report section: reliability, validity, and responsiveness. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 2002;11(6):587-94.
- [26] Bumin G, Tüzün EH, Tonga E. The Shoulder Pain and Disability Index (SPADI): Cross-cultural adaptation, reliability, and validity of the Turkish version. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*. 2008;21(1):57-62.
- [27] Angst F, Goldhahn J, Pap G, Mannion A, Roach K, Siebertz D, et al. Cross-cultural adaptation, reliability and validity of the German Shoulder Pain and Disability Index (SPADI). *Rheumatology*. 2007;46(1):87-92.
- [28] Geçkil T, Tikici M. *Örgütsel demokrasi ölçeği geliştirme çalışması*. 2015.

Yeni Nesil Kozmetik Peptid Argireline (Asetil heksapeptid-8) Molekülünün *in vitro* Anti-Tirozinaz, Anti-Kollajenaz, Anti-Elastaz ve Anti Hyalüronidaz Etkilerinin Araştırılması

Investigation of In vitro Anti-Tyrosinase, Anti-Collagenase, Anti-Elastase and Anti-Hyaluronidase Effects of New Generation Cosmetic Peptide Argireline (Acetyl Hexapeptide-8) Molecule

Başak GÖKÇE^{1*} 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta Türkiye



Ö Z

Bu çalışma, yeni nesil kozmetik peptid argireline molekülünün cilt yaşlanma süreçlerinde yer alan bazı enzim aktiviteleri üzerindeki değişimini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Tirozinaz, kolejenaz, elastaz ve hyalüronidaz enzimleri cilt yaşlanmasında, doğrudan ve terapötik etkileri nedeniyle dikkat çeken enzimlerdir. Yüksek elastaz inhibisyonu kırışıklık önleyici, tirozinaz inhibisyonu beyazlatma etkili, kolejenaz inhibisyonu esneklik ve hyalüronidaz inhibisyonu anti-inflamasyon etkisi göstermektedir. Bu nedenle, son dönemlerde kozmetikte trend olarak kullanılan argireline molekülünün, etkinliği çalışılmıştır. Test edilen genel aktiviteler göz önüne alındığında, argireline bileşiğinin umut verici yaşlanma karşıtı bileşik olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Argireline, tirozinaz, kollajenaz, elastaz, ve hyalüronidaz

Alınış / Received: 21.07.2023 Kabul / Accepted: 27.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

This study was designed to evaluate the alteration of the new generation cosmetic peptide argireline molecule on some enzyme activities involved in skin aging processes. Tyrosinase, collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes are the enzymes that attract attention due to their direct and therapeutic effects in skin aging. High elastase inhibition anti-wrinkle, tyrosinase inhibition whitening effect, collagenase inhibition elasticity and hyaluronidase inhibition anti-inflammation effect. For this reason, the effectiveness of the argireline molecule, which has been used as a trend in cosmetics recently, has been studied. Considering the overall activities tested, the argireline compound was judged to be a promising anti-aging compound.

Keywords: Argireline, tyrosinase, collagenase, elastase, and hyaluronidase



1. Giriş

Peptitler, kollajen üretimini uyaran, hücresel süreçleri tetikleme yeteneği vaat eden, kısa amino asit dizili zincirlerdir [1]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, aktif kozmesötik bileşenler olarak peptitler, yara iyileşmesine ve insan derisi fibroblastlarının büyüme uyarımı üzerine evrildi. Yaşlanan ve deforme olmuş cildin hücresel ve biyokimyasal süreçlerine yönelik ileri araştırmalar, bu süreçleri yavaşlatmak için yeni stratejilere hedeflenmiştir. Hücre büyümesi için anahtar bir enzim olan protein kinaz C'nin aktivasyonu yoluyla, büyüme faktörleri olarak hareket eden peptitler üzerinde mevcut çalışmalar bulunmaktadır [2].

Kollajenaz, elastaz ve hiyalüronidaz cilt yaşlanmasında doğrudan rol oynayan enzimlerdir [3]. Cilt yaşlanması insan vücudunda ilerleyici bir biyolojik süreçtir ve sadece zamana bağlı değildir. Aslında, esas olarak içsel (kronolojik) ve dışsal yaşlanmadan (foto-yaşlanma) kaynaklanmaktadır. Bu ikinci mekanizma, ultraviyole (UV) radyasyonlarının maruz kalmasından ve dış etkenlerden (kirilliliğe veya nikotine maruz kalma.. gibi) kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Bu yaşlanma süreci, örtü sisteminin farklı bileşenlerinde değişiklikler getirir. Hücre katman sayısı değişirse de epidermis inceler. Kronik UV hasarlı insan derisinde kan damarları da gittikçe azalır. Bu hasarın, elastik liflerin, kollajen liflerin ve hyaluronik asidin degradasyonu ile üst dermal bağ dokusunda belirgin dejeneratif değişiklikler sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bunun nedeni muhtemelen, fibroblastlar ve çeşitli inflamatuvar hücrelerde üretilen elastaz, kollajenaz ve hyalüronidaz ekspresyonunun artmasıdır [4].

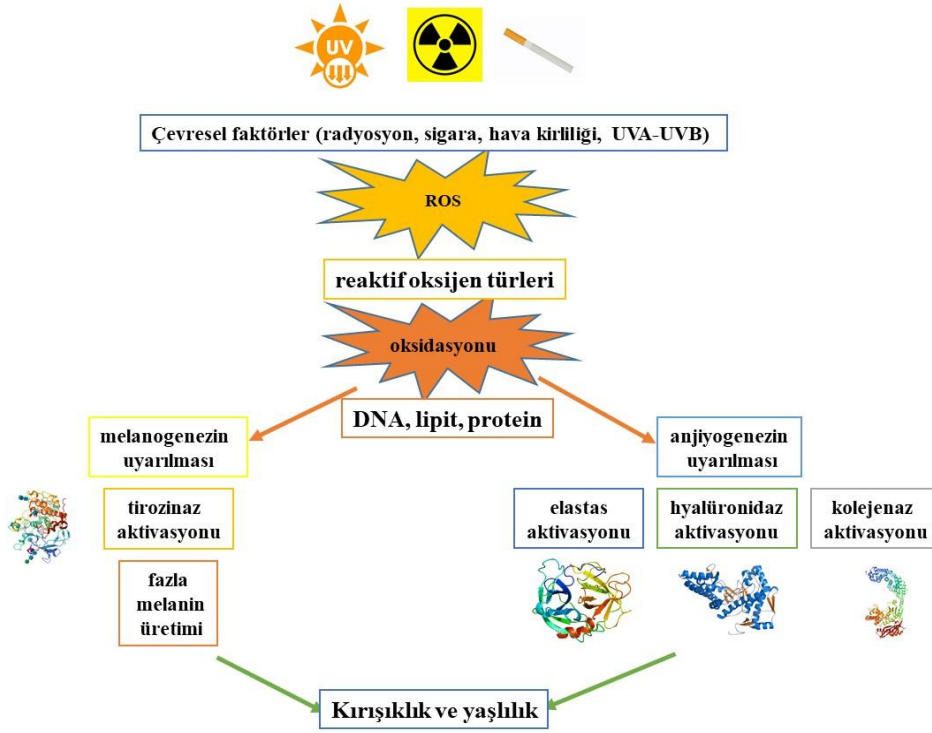
Elastin, deri de dahil olmak üzere bağ dokularında bulunan elastik özelliklere sahip bir proteindir. Gerilme veya geri tepme sonrası doku yapısının korunmasında önemli bir role sahiptir. Birkaç çalışma, cilt yaşlanmasının doğrudan elastinin bozulmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [5, 6]. UV ışınlarına aşırı maruz kalma ve aşırı ROS üretimi, dermal elastin fiber ağının hidroksilasyonuna neden olan elastaz ekspresyonunu tetikler. Elastaz inhibitörleri, dermal elastik liflerin doğrusallığını ve cilt elastikitesini artırarak kırışıklıkları ve sarkmaları önleyebilir [7].

Hyaluronik asit, kırışıklıkların azalmasında, yaraların iyileşmesinde ve cildin pürüzsüz ve nemli kalmasında önemli bir rol oynar. Hyalüronidaz enzimi, hyaluronik asidin hidrolizini katalize ederek vücut sıvılarının viskozitesini azaltır ve bağ dokularının geçirgenliğini artırır. Bu nedenle hyalüronidaz inhibitörleri, hyaluronik asidin anabolizması ve katabolizması arasındaki dengeyi koruyan, cildi nemli ve pürüzsüz tutan etkili düzenleyici ajanlardır [8].

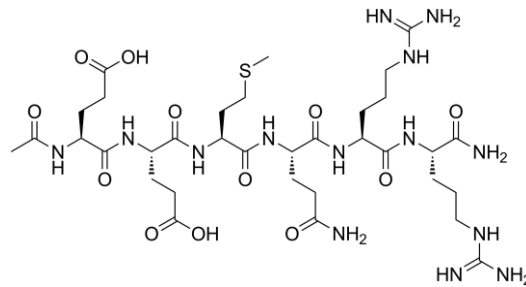
Öte yandan UV güneş ışığı ve reaktif oksijen türleri (ROS), melanin üretim ve dağıtım süreci olan melanogenezini aktive eder (Şekil 1). Melanin pigmentinin varlığı nedeniyle cilt pigmentasyonunda rol

oyunayan anahtar protein olan tirozinaz (tyr) aktive edilir ve hiperpigmentasyon üretilir. Melanin pigmenti içeren melanositlerin sayısı azalır ve boyutu artar. Melanin, cilt renginden sorumlu ana maddedir. UV güneş ışığını %75'e kadar emerek ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyerek cildi korumaktan da sorumludur [9]. Tirozinaz, melanositlerde melanin sentezini katalize etmekten sorumlu bakır içeren bir monooksijenazdır. Cildin anahtar düzenleyici enzimlerinden biridir. Melazma, iltihaplanma sonrası hiperpigmentasyon ve güneş çilleri gibi yüz hiperpigmentasyon bozuklukları, hastaların yaşam kalitesi üzerinde büyük etkisi olabilen ve genellikle tedavisi zor olan sık görülen cilt rahatsızlıklarıdır. Ayrıca cilt yaşlanma bozuklukları ile de ilişkilidirler [10].

Yukarıdaki bilgiler ışığında, insan vücudundaki enzimlerin etkilerini değerlendirme, geniş bir biyolojik kozmetik yelpazesi için yeni terapötikleri anlamak ve bulmak açısından önemlidir. Ticari adı, argireline olarak da bilinen asetil heksapeptid-8, botoks benzeri cilt sıkılaştırma etkileri sayesinde son zamanlarda çok fazla ilgi gören bir peptittir [11]. Ancak botoksun yüksek nörotoksitesisi, kullanımını ciddi şekilde sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, botoksun etkisini taklit eden, toksik olmayan moleküllerin tasarlanmasına ve doğrulanmasına ihtiyaç vardır [12]. Çalışmada; yeni nesil bir peptid olan argireline bileşiğinin (Şekil 2) yukarıda bahsedilen kollajenaz, elastaz, hyaluronidaz ve tirozinaz enzimleri üzerine etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1: Biyolojik enzimlerin yaşlanma ve kırışma sürecine etkileri



Şekil 2: Argireline (Asetil heksapeptid-8) molekülünün kimyasal yapısı

2. Materyal ve Metot

Tirozinaz Enzim Aktivitesi

Tüm saflaştırma basamakları 25°C'de gerçekleştirildi. 50 g muz, hızla ince dilimler halinde kesildi. 100 mL pH 7,3 0.1 M fosfat tamponu, %5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit içeren reaksiyon ortamında 2 dakika blenderda karıştırıldı. Elde edilen homojenat süzöldükten sonra, süzöntü 40 dakika boyunca +4 °C'de 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatana %80 doygunlukta (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi uygulandı. Nihai çökelti, minimum hacimde 5 mM fosfat tamponu içinde çözüldü ve daha sonra aynı tampona karşı diyaliz edildi. Enzim solüsyonu daha sonra, pH 5.0 5 mM fosfat tamponu ile önceden dengelenmiş Sepharose 4B-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolonuna uygulandı [13]. Afinite jeli, muzdan elde edilen tirozinaz enzimi elüe edilmeden önce, 1 M NaCl ve 5 mM pH 7.0 fosfat tamponu ile yıkandı. Enzim aktivitesi Espin ve ark. yöntemine göre [14], katekol substratı kullanılarak, 420 nm'de absorbans artışı ölçülerek ve 3 kez tekrar edilerek belirlendi. Pozitif standart olarak, kojik asit kullanılmıştır.

Kollajenaz Enzim Aktivitesi

Kollajenaz enzim aktivitesi yöntemi, literatürde bildirilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmesiyle, mikropate okuyucuda gerçekleştirilmiştir [15].

Aktivite ölçümü için, 400 mM NaCl ve 10 mM CaCl₂ ile pH 7.5 içeren, aktivite tamponu hazırlanmıştır. Ticari olarak, *Clostridium histolyticum*'dan (ChC - EC.3.4.23.3-Sigma) elde edilen kollajenaz enzimi, 0.8 U/mL başlangıç konsantrasyonunda kullanılmak üzere tampon içinde çözülmüştür. Sentetik substrat N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) aktivite tamponunda 2 mM'a kadar çözülmüştür. Negatif kontroller su ile gerçekleştirilmiştir. 335 nm'deki absorbans, substrat eklendikten hemen sonra ölçülmüştür ve epigallokatekin galat 250 µM (0.114 mg/mL) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Elastaz Enzim Aktivitesi

Elastazın inhibisyonu, enzimin N-succ-(Ala)₃-nitroanilid (SANA) substratı ile reaksiyonu sırasında p-nitroanilin üretiminin ölçülmesiyle belirlendi. Deney, domuz pankreas elastazını (3.3 g/mL) içeren Tris-HCl tamponu (0.1 M, pH 8.0) içinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 20 dakika boyunca argireline bileşiği varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Substrat (1.6 mM) eklendikten sonra enzim aktivitesi 410 nm'de izlendi. Oleanolik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Hyalüronidaz Enzim Aktivitesi

Hyaluronidazın inhibisyonu, Chompoo ve ark. [16] tarafından bildirilen yöntem ile belirlendi. 77 mM NaCl ve %0.01 sığır serum albümini (BSA) ile 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içeren 100 µL enzim çözeltisi (1.5 U) ile inkübe edildi. 37°C'de 10 dakika sonra, 100 µL substrat çözeltisi (300 mM sodyum fosfat içinde %0.03 hyaluronik asit, pH 5.35) ilave edildi ve reaksiyon karışımı, 45 dakika daha 37°C'de inkübe edildi. Hyaluronik asit, sodyum asetat (24 mM) ve asetik asit (79 mM, pH 3.75) içinde %0.1 BSA içeren 1 mL asit albümin çözeltisi ile çöktüldü. Oda sıcaklığında 10 dakika sonra, absorbans 600 nm'de izlendi. Oleanolik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı.

İstatiksel Analiz

Tüm testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir.

3. Bulgular

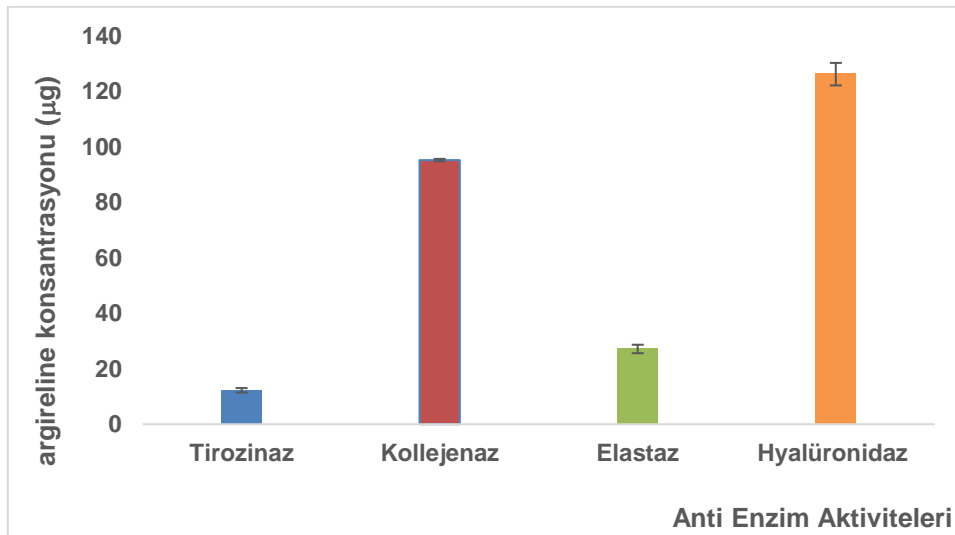
Tirozinaz, Kollajenaz, Elastaz ve Hyalüronidaz Enzimleri Üzerine Argirelinin Etkisi

Bu çalışma ilk kez, literatürde in vivo deneyleri [17] ve faz çalışmaları bulunan [18], ticari olarak yaygın şekilde kozmetik sektöründe kullanılan [19], bir heksapeptid molekülün biyokimyasal süreçleri tetikleyen yaşlılıkla alakalı enzimler üzerine inhibitör aktivitelerini ortaya koymuştur. Sentetik molekül argireline bileşiğinin farklı enzimlere (tirozinaz, elastaz, kollajenaz ve hyalüronidaz) karşı inhibisyon etkisi incelenmiştir. İnhibisyon profilleri; IC₅₀ değerleri hesaplanarak (Tablo 1) ve kıyaslanmaları sütun grafiği (Şekil 3) şeklinde verilmiştir. Yapılan çalışmada; bileşik tüm enzimleri kuvvetli bir şekilde inhibe etmiştir. En yüksek inhibitör etkisini, tirozinaz enzimine karşı göstermiştir.

Argireline bileşiği yüksek tirozinaz inhibitör aktivitesi (IC_{50} 12.24±0.80 μ M) sergilemiştir. Bu sonuç pozitif standart kojik asitten (IC_{50} 17.9 μ M) daha düşük bulunmuştur [20]. Kollajenaza karşı argireline bileşiği 95.28±0.45 μ M IC_{50} değeri ile, referans bileşik olan epigallokatekin galattan (IC_{50} = 120.8 μ M) 1.25 kat daha aktiftir [21]. Argirelin bileşiğinin anti elastaz aktivitesi (IC_{50} = 27.47±1.53 μ M), standart inhibitör olan oleanolik asit (IC_{50} = 25.7 μ M) [22] değeri ile çok yakın olduğu görülmüştür. Son olarak, hyalüronidaz enzimine karşı argirelin (IC_{50} = 126.78±2.56 μ M) pozitif referans olan, oleanolik asitten (IC_{50} = 212.4 μ M) [22] yaklaşık 1.5 kat daha etkili olduğu yapılan deneylerle belirlenmiştir.

Tablo 1: Tirozinaz, kollajenaz, elastaz ve hyalüronidaz enzimleri üzerine argirelinin etkisi

	Tirozinaz IC_{50} (μ M)	Kollajenaz IC_{50} (μ M)	Elastaz IC_{50} (μ M)	Hyalüronidaz IC_{50} (μ M)
Argireline	12.24±0.80	95.28±0.45	27.47±1.53	126.78±2.56



Şekil 3: Tirozinaz, kollajenaz, elastaz ve hyalüronidaz enzimleri üzerine argirelinin etkisi

4. Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda, tüketicilerin doğal kaynaklardan elde edilen koruyucu ve tedavi edici işlevi olan kozmetik ürünlere olan talebi, bu sektörü alternatif etken madde arayışlarına yöneltmiştir. Biyoaktif peptitler, geniş bir biyoaktivite yelpazesine sahiptir ve bu durum onları bu kozmetik ürünlerin geliştirilmesi için ideal adaylar haline getirmiştir. *In vitro* çalışmalar, biyoaktif peptitlerin elastaz, kollajenaz, tirozinaz ve hyalüronidaz gibi yaşlanma ile ilgili enzimleri inhibe etme özelliklerine ek olarak antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktiviteler dahil biyolojik özellikler sergilediğini göstermiştir [23].

Melanin, cilt renginden sorumlu ana pigmenttir. Bununla birlikte, melanin üretiminden sorumlu olan tirozinazın aşırı üretimi olduğunda, cilt hiperpigmentasyonuna neden olur ve bu da açık ila koyu kahverengi lekeler, yüz, boyun ve gövdede düzensiz gri lekeler ve solgunluk gibi daha koyu bir cilt görünümüne yol açar. Ayrıca cilt hiperpigmentasyonuna neden olan diğer faktörler; otoimmün durumlar, UV radyasyonuna maruz kalma, hormonal değişiklikler, genetik faktörler, hormonal tedavi veya doğum kontrol hapları ve yan etki reaksiyonlarına neden olan ilaçlardır [24]. Tirozinaz, oksidasyon reaksiyonunu katalize etmek için aktif bölgesinde bakır içeren bir enzimdir; bu nedenle, bu enzimi inhibe etmek için aktif bölgeyi bloke eden veya bakır iyonlarını şelatlayan biyoaktif bileşikler kullanılabilir.

Elastin; aort, akciğer, kıkırdak, elastik bağlar ve cilt gibi bağ dokularına esneklik sağlayan hücre dışı bir matris proteindir. Elastin, kollajenden kabaca 1000 kat daha esnektir; bu nedenle elastinin ana işlevi tam olarak dokuların esnekliğidir [25]. Elastin; vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bu süreç normalde vücut olgunluğa eriştiğinde ergenlikten hemen sonra durur. Kollajene ek olarak, cildin elastikiyetini ve sıkılığını korumak için elastin üretilir. Bununla birlikte, elastin liflerindeki azalma, elastaz enziminin aşırı üretilmesinden kaynaklanır ve ardından mekanik doku özelliklerini azaltır [26].

Kollajen, insanlarda bulunan en bol proteindir ve dermisin birincil yapısal bileşeni olarak, insan cildine güç ve destek vermenin yanı sıra cilt elastikiyetini ve esnekliğini geri kazandırmaktan sorumludur. En az 16 tip kollajen vardır, vücuttaki kollajenin yaklaşık %90'ı, tekrar eden bir Gly-Pro-X dizisi içeren ve karakteristik bir üçlü sarmal yapıya dönüşen tip I, II ve III'ten oluşur [27]. Normal ciltte, cildin elastikiyetini ve sıkılığını korumak için kollajen tekrar tekrar üretilir ve parçalanır. Bununla birlikte, genel olarak, kollajendeki azalma, matris-metaloproteazların ve kollajenaz enzimlerinin aşırı üretilmesinden kaynaklanır [28].

Hyalüronan olarak da adlandırılan hyaluronik asit, dermisin hücre dışı matrisinin bir biyopolimer bileşenidir ve insan vücudunun birçok dokusunda (örneğin eklem sıvısı, gözler, diş eti, iskelet dokuları ve kalp kapakçıkları) doğal olarak bulunur. Su bağlama kapasitesi nedeniyle ciltte nemin korunması ile ilişkilidir [29], cilt gençleşmesinde önemli bir rol oynar, viskoziteyi artırır ve hücre dışı sıvının geçirgenliğini azaltır [28]. Normal ciltte, cildin nemini korumak için hyaluronik asit üretilir. Ancak hyaluronik asitteki azalma hyalüronidaz enziminin aşırı üretilmesinden kaynaklanır. Şu anda kozmetik endüstrisi topikal uygulama için hyaluronik asit içeren ürünler sunmaktadır, ancak hyaluronik asidin eksojen uygulaması inflamatuvar bir cevaba neden olabilir [29]. Bu nedenle, hyaluronik asit degradasyonunun inhibisyonu, cildi korumak için gereklidir.

Bazı çalışmalar, ciltteki birçok fizyolojik yolu aynı anda faydalı bir şekilde etkileyebilen, çok işlevli biyoaktif peptitleri bildirmektedir. Ayrıca, *in vivo* çalışmalar, biyoaktif peptitlerin topikal uygulamasının veya tüketiminin kayda değer bir cilt korumasına sahip olduğunu ortaya koymuştur [30]. Bu özellikler, koruyucu etkinin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olsa da, biyoaktif peptitlerin spesifik fizyolojik işlevler sağlayarak cilt sağlığının iyileştirilmesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Cilt yaşlanmasıyla ilgili kozmetik pazarı sürekli olarak güçlü bir büyüme gösteriyor. Bu nedenle, yaşlanmayı ve lekelenmeyi önleyici maddeler üzerine yapılan araştırmalar, popüler araştırma alanlarındadır. Yeni nesil bir heksapeptid olan, argireline bileşiği, tirozinaz, kollajenaz, elastaz ve hyalüronidaz inhibisyonları ile birlikte hareket ederek, cilt yaşlanmasını ve bunun dispigmentasyon, kırışıklık, solgunluk ve çil gibi belirtilerini önleyebilir. Bununla birlikte, faydanın gerçekleşmesi için nihai ürünün formülde stabil olması, cilt tarafından emilmesi ve klinik fayda için hedefte biyolojik olarak aktif olması gerektiğini hatırlamak önemlidir.

Etik Beyanı

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

Kaynakça

- [1] Ruiz, M. A., Clares, B., Morales, M. E., Cazalla, S., & Gallardo, V. 2007. Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide. *Journal of Cosmetic Science*, 58(2), 157-171.
- [2] Schagen, S. K. 2017. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics*, 4(2), 16.
- [3] Lee, K. K., Cho, J. J., Park, E. J., & Choi, J. D. 2001. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent. *International Journal of Cosmetic Science*, 23(6), 341-346.
- [4] Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. 2013. Characteristics of the aging skin. *Advances in wound care*, 2(1), 5-10.

- [5] Godinho, M. S., Thorpe, C. T., Greenwald, S. E., & Screen, H. R. 2021. Elastase treatment of tendon specifically impacts the mechanical properties of the interfascicular matrix. *Acta biomaterialia*, 123, 187-196.
- [6] Navneet, S., Brandon, C., Simpson, K., & Rohrer, B. 2023. Exploring the Therapeutic Potential of Elastase Inhibition in Age-Related Macular Degeneration in Mouse and Human. *Cells*, 12(9), 1308.
- [7] Feng, M., Zheng, X., Wan, J., Pan, W., Xie, X., Hu, B., ... & Cai, S. 2021. Research progress on the potential delaying skin aging effect and mechanism of tea for oral and external use. *Food & Function*, 12(7), 2814-2828.
- [8] Hetta, M. 2020. Hyaluronidase inhibitors as skin rejuvenating agents from natural source. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 7(1), 4-4.
- [9] Chiocchio, I., Mandrone, M., Sanna, C., Maxia, A., Tacchini, M., & Poli, F. J. I. C. 2018. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Industrial crops and products*, 122, 498-505.
- [10] Chen, C. Y., Lin, L. C., Yang, W. F., Bordon, J., & D Wang, H. M. 2015. An updated organic classification of tyrosinase inhibitors on melanin biosynthesis. *Current Organic Chemistry*, 19(1), 4-18.
- [11] Kluczyk, A., Ludwiczak, J., Modzel, M., Kuczer, M., Cebrat, M., Biernat, M., & Baçhor, R. 2021. Argireline: Needle-Free Botox as Analytical Challenge. *Chemistry & Biodiversity*, 18(3), e2000992.
- [12] Wang, Y., Wang, M., Xiao, X. S., Huo, J., & Zhang, W. D. 2013. The anti-wrinkle efficacy of Argireline. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 15(4), 237-241.
- [13] Demir, D., Gençer, N., & Er, A. 2012. Purification and characterization of prophenoloxidase from *Galleria mellonella* L. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(6), 391-395.
- [14] Espín, J. C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J., & Garcíacanos, F. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical biochemistry*, 231(1), 237-246.
- [15] Van Wart HE, Steinbrink DR. 1981. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Analytical Biochemistry*, 113:356-365.
- [16] Chompoo, J.; Upadhyay, A.; Fukuta, M.; Tawata, S. 2012. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases related enzymes. *BMC Complementary Alternative Medicine Journal*. 12, 106
- [17] Gorouhi, F., & Maibach, H. I. 2009. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International journal of cosmetic science*, 31(5), 327-345.
- [18] Wang, Y., Wang, M., Xiao, S., Pan, P., Li, P., & Huo, J. 2013. The anti-wrinkle efficacy of argireline, a synthetic hexapeptide, in Chinese subjects: a randomized, placebo-controlled study. *American journal of clinical dermatology*, 14, 147-153.
- [19] Belsito, M. D., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks Jr, J. G., & Peterson, L. A. 2020. Safety Assessment of Acetyl Hexapeptide-8 and Acetyl Hexapeptide-8 Amide as Used in Cosmetics.
- [20] Cabanes, J., Chazarra, S., & Garcia-Carmona, F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(12), 982-985.
- [21] Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T., & Otake, S. 1993. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *Journal of periodontology*, 64(7), 630-636.
- [22] Facino, R. M., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., & Saibene, L. 1995. Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and saponinins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv der Pharmazie*, 328(10), 720-724.
- [23] Ahsan, F., Arnold, J. J., Meezan, E., & Pillion, D. J. 2003. Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations, enhances nasal and ocular peptide absorption. *International journal of pharmaceutics*, 251(1-2), 195-203.

- [24] Jung, H.J.; Noh, S.G.; Park, Y.; Kang, D.; Chun, P.; Chung, H.Y.; Moon, H.R. 2019. In vitro and in silico insights into tyrosinase inhibitors with (E)-benzylidene-1-indanone derivatives. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1255–1264.
- [25] Pintus, F., Floris, S., Fais, A., Era, B., Porcedda, C., Tuberoso, C. I. G., & Caddeo, C. 2022. Euphorbia characias Extract: Inhibition of Skin Aging-Related Enzymes and Nanoformulation. *Plants*, 11(14), 1849.
- [26] Widowati, W., Ginting, C. N., Lister, I. N. E., Girsang, E., Amalia, A., Wibowo, S. H. B., & Kusuma, H. S. W. 2020. Anti-aging effects of mangosteen peel extract and its phytochemical compounds: Antioxidant activity, enzyme inhibition and molecular docking simulation. *Tropical Life Sciences Research*, 31(3), 127.
- [27] Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., & Djadid, N. D. 2016. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 975-981.
- [28] Pham, C. H., Collier, Z. J., Fang, M., Howell, A., & Gillenwater, T. J. 2019. The role of collagenase ointment in acute burns: A systematic review and meta-analysis. *Journal of wound care*, 28(Sup2), S9-S15
- [29] Papaemmanouil, C. D., Peña-García, J., Banegas-Luna, A. J., Kostagianni, A. D., Gerothanassis, I. P., Pérez-Sánchez, H., & Tzakos, A. G. 2022. ANTIAGE-DB: A database and server for the prediction of anti-aging compounds targeting elastase, hyaluronidase, and tyrosinase. *Antioxidants*, 11(11), 2268.
- [30] Mortazavi, S. M., & Moghimi, H. R. 2022. Skin permeability, a dismissed necessity for anti-wrinkle peptide performance. *International Journal of Cosmetic Science*, 44(2), 232-248.

Sinus Ritmindeki Hastalarda Ekokardiyografik Aortik Sertlik Parametreleri ile CHA2DS2-VASc Skoru Arasındaki İlişki

The Relation Between Echocardiographic Aortic Stiffness Parameters and CHA2DS2-VASc Score in Patients With Sinus Rhythm

Fatih AKSOY ^{1*}, Ali BAĞCI ², İsmail Barkın IŞIK ²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye
² Rize Devlet Hastanesi, Kardiyoloji Bölümü, Rize, Türkiye

Ö Z

Amaç: CHA2DS2-VASc skoru, atriyal fibrilasyonda (AF) tromboembolik riski tahmin etmek için kullanılır. Ekokardiyografik aortik sertlik parametreleriyle ilişkisi bilinmemektedir. Mevcut çalışmada CHA2DS2-VASc skoruna göre hesaplanan risk gruplarında aortik sertlik parametrelerinin prediktif değeri araştırılmıştır.

Materyal-Metot: Kardiyolojik kontrol için rutin olarak başvuran toplam 272 hasta (116 kadın, 156 erkek, ort. yaş 61,76±11.5 yıl), CHA2DS2-VASc skorlarına göre iki gruba ayrıldı (skor 0 ve 1) düşük risk ve "≥2"yüksek risk olarak). 272 hastanın 153'ünde yüksek risk vardı.

Bulgular: Aortik gerilim ve aort esneyebilirliği yüksek riskli hastalarda düşük riskli bireylerde olduğundan anlamlı derecede düşüktü (8,9±3,2 ve 14,1±3,9; sırasıyla P<0,001 ve 3,4±2,3 ve 6,9±3,2; P<0,001, sırasıyla). Aortik sertlik indeksi ve elastik modulus yüksek riskli bireylerde düşük riskli bireylere göre anlamlı olarak daha yüksekti (6,5±2,9 ve 3,5±1,4; P<0,001 ve 766,6±374,5 vs. 348,4±175,9; P<0,001, sırasıyla). Aortik gerilim ve aort esneyebilirliği, yüksek risk grubuyla negatif korelasyon gösterdi. Aortik sertlik indeksi ve elastik modulus, yüksek risk grubuyla pozitif olarak korele idi. Çok değişkenli lojistik regresyon analizine göre, elastik modulus, CHA2DS2-VASc skoru açısından yüksek tromboembolik riskin bağımsız belirleyicisiydi.

Sonuç: Bulgularımız, Aort sertliği parametreleri ölçümünün, tromboembolik olaylar gibi kardiyovasküler riski değerlendirmede ek bilgi sağlayabileceğini ve aort sertliği bozuk olan kişilerin, olumsuz kardiyovasküler risk faktörlerini ve gelecekteki kardiyovasküler olayların gelişimini azaltmada daha fazla dikkat etmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: CHA2DS2-VASc skoru, aortik sertlik, tromboembolik risk

Alınış / Received: 01.02.2023 Kabul / Accepted: 01.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Background: The CHA₂DS₂-VASc score is used to estimate thromboembolic risk in atrial fibrillation (AF). Its relationship with aortic stiffness parameters is unknown.

Objective: We evaluated the predictive value of the aortic stiffness parameters in risk groups of CHA₂DS₂-VASc score.

Methods: A total 272 consecutive patients (116 females, 156 males, mean age 61.76±11.5 years) who admitted routinely for cardiologic control were divided into two groups according to CHA₂DS₂-VASc scores (a score of "0 and 1" was regarded as low risk, and "≥2" as high risk). 153 of 272 patients had high risk.

Results: Aortic strain and aortic distensibility were significantly lower in patients with in patients with high risk than in low risk subjects (8.9±3.2 vs. 14.1±3.9 respectively; P<0.001 and 3.4±2.3 vs. 6.9±3.2 respectively; P<0.001). Aortic strain index and elastic modulus were significantly higher in patients with high risk than in low risk subjects (6.5±2.9 vs. 3.5±1.4 respectively; P<0.001 and 766.6±374.5 vs. 348.4±175.9 respectively; P<0.001). Aortic strain and aortic distensibility were negatively correlated with high risk group. Aortic stiffness index and elastic modulus were positively correlated with high risk group. According to multivariate logistic regression analysis, elastic modulus was independent predictors of high thromboembolic risk in terms of CHA₂DS₂-VASc score.

Conclusion: Our findings suggest that Aortic stiffness parameters measurement could provide additional information on assessing cardiovascular risk such as thromboembolic events, and individuals with impaired aortic stiffness should receive more attention to reduce unfavorable cardiovascular risk factors and the development of future cardiovascular events.

Keywords: CHA₂DS₂-VASc score, aortic stiffness, thromboembolic risk



1. Giriş

Yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir risk faktörü olup Kardiyovasküler organların disfonksiyonu ile takından ilişkilidir. Yaşlanma ile arterlerde 2 önemli değişiklik meydana gelmektedir. Bunlardan ilki endotelial disfonksiyon diğeri ise santral arteriyel sertliktir [1]. Çalışmalar artmış aort sertliği ile hipertansiyon, diabetes mellitus, ateroskleroz, kronik böbrek yetmezliği, bağ hastalıkları, sigara ve yaşlanma arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir[1-5]. Bu faktörlerin birlikteliği damar duvarındaki fonksiyon kaybını artırır ve damar yaşlanmasının daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olur[6]. Ayrıca risk faktörlerindeki artış, damar yaşlanmasının yanı sıra serebrovasküler olaylar ve koroner arter hastalığı gibi komorbid durumların ortaya çıkmasına katkıda bulunur. Kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin önlenmesi için risk faktörlerinin kontrolü özellikle önemlidir. Tedavi hedefleri ışığında değiştirilebilir risk faktörlerinin ortadan kaldırılması veya değiştirilmesi ile bu hastalıkların ilerlemesini durdurmak veya önlemek mümkündür[1].

Aort sertliği (AS), bir arterin basınç değişikliklerine yanıt olarak genişleme ve daralma kapasitesini yansıtır[7]. AS, arter duvarının yapısal ve geometrik özellikleri ile arteriyel duvar ve basınç ile yakından ilişkilidir[2]. Ayrıca vasküler yaşlanmanın önemli bir belirteci olan AS, kardiyovasküler ve serebrovasküler mortalite ve morbiditeyi artırdığı ortaya konmuştur[1]. Aort gerilimi (AG), aort esneyebilirliği (AE), aortik sertlik indeksi (ASI) ve aortik artış indeksi ile AS arasındaki ilişki çok sayıda çalışmada incelenmiştir[8, 9]. Noninvaziv AS parametreleri olarak kullanılan AG ve AE aortun mekanik özelliklerini ve elastikyetini yansıtır. AG, damar çapındaki yüzde değişimi gösterirken, AE damar çapındaki herhangi bir değişiklikte nabız basıncının etkisini gösterir. Noninvaziv olarak hesaplanan ASI ise invaziv arter sertliği ölçümleriyle körele olduğu gösterilmiştir[10]. Ayrıca AG, AE ve ASI ölçümleri ucuz ve kolay ekokardiyografik yöntemlerdir. Ölçümler ek girişimsel işlemlere, özel cihazlara ve eğitilmiş personele ihtiyaç duymadan rutin olarak yapılabilir.

CHA2DS2-VASc risk skoru, her biri için 1 puan verilerek hesaplanan ucuz ve kolay bir skorlama sistemidir; konjestif kalp yetmezliği (ejeksiyon fraksiyonu < %40), hipertansiyon, 65-74 yaş arası, diabetes mellitus, vasküler hastalık (miyokard enfarktüsü veya periferik arter hastalığı) ve kadın cinsiyet, 2 puan; inme veya geçici iskemik atak öyküsü ve > 75 yaş) CHA2DS2-VASc risk skoru, kapak dışı atriyal fibrilasyon hastalarında tromboemboli riskini tahmin etmek için kullanılır[11].

Bu çalışmada, CHA2DS2-VASc risk skoruna göre yüksek riskli hastalarda AS parametrelerinin yakından ilişkili olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

2. Materyal ve Metot

Çalışma Popülasyonu

Bu gözlemsel çalışmaya Mayıs 2017-Ağustos 2017 tarihleri arasında Süleyman Demirel Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve ekokardiyografi laboratuvarımıza kalp hastalığı şüphesiyle başvuran ardışık 272 hasta (116 kadın, 156 erkek, ort. yaş 61.76±11.5 yıl) dahil edildi. Tüm hastaların tıbbi öyküsü, fizik muayenesi, antropometrik ölçümleri, elektrokardiyogramları ve ekokardiyografik değerlendirmeleri yapıldı. Çalışma kurumsal etik kurul tarafından onaylandı (Onay tarih ve sayı: 25.12.2018/72867572.050.01.04-299118) ve tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam alındı. Prosedürler, insan deneylerinden sorumlu kurumsal komitenin etik standartlarına ve 1983'te revize edilen 1975 tarihli Helsinki Bildirgesi'ne uygundu. Hariç tutma kriterleri perikardiyal efüzyon, zayıf ekokardiyografik pencere ve kronik böbrek ve karaciğer hastalığı öyküsü, orta ila şiddetli kalp kapak hastalığı, malignite, sistemik veya pulmoner emboli, kronik hematolojik hastalıklar, akut veya kronik inflamatuvar hastalık, otoimmün hastalık, hiperparatiroidizm, hiperkalsemi, hiperfosfatem ve protez kapak bulunuşu idi. CHA2DS2-VASC skoruna göre hastalar iki gruba ayrıldı; "0 ve 1" skoru düşük risk, "≥2" yüksek risk olarak kabul edildi.

Ekokardiyografi

Sol atriyal (LA) çapını, interventriküler septum (IVS) kalınlığını, sol ventrikül arka duvar (LWPW) kalınlığını, sol ventrikül diyastol sonu çapını (LVEDD), sol ventrikül sistol sonu çapını (LVESD), sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu (EF) ve kapak fonksiyonlarını hesaplamak ve değerlendirmek amacı ile M modu, iki boyutlu ve Doppler ekokardiyografik incelemeler Philips iE 33 xMatrix ile yapıldı. Sol atriyal ve ventriküler boyutlar ve sol ventrikül EF, Amerikan Ekokardiyografi Derneği M-mode tekniği kullanılarak parasternal uzun eksen görünümde M-mode ekokardiyografi ile ölçüldü[12]. Mitral ve aort yetmezliği varlığı Doppler renkli akım haritalaması ile değerlendirildi. Rutin ekokardiyografik inceleme sonrası her hasta sol tarafına hafifçe yaslanacak şekilde yatırıldı. Aort çapı ölçümleri parasternal uzun eksen görüntüde M-modu örnekleme hattı aort kapağının 3 cm yukarısına yerleştirilerek elde edildi. Aort sistol çapı (AoSD) aort kapağı tam açıkken ölçüldü ve aort diyastol çapı (AoDD) elektrokardiyogramda QRS kompleksinin zirvesinde ölçüldü. AG ve AE ve diğer ölçümler, aort çapları ve kan basıncı kullanılarak önceden tanımlanmış formüllere göre aşağıdaki gibi hesaplandı[13].

- 1) Arter çap değişimi (mm) =SD-DD
- 2) Arter gerilimi= (SD-DD)/DD
- 3) Elastik modül (Em) = [Sistol kan basıncı (SBP) - Diyastolik kan basıncı (DBP)]/gerilme
- 4) Arter sertliği indeksi β (ASI) = Ln (SBP/DBP)/gerilme (Ln: doğal logaritma)
- 5) Arteriyel esneyebilirlik = (2xgerilme)/ (SBP-DBP)

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler için SPSS versiyon 16.0 paket programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenler frekans (%) olarak ifade edildi ve χ² testi ile karşılaştırıldı. Sayısal değişkenlerin dağılımını test etmek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı; normal dağılıma sahip olanlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve Student t-testi ile karşılaştırıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler medyan (Çeyrekler arası aralık (IQR) %25-%75 persentil) olarak ifade edildi ve Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Tüm istatistiksel analizlerde p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. CHA2DS2-VASc risk skoru, AS parametreleri ve diğer klinik, laboratuvar ve ekokardiyografik

parametreler arasındaki korelasyonlar, uygun durumlarda Pearson veya Spearman korelasyon analizi ile yapıldı. Hangi faktörlerin yüksek tromboembolik risk ile ilişkili olduğunu belirlemek için ikili lojistik regresyonun tek değişkenli analizi yapıldı. Bu olası karıştırıcı faktörlerin her biri dahil edildikten sonra, yüksek tromboembolik riskin saptanması için olasılık oranını (OR) ve %95 güven aralığını (%95 CI) tahmin etmek için geriye dönük koşullu ikili lojistik regresyon analizi yapıldı. Yüksek tromboembolik riski saptamak için AS parametrelerinin prognostik değerini analiz etmek üzere alıcı çalışma özellikleri (ROC) eğrisi analizi kullanıldı. C-İstatistik (eğrinin altındaki alan), birleşik bir duyarlılık ve özgüllük tahmini olarak sunuldu.

3. Bulgular

Çalışma popülasyonunun temel klinik özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Yaş, kadın cinsiyet, hiperlipidemi, hipertansiyon ve diabetes mellitus, yüksek CHA2DS2-VASC skoru grubunda, düşük CHA2DS2-VASC skoru grubuna göre daha fazla görülmüştür. Çalışma popülasyonunun laboratuvar bulguları Tablo 1'de özetlenmiştir. İki grup arasında açlık glukoz ve kreatinin düzeyleri dışında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$). Çalışma popülasyonunun ekokardiyografik bulguları Tablo 1'de özetlenmiştir. İVS kalınlığı yüksek riskli hastalarda düşük riskli deneklere göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $1,1\pm 0,1$ ve $1,0\pm 0,08$ mm; $P<0,001$). LVEDD, yüksek riskli hastalarda düşük riskli kişilere göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $48,7\pm 0,4$ ve $44,6\pm 0,3$ mm; $P<0,001$). LVESD, yüksek riskli hastalarda düşük riskli deneklere göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $26,7\pm 0,2$ ve $25,1\pm 0,2$ mm; $P<0,001$). AE, yüksek riskli hastalarda düşük riskli kişilere göre anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $2,8\pm 0,1$ 'e karşı $2,7\pm 0,2$ mm; $P<0,001$). AG ve AE, düşük riskli deneklere göre yüksek riskli hastalarda anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla $8,9\pm 3,2$ 'ye karşı $14,1\pm 3,9$; sırasıyla $P<0,001$ ve $3,4\pm 2,3$ 'e karşı $6,9\pm 3,2$; $P<0,001$). ASI ve Em, yüksek riskli hastalarda düşük riskli kişilere göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $6,5\pm 2,9$ 'a karşı $3,5\pm 1,4$; sırasıyla $P<0,001$ ve $766,6\pm 374,5$ 'e karşı $348,4\pm 175,9$; $P<0,001$).

Tablo 1. Çalışma popülasyonunun temel klinik özellikleri

Değişkenler	Düşük CHADS-VASC skoru (n=119)	Yüksek CHADS-VASC skoru (n=153)	P değeri
Yaş, yıl	54,1± 8	69,0± 10	<0,001
Kadın cinsiyet, n (%)	14 (11,8)	102 (66,7)	<0,001
Hipertansiyon, n (%)	22 (18,5)	115 (75,2)	<0,001
Diabetes mellitus, n (%)	13 (10,9)	80 (52,3)	<0,001
Hiperlipidemi, n (%)	20 (16,8)	53 (34,6)	0,001
Sigara, n (%)	75 (63,0)	41 (26,8)	<0,001
Obezite, n (%)	13 (10,9)	33 (21,6)	0,014
KAH, n (%)	24 (20,2)	73 (47,7)	<0,001
İnme /TIA, n (%)	-	11 (6)	0,069
VKİ (kg/m ²)	29± 3,5	30±7,0	0,209
SKB (mmHg)	120,7± 14,0	145,9±18,0	<0,001
DKB (mmHg)	76,9± 7,2	87,9±10,5	<0,001
Kalp hızı (atım/dk)	43,7± 9,0	57,9± 11,9	<0,001
Hemoglobin, g/L	12,9±0,8	12,1± 0,6	0,481
Trombosit sayısı (x 10 ³ /µL)	309±24	320± 34	0,640
Glukoz, mg/dL	98,4±32,5	168,01±88,3	<0,001
Kreatinin (mg/dl)	0,9±0,1	1,1±0,2	<0,001
HDL-kolesterol, mg/dL	41,6±7,1	42,1±5,1	0,542
LDL-kolesterol, mg/dL	132,8±92,4	132,46±19,0	0,961
SVEF, %	48,06±7,9	38,6±11,3	<0,001
SA (mm)	39,0±3,1	42,4±2,7	0,474
İVS (mm)	1,0± 0,08	1,1± 0,1	<0,001
SVPDÇ (mm)	0,8± 0,06	0,9± 0,09	<0,001

SVSSÇ (mm)	25,1±0,2	26,7± 0,2	<0,001
SVDSÇ (mm)	44,6± 0,3	48,7± 0,4	<0,001
Aortik sistolik çap (mm)	3,3± 2,5	3,0±0,1	0,240
Aortik diyastolik çap (mm)	2,7 ± 0,2	2,8±0,1	<0,001
Aortik gerilim	14,1±3,9	8,9±3,2	<0,001
Aortik esneyebilirlik	6,9±3,2	3,4±2,3	<0,001
Aortik Sertlik indeksi	3,5±1,4	6,5±2,9	<0,001
Elastik Modulus	348,4±175,9	766,6±374,5	<0,001

KAH: Koroner arter hastalığı, TİA: Trans iskemik atak, VKİ: Vücut kitle indeksi, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diyastolik kan basıncı, HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein, LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, SVEF: Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, SA: Sol atriyum, İVS: İnterventriküler septum, SVPDÇ: Sol ventrikül posterior duvar çapı, SVSSÇ: Sol ventrikül sistol sonu çapı, SVDSÇ: Sol ventrikül diyastol sonu çapı.

AS parametreleri ve CHA2DS2-VASC skoru ile diğer klinik ve ekokardiyografik parametreler arasındaki korelasyon analizi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Aortik sertlik parametreleri ile çalışma değişkenleri arasındaki korelasyon

	Aortik distensibilite	Aortik strain indeksi	Elastik modulus	Yüksek CHA2DS2-VASC skoru	Diyastolik kan basıncı	Sistolik kan basıncı	Kalp hızı	SA çapı	İVS	PD	DM	HT	HL	Glukoz	SV ejeksiyon fraksiyonu	Yaş	Cinsiyet
Aortik gerilim	r= 0,964	r= - 0,943	r= - 0,963	r= - 0,588	r= - 0,616	r= - 0,789	r= - 0,821	r= - 0,512	r= - 0,606	r= - 0,389	r= - 0,329	r= - 0,709	r= - 0,389	r= - 0,387	r= 0,283	r= - 0,384	r= - 0,167
Aortik esneyebilirlik		r= - 0,968	r= - 0,998	r= - 0,594	r= - 0,638	r= - 0,867	r= - 0,932	r= - 0,521	r= - 0,607	r= - 0,403	r= - 0,310	r= - 0,731	r= - 0,414	r= - 0,371	r= 0,283	r= - 0,391	r= - 0,150
Aortik sertlik indeksi			r= 0,966	r= 0,543	r= 0,484	r= 0,756	r= 0,892	r= 0,524	r= 0,541	r= 0,385	r= 0,294	r= 0,669	r= 0,402	r= 0,352	r= - 0,248	r= 0,385	r= 0,117
Elastik modulus				r= 0,598	r= 0,644	r= 0,872	r= 0,935	r= 0,530	r= 0,613	r= 0,397	r= 0,306	r= 0,737	r= 0,407	r= 0,369	r= - 0,282	r= 0,398	r= 0,150
Yüksek CHA2DS2-VASC grubu					r= 0,557	r= 0,597	r= 0,547	r= 0,396	r= 0,525	r= 0,251	r= 0,433	r= 0,562	r= 0,200	r= 0,413	r= - 0,435	r= 0,576	r= 0,551

*P<0.001 tüm parametreler için SA: Sol atriyum çapı, İVS: İnterventriküler septum, PD: posteriyör duvar, DM: Diabetes Mellitus, HT: Hipertansiyon, SV: Sol ventrikül

ROC analizine göre 3,75 AE değeri, % 71 duyarlılık ve % 89 özgüllük ile CHA2DS2-VASC skorunun yüksek riskini öngördü (C-istatistik=0,846, p<0.001, %95 CI=0,79-0,88). 531 Em değeri, %71 duyarlılık ve %89 özgüllük ile CHA2DS2-VASC skorunun yüksek riskini öngördü (C-istatistik= 0,848, p<0,001, %95 CI= 0,80-0,88). 4,84 ASİ değeri %67 duyarlılık ve %87 özgüllük ile CHA2DS2-VASC skorunun riski yüksek risk öngördü (C-istatistik= 0,816, p<0.001, %95 CI=0,79-0,88). 10,7 AG değeri %79 duyarlılık ve %79 özgüllük CHA2DS2-VASC skorunun yüksek riskini öngördü. (C-istatistik=0,842, p<0,001, %95 GA=0,79-0,88) (Tablo 3 ve Tablo 4).

Tablo3. Aortik sertlik parametrelerinin tek değişkenli ve çok değişkenli analizinde CHADS-VASC risk sınıflandırmasının prediktörleri

	OR	(95 % CI)	P değeri	OR	(95 % CI)	P değeri
Aortik gerilim (%)	0,706	0,64-0,77	<0,001			
Aortik esneyebilirlik	0,630	0,55-0,71	<0,001			
Aortik sertlik indeksi	1,901	1,6-2,23	0,045			
Aortik elastik modulus	1,006	1,004-1,007	<0,001	1,009	1,005-1,013	<0,001

Tablo 4. Aort sertlik parametrelerinin ROC (Receiver operating characteristics) eğrisi analizi

	C-istatistik	95 % güven aralığı	P değeri	Kestirme değeri	Sensitivite	Spesifite
Aortik esneyebilirlik	0,846	0,79-0,88	<0,001	<3,75	71	89
Elastik Modulus	0,848	0,800-0,888	<0,001	>531	71	89
Aortik sertlik indeksi	0,816	0,765-0,860	<0,001	>4,84	67	87
Aortik gerilim	0,842	0,793-0,883	<0,001	≤10,7	79	79

4. Tartışma ve Sonuç

Mevcut çalışma AG, AE, ASI, E (p) gibi AS parametrelerinin CHA2DS2-VASc skoruna göre yüksek tromboembolizm riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Valvüler olmayan atriyal fibrilasyonu olan hastalarda tromboemboli riskini belirlemede CHA2DS2-VASC skoru önerilmekle birlikte, bu skorun çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir[14-21]. Bozbay ve ark. [14] CHA2DS2-VASC skorunun hastanede bir ay yatış ve uzun dönem mortalite ve morbidite için güçlü bir belirleyici faktör olduğunu göstermiştir. Ek olarak, yaptığımız çalışmalarda yüksek CHA2DS2-VASC skorunun epikardiyal yağ kalınlığı ve mitral anüler kalsifikasyon ile ilişkili olduğunu gösterdik[22-24]. Ayrıca, atriyal fibrilasyon ve kontrast kaynaklı nefropati gibi hastane içi morbidite ile CHA2DS2-VASC skoru arasında bir ilişki olduğunu gösterdik [15, 16].

AS, aortun sertliğini gösterir ve esas olarak hücre dışı matris, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve damar duvarının diğer fonksiyonel elemanları dahil olmak üzere arter duvarı bileşenleri ile ilişkilidir. CHA2DS2-VASC skorunun bileşenleri olan ve bu bileşenleri etkileyen kardiyovasküler risk faktörleri, kardiyovasküler hastalık (KVH) gelişmeden önce arteriyel sertliğin artmasına yol açan yapısal değişiklikleri indükler. Arter sertliği, aort duvarındaki en erken değişikliktir. Bozulmuş AS, endotel disfonksiyonu ve aterosklerozun ilerlemesi yoluyla kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir[25]. Bu nedenle, AS' de düzleme olan ve CHA2DS2-VASC skoru yüksek olan bireyler, olumsuz kardiyovasküler risk faktörlerini ve gelecekteki kardiyovasküler olayların gelişimini azaltmak için daha fazla dikkat edilmelidir. Ek olarak, AoStiff değerlendirmesi, yüksek riskli gruplarda klinik olarak belirgin hastalık ortaya çıkmadan önce KVH'yi öngörmek için yararlıdır, ayrıca AS, yerleşik hastalığı olan hastalarda olumsuz klinik sonuçları saptamak için yararlı parametrelerdir[26].

CHA2DS2-VASC skorunun bir bileşeni olan yaş ile AS arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Belirgin KVH olmasa bile ileri yaşın aort esnekliğindeki azalmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir[7]. Hipertansiyon ve metabolik sendrom prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. İleri yaş ve hipertansiyon, bozulmuş AS ile ilişkili en yaygın faktörlerdir[7]. Bu faktörler bozulmuş AS'ye katkıda bulunur[26]. Mevcut çalışmada, yaşın AD ve AE ile ters, Em ve ASI ile korele olduğunu gösterdik. Kardiyovasküler sağlık çalışmasının alt grup analizinde de benzer sonuçlar gösterilmiştir[27]. Arter sertliği, hipertansiyon ve buna bağlı inme ve miyokard enfarktüsü gibi KVH' lerin birbiriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada AS ile CHA2DS2-VASC skorunun bir bileşeni olan hipertansiyon arasında yaşa göre daha güçlü bir ilişki

saptanmıştır. Hipertansiyon, arter duvarında yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açan arteriyel duvar stresini kötüleştirir[28]. Diabetes mellitus, hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği endotel disfonksiyonu ile ilişkilidir[29]. Çalışmamızda bu faktörler ile endotel disfonksiyonunun öngörücüsü olan AS arasında bir ilişki saptadık. Ek olarak, Chan ve ark. [30], CHA2DS2-VASC skorunun vasküler disfonksiyonu ve yeni başlayan iskemik inmeyi öngördüğünü belirlemiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde CHA2DS2-VASC skoru vasküler disfonksiyonun parametreleri olan AS parametreleri ile korele idi.

Bu çalışmada AS parametrelerinin CHA2DS2-VASC skorları ile ilişkili olduğunu gösterdik. Plak rüptürü, ülserasyon ve vasküler hemodinamik değişikliklere bağlı istenmeyen kardiyovasküler olayları azaltmak için CHA2DS2-VASC skoru yüksek olan hastalara risk faktörü modifikasyonu önerilmelidir.

Sonuç olarak bulgularımız, AS parametreleri ölçümünün tromboembolik olaylar gibi kardiyovasküler riskin değerlendirilmesinde ek bilgi sağlayabileceğini ve aortik sertlikte bozulma olan bireylerin, olumsuz kardiyovasküler risk faktörlerini ve gelecekteki kardiyovasküler olayların gelişimini azaltmak için daha fazla dikkat etmesi gerektiğini göstermektedir.

Etik Beyanı

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

Etik kurul onay tarihi ve sayısı: 25.12.2018/72867572.050.01.04-299118)

Kaynakça

- [1] G.F. Mitchell, S.-J. Hwang, R.S. Vasan, M.G. Larson, M.J. Pencina, N.M. Hamburg, J.A. Vita, D. Levy, E.J. Benjamin, Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study, *Circulation* 121(4) (2010) 505.
- [2] M. Cecelja, P. Chowienzyk, Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review, *Hypertension* 54(6) (2009) 1328-1336.
- [3] A.A. Haydar, A. Covic, H. Colhoun, M. Rubens, D.J. Goldsmith, Coronary artery calcification and aortic pulse wave velocity in chronic kidney disease patients, *Kidney international* 65(5) (2004) 1790-1794.
- [4] E.E. Gunturk, T. Ekiz, H. Akkaya, Evaluation of carotid-femoral pulse wave velocity, aortic stiffness index, and aortic distensibility in patients with fibromyalgia, *Clinical rheumatology* (2019) 1-5.
- [5] G. Cioffi, O. Viapiana, F. Ognibeni, A. Dalbeni, G. Orsolini, S. Adami, D. Gatti, M. Fiscaro, L. Tarantini, M. Rossini, Clinical profile and outcome of patients with rheumatoid arthritis and abnormally high aortic stiffness, *European journal of preventive cardiology* 23(17) (2016) 1848-1859.
- [6] M. AlGhatrif, E.G. Lakatta, The conundrum of arterial stiffness, elevated blood pressure, and aging, *Current hypertension reports* 17(2) (2015) 12.
- [7] M. Cecelja, P. Chowienzyk, Role of arterial stiffness in cardiovascular disease, *JRSM cardiovascular disease* 1(4) (2012) 1-10.
- [8] A. Yıldız, M. Gur, R. Yılmaz, R. Demirbag, The association of elasticity indexes of ascending aorta and the presence and the severity of coronary artery disease, *Coronary artery disease* 19(5) (2008) 311-317.
- [9] Q. Lu, H. Liu, Correlation of ascending aorta elasticity and the severity of coronary artery stenosis in hypertensive patients with coronary heart disease assessed by M-mode and tissue doppler echocardiography, *Cell biochemistry and biophysics* 71(2) (2015) 785-788.
- [10] H. Arı, F. Kahraman, Y. Türker, S. Güler, H.A. Baş, D. Erdoğan, Aortic propagation velocity does not correlate with classical aortic stiffness parameters in healthy individuals, *Anatolian Journal of Cardiology* 18(5) (2017) 340.
- [11] C.T. January, L.S. Wann, J.S. Alpert, H. Calkins, J.E. Cigarroa, J.C. Cleveland, Jr., J.B. Conti, P.T. Ellinor, M.D. Ezekowitz, M.E. Field, K.T. Murray, R.L. Sacco, W.G. Stevenson, P.J. Tchou, C.M. Tracy, C.W. Yancy, A.A.T.F. Members, 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial

fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society, *Circulation* 130(23) (2014) e199-267.

- [12] D.J. Sahn, A. DeMaria, J. Kisslo, A. Weyman, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements, *Circulation* 58(6) (1978) 1072-1083.
- [13] A. Nemes, M.L. Geleijnse, T. Forster, O.I. Soliman, F.J. Ten Cate, M. Csanády, Echocardiographic evaluation and clinical implications of aortic stiffness and coronary flow reserve and their relation, *Clinical Cardiology: An International Indexed and Peer-Reviewed Journal for Advances in the Treatment of Cardiovascular Disease* 31(7) (2008) 304-309.
- [14] M. Bozbay, H. Uyarel, G. Cicek, A. Oz, M. Keskin, A. Murat, E. Yildirim, G. Karaca, M. Ergelen, M. Eren, CHA2DS2-VASc score predicts in-hospital and long-term clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction who were undergoing primary percutaneous coronary intervention, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 23(2) (2017) 132-138.
- [15] F. Aksoy, H.A. Bas, A. Bagci, T. Oskay, The CHA2DS2-VASc score for predicting atrial fibrillation in patients presenting with ST elevation myocardial infarction: prospective observational study, *Sao Paulo Med J* 137(3) (2019) 248-254.
- [16] F. Aksoy, A. Bagci, Predictive value of ATRIA risk score for contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction, *Rev Assoc Med Bras* (1992) 65(11) (2019) 1384-1390.
- [17] G. Ceyhun, The relationship of the serum endocan level with the CHA 2 DS 2-VASc score in patients with paroxysmal atrial fibrillation, *The Egyptian Heart Journal* 73(1) (2021) 1-6.
- [18] F. Aksoy, D. Uysal, A Simple Risk Scoring Systems to evaluate the presence of aneurysm and one-year mortality in patients with abdominal aortic aneurysm using CHA2DS2-VASc and ATRIA, *Revista da Associação Médica Brasileira* 67 (2021) 101-106.
- [19] F. Aksoy, İ.B. İŞİK, H.A. BAŞ, A. BAĞCI, F. Kahraman, Y.E. Okudan, M.S. Kuyumcu, A. ALTINBAŞ, Usefulness of the cha2ds2-vasc score to predict "st segment resolution failure" in patients treated with primary percutaneous coronary intervention for st-segment elevation myocardial infarction, *Dicle Tıp Dergisi* 46(4) (2019) 847-855.
- [20] D. Uysal, F. Aksoy, E. Ibrişim, The Validation of the ATRIA and CHA 2 DS 2-Vasc Scores in Predicting Atrial Fibrillation after Coronary Artery Bypass Surgery, *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 35 (2020) 619-625.
- [21] F. Aksoy, A. Bagci, Predictive value of ATRIA risk score for contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction, *Revista da Associação Médica Brasileira* 65 (2019) 1384-1390.
- [22] F. Aksoy, S. Guler, F. Kahraman, T. Oskay, E. Varol, The relation between echocardiographic epicardial fat thickness and CHA2DS2-VASc score in patients with sinus rhythm, *Brazilian journal of cardiovascular surgery* 34(1) (2019) 41-47.
- [23] F. Aksoy, S. Guler, F. Kahraman, M.S. Kuyumcu, A. Bagci, H.A. Bas, D. Uysal, E. Varol, The Relationship Between Mitral Annular Calcification, Metabolic Syndrome and Thromboembolic Risk, *Braz J Cardiovasc Surg* 34(5) (2019) 535-541.
- [24] A. BAĞCI, F. AKSOY, Akut Koroner Sendromu Olan Bireylerde CHA2DS2-VASc ve ATRIA Skorlarının Değerlendirilmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 10(4) 377-380.
- [25] Ö. Şatiroğlu, M. Bostan, N. Bayar, Y. Çiçek, M. Cetin, E. Bozkurt, Relation between aortic stiffness and extension of coronary artery disease, *Turkish Journal of Medical Sciences* 42(3) (2012) 417-424.
- [26] M.E. Safar, F. Thomas, J. Blacher, R. Nzietchueng, J.-M. Bureau, B. Pannier, A. Benetos, Metabolic syndrome and age-related progression of aortic stiffness, *Journal of the American College of Cardiology* 47(1) (2006) 72-75.
- [27] R.H. Mackey, K. Sutton-Tyrrell, P.V. Vaitkevicius, P.A. Sakkinen, M.F. Lyles, H.A. Spurgeon, E.G. Lakatta, L.H. Kuller, Correlates of aortic stiffness in elderly individuals: a subgroup of the Cardiovascular Health Study, *American journal of hypertension* 15(1) (2002) 16-23.

- [28] S.J. Ziemán, V. Melenovsky, D.A. Kass, Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(5) (2005) 932-943.
- [29] J. Gong, Q. Xie, Y. Han, B. Chen, L. Li, G. Zhou, T. Wang, L. Xie, Relationship between components of metabolic syndrome and arterial stiffness in Chinese hypertensives, *Clinical and Experimental Hypertension* (2019) 1-7.
- [30] Y.-H. Chan, K.-H. Yiu, K.-K. Lau, Y.-F. Yiu, S.-W. Li, T.-H. Lam, C.-P. Lau, C.-W. Siu, H.-F. Tse, The CHADS₂ and CHA₂DS₂-VASc scores predict adverse vascular function, ischemic stroke and cardiovascular death in high-risk patients without atrial fibrillation: role of incorporating PR prolongation, *Atherosclerosis* 237(2) (2014) 504-513.

Evaluation of DNA Damage in Lymphocytes in Percutaneous Thoracic Mass Biopsies Performed with Computed Tomography

Bilgisayarlı Tomografi İle Yapılan Perkütan Torasik Kitle Biyopsilerinde Lenfositlerdeki DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Veysel Atilla AYYILDIZ¹ , Rahime ASLANKOÇ^{2*} , Mustafa SAYGIN² , Demet GÜNDÜZ¹ 

¹ Suleyman Demirel University, Faculty of Medicine Hospital, Department of Radiology, Isparta, Turkey

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

ABSTRACT

Purpose: The increase in the medical and industrial uses of radiation in the last century has caused people to be exposed to higher doses of radiation. Although the harms of high-dose radiation on human health are known, the effects of low-dose radiation on health have not yet been fully elucidated. In this study, we aimed to investigate DNA damage in lymphocytes in patients with lung, pleura/thoracic wall masses planned for percutaneous thoracic mass biopsy with computed tomography (CT).

Methods: Sixteen patients referred to the Radiology Clinic of a public institution hospital with lung, pleura/thoracic wall masses and scheduled to undergo a CT-guided percutaneous biopsy were included in the study. All the biopsies were performed with a 128-slice CT device (Definition AS, Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany). Lymphocytes were analyzed using the comet assay in the venous blood samples taken from the patients before and after the biopsy procedure. DNA damage was quantitatively evaluated with the imaging analysis method.

Results: In the CT analysis data of the study group, the mean scan distance was found to be 19.92±3.60 sec, the mean total milliamperere-seconds was 807.43±304.51, and the mean dose-length product was 765.44±278.36 mGy.cm. The mean comet score was 200.50±40.54 for the cells that migrated before the procedure and 237.37±27.85 for those migrating after the procedure. The post-procedure comet scores significantly increased compared to the pre-procedure comet scores (p=0.038).

Conclusion: Post-procedure DNA damage was detected in patients who underwent CT-guided percutaneous biopsy.

Keywords: Computed tomography, Comet assay, DNA damage, Ionizing radiation

Alınış / Received: 25.04.2023 Kabul / Accepted: 01.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Amaç: Son yüzyılda radyasyonun tıbbi ve endüstriyel kullanımlarındaki artış, insanların daha yüksek dozlarda radyasyona maruz kalmasına neden olmuştur. Yüksek doz radyasyonun insan sağlığına zararları bilinmesine rağmen düşük doz radyasyonun sağlık üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, bilgisayarlı tomografi (BT) ile perkütan torasik kitle biyopsisi planlanan akciğer, plevra/torasik duvar kitleleri olan hastalarda lenfositlerdeki DNA hasarını araştırmayı amaçladık.

Materyal Metod: Bir kamu kurumu hastanesinin Radyoloji Kliniğine akciğer, plevra/torasik duvar kitleleri ile başvuran ve BT eşliğinde perkütan biyopsi planlanan 16 hasta çalışmaya dahil edildi. Tüm biyopsiler 128 kesitli CT cihazı (Definition AS, Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany) ile yapıldı. Hastalardan biyopsi öncesi ve sonrası alınan venöz kan örneklerinde comet assay ile lenfosit analizi yapıldı. DNA hasarı, görüntüleme analiz yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışma grubunun BT analiz verileri değerlendirildiğinde; ortalama tarama mesafesi $19,92 \pm 3,60$ sn, ortalama toplam miliamper-saniye $807,43 \pm 304,51$ ve ortalama doz-uzunluk çarpımı $765,44 \pm 278,36$ mGy.cm olarak bulundu. İşlem öncesi göç yapan hücrelerde ortalama comet skoru $200,50 \pm 40,54$ ve işlem sonrası göç yapan hücrelerde $237,37 \pm 27,85$ olarak tespit edildi. İşlem sonrası comet skorları, işlem öncesi comet skorlarına göre anlamlı olarak arttı ($p=0,038$).

Sonuç: BT eşliğinde perkütan biyopsi yapılan hastalarda işlem sonrası DNA hasarı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Bilgisayarlı tomografi, Comet assay, DNA hasarı, İyonlaştırıcı radyasyon



1. Introduction

Ionizing radiation is a type of radiation that carries enough energy to ionize atoms or molecules as it passes through matter. Life on Earth is always exposed to ionizing radiation from natural sources, such as radon gas. However, the increase in the medical, military and industrial uses of radiation in the last century has resulted in people being exposed to higher doses of radiation. Although the harm of high-dose radiation to human health is known, the effects of low-dose radiation on health have not yet been entirely elucidated [1,2].

In recent years, developments in the computed tomography (CT) technology in the field of health and the use of multi-slice CT have allowed for the thin-section examination to be performed in a single breath-holding process [3,4]. The lower the theoretically known kilovolt (kV) values, the lower the radiation dose received [5]. Accordingly, it is necessary to minimize the radiation dose received by the patient as much as possible by applying the smallest kV value that will not affect the radiological diagnosis.

DNA is constantly exposed to physical agents, such as ultraviolet light, ionizing radiation, and thermal degradation; biological or reactive oxygen species, such as viruses and toxins; and chemical agents, such as hydrolysis and alkylators [6]. DNA damage mostly occurs in the primary structure of the double helix, and this alteration is called the base sequence. This altered sequence can disrupt the ordered helical structure of molecules by introducing chemical bonds and bulky adducts that do not fit into the standard double helix. These resulting structures can cause the single- or double-stranded DNA strand

to be broken and chromosomes to be rearranged [7]. This DNA damage in various pathological and physiological conditions can be detected using the comet assay method [8].

Comet assay is considered to be a fast, sensitive and fairly simple method for detecting DNA damage at the level of individual cells. In the detection of DNA single-strand breaks, alkaline labile regions, and cross-links, the comet assay combines the simplicity of biochemical techniques with a unique single cell approach to cytogenetic analysis [9]. This method was introduced by Ostlin and Johanson [10] and further developed by Singh et al. [11]. In brief, the comet assay depends on the principle of negatively charged DNA fragments moving toward a positive charge in an agarose gel in response to an electric field. DNA helices that open after contact with alkali or endonucleases increase DNA migration. DNA is visualized by fluorescence microscopy after staining with a DNA-binding dye [12]. Migrating DNA helices appear like 'comets'. The size and shape of the comet and the distribution of DNA within the comet are associated with the extent of DNA damage [13].

Until recently, the comet assay was mainly used as a testing method in academic and scientific studies. However, currently, the comet assay is perceived as a potentially emerging tool for genotoxicity testing and regulatory applications [9]. Today, clinicians request a CT-guided percutaneous thoracic mass biopsy in patients presenting to the emergency department or followed up in an inpatient clinic for other reasons, who have complaints of chest pain and shortness of breath and who are considered to be eligible for this biopsy procedure after the detection of a thoracic mass on CT. Due to the high demand, patients are exposed to further radiation in the biopsy procedure in addition to diagnostic purposes. Therefore, in our study, we aimed to investigate the effects of radiation dose exposed during the biopsy procedure on lymphocyte DNA in patients who underwent a percutaneous thoracic mass biopsy under the guidance of non-contrast-enhanced CT.

2. Material and Method

Study Group

After receiving approval from the Clinical Research Ethics Committee of Suleyman Demirel University Faculty of Medicine (date: 07.10.2020, decision number: 304), the study included a total of 16 patients who underwent a percutaneous thoracic mass biopsy under CT guidance at Suleyman Demirel University between February 2020 and August 2021. Before the procedure, the age and disease status of the patients were questioned. Patients with low saturation, unstoppable cough, or bleeding diathesis and those that could not be properly positioned for the procedure were excluded from the study. Before the examination, all the patients were informed to increase the quality and safety of the procedure.

Venous blood samples were taken for the comet assay before and after the procedure in all patients included in the study. For the comet assay, 500 µl of heparinized blood + 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) + 400 µl of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium were prepared in cryotubes and stored at -80 °C until analysis [14].

Imaging Protocol

After the evaluation of the pre-procedure non-contrast and/or contrast-enhanced thorax CT scans of patients with lung, pleura/thoracic wall masses, the patients were placed in the supine, prone or lateral decubitus position in a way that would minimize complications, such as bleeding and pneumothorax during the CT-guided percutaneous thoracic mass biopsy. All the biopsies were performed with a 128-slice CT device (Definition AS, Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany). A preliminary image was taken with a small field of view on the topogram (guide image) obtained for the preliminary evaluation, and the plane to be biopsied was marked on each patient with a marking pen. Then, the patient's chest was cleaned according to the rules of asepsis, and the working area was covered in a sterile manner. As a short-acting local anesthetic, 10 cc of lidocaine was used in each patient. Subsequently, a 17-G coaxial needle (Geotek, Ankara, Turkey) was advanced toward the mass, and control images were obtained without crossing the pleura. After ensuring the accuracy of the plane, the distance between the needle tip and the lesion was measured on the image, and the pleura was passed in a single attempt. After confirming the presence of a mass in the control image, the chuck of the coaxial needle was removed, and an 18-G semi-automatic biopsy needle (Geotek, Ankara, Turkey) was advanced. A 2 cm-long tissue piece was taken three times by angling the needle tip cranially or caudally and placed in formaldehyde for the pathological examination. The semi-automatic needle was removed,

aspiration was performed with a 20-cc injector, and the coaxial needle was withdrawn. The control image was taken and the procedure was terminated. The stages of the percutaneous thoracic needle biopsy performed in the supine position are shown in Figure 1.

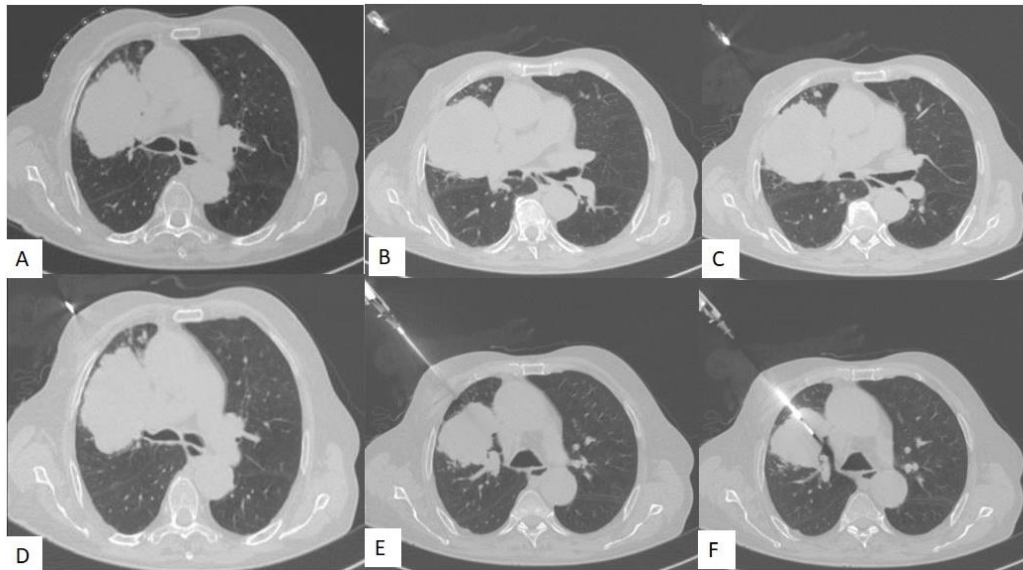


Figure 1: Stages of the computed tomography-guided percutaneous thoracic needle biopsy performed in a 90-year-old male patient in the supine position, showing a peripherally located lobulated contoured mass lesion (order: left to right, top to bottom)

Radiation Dose Calculation During Biopsy

In this study, the effective radiation dose was calculated using a method recommended by the European Working Group as part of the CT quality criteria guide. Accordingly, the effective dose was derived from the product of the dose-length product (DLP, mGy.cm) and a conversion factor (for the examined anatomical region (i.e., chest) ($k=0.017 \text{ mSv.mGy}^{-1}\text{.cm}^{-1}$), which is indicator of the dose received by the patient throughout the procedure [15]. DLP values used for the calculation of the effective dose were obtained from the protocol automatically provided by the device for each CT section taken. DLP and effective dose values determined in each CT section obtained separately during the biopsy procedure until the needle was advanced and entered into the mass and those obtained throughout the entire procedure were calculated separately for each patient.

Comet Assay

Lymphocyte DNA damage was analyzed using the comet assay method in the blood samples taken before and after the biopsy procedure. First, the blood samples kept at -80°C were allowed to dissolve in a water bath at 37°C . Then, $20 \mu\text{l}$ of whole blood sample was mixed with $150 \mu\text{l}$ of low melting agarose at 37°C , and $140 \mu\text{l}$ of this mixture was placed on a slide pre-coated with normal melting agarose. The slides were kept at 4°C for 5 minutes, and then placed in the lysis solution and kept in the solution for 1 hour. After lysis, the slides were placed in a tank with a cold alkaline electrophoresis buffer (1 mmol/L EDTA and 300 mM NaOH, $\text{pH} > 13$) and left for 30 minutes to open up the DNA helix. Next, electrophoresis (25 minutes at 25V, 300 mA) was performed. Following electrophoresis, the slides were placed in a neutralization buffer with 0.4 M Tris and $\text{pH} 7.4$ and incubated for 5 minutes. After being removed from the neutralization buffer, the slides were kept at room temperature for 1 hour, and 100 cells were randomly analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BX-50, Japan) by adding ethidium bromide. During this evaluation, the cells were classified into five categories from 0 to 4, undamaged (no DNA migration) to severely damaged (DNA migrated) [12]. Scoring was undertaken in accordance with the images obtained (Figure 2).

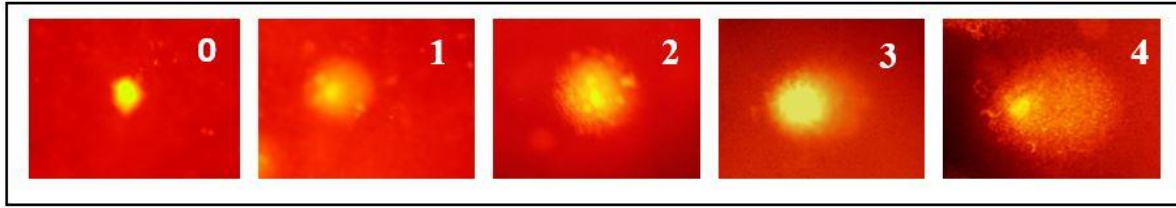


Figure 2: Comet scoring images derived from the study findings. The cells were classified into five categories from 0 to 4, undamaged (no DNA migration) to severely damaged (DNA migrated). 0: cells with no damage, 1: Less damaged cell, 2: moderately damaged cell, 3: very damaged cell, 4: severely damaged cell

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS v. 21.0 for Windows software package w. The precondition for the normal distribution of data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. One-way analysis of variance was applied to homogeneous data. The Pearson correlation test was used to determine the relationship between the comet score and the scan distance, milliampere-seconds (mAS) and DLP after the procedure. In the evaluation of the results, the upper limit of error margin was accepted as 0.05.

3. Results

Gender (%), mean age, scan distance, mean total mAS and DLP amount are shown in Table 1. In addition, only the intra-group comet score (min-max) before and after biopsy is presented in Table 1. Sixty-five percent of the sample were male and 35% were female, with the mean age being 67.25 ± 8.99 years, mean scan distance 19.92 ± 3.60 sec, mean total mAS 807.43 ± 304.51 , and mean DLP 765.44 ± 278.36 mGy.cm.

Lymphocyte DNA damage in blood samples taken from the patients before and after the procedure was analyzed using the comet assay method. Comet scoring was performed according to the image obtained from the study and presented in Figure 2, and the results of statistical analyses are shown in Table 2. Damage was assessed visually, taking into account the frequency of migrating cells and the average tail length. The mean comet score was determined as 200.50 ± 40.54 for the cells that migrated before the procedure and 237.37 ± 27.85 for those that migrated after the procedure. The comet scores obtained before and after the procedure were evaluated with the paired-samples t-test, and the difference was found to be statistically significant ($p=0.038$). DNA damage was detected in all patients before and after the procedure, but the degree of damage was found to be significantly higher after the procedure. In the statistical analysis of the radiation dose received by the patients and the comet scores, no significant correlation was found between the DLP dose and the comet scores. We observed that the radiation dose received during the procedure increased DNA damage. Figure 3 presents the images of DNA damage before and after the procedure.

The Pearson correlation test was used to analyze the correlation between the post-procedure comet score and the scan distance, total mAS and DLP values. According to the results, there was no statistically significant correlation.

Table 1: Statistical analysis of the variables of the study group

Sociodemographic characteristic	n (%)	Mean ± SD	Median (min-max)
Gender			
Male	13 (65%)		
Female	3 (35%)		
Age		67.25 ± 8.99	
Scan time (sn)		19.92 ± 3.60	
mAS		807.43 ± 304.51	
DLP (mGy.cm)		765.44 ± 278.36	
Pre-procedure comet score (intra-group)			201 (115-264)
Post-procedure comet score (intra-group)			228 (191-286)

Table 2: Pre- and post-procedure comet scores

Evaluation time	Comet score (arbitrary unit)	
	Mean ± SD	P value
Pre-procedure	200.50±40.54	
Post-procedure	237.37±27.85*	0.038

SD: standard deviation. Values given in mean ± SD. The paired-samples t-test was used in the comparison of the two groups.

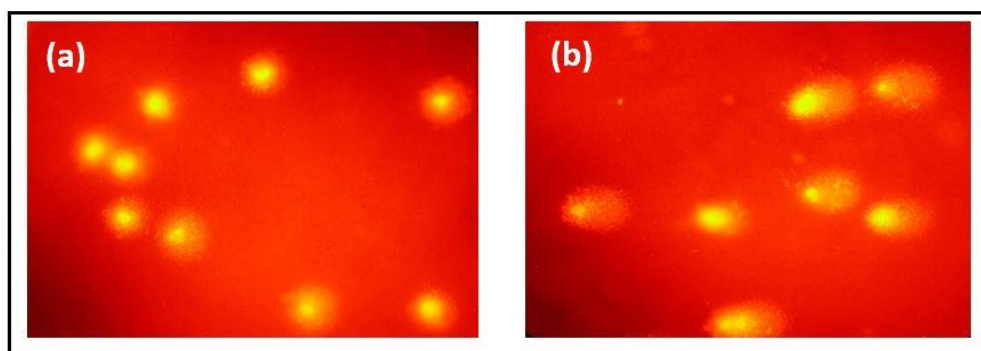


Figure 3: (a) Comet image before the procedure (lymphocyte DNA damage), (b) Comet image after the procedure (lymphocyte DNA damage)

4. Discussion and Conclusion

It is well known that ionizing radiation can directly cause oxidative stress by accumulating energy in cells or increase the formation of free radicals, and oxidative stress can indirectly induce DNA damage [16]. Experimental studies on cellular and molecular radiation biology have shown DNA to be a possible candidate for radiation [17,18]. Physiological and chemical interactions between ionizing radiation and DNA cause damage to nucleotide bases, DNA-DNA and DNA-protein cross-links, and alkali unstable regions, as well as DNA lesions, such as single- or double-strand breaks [19]. Misrepaired double-strand breaks are considered to be the main cause of both chromosomal lesions and gene mutations [20,21].

It is widely accepted that lesions in DNA caused by ionizing radiation can be detected using the comet assay [22].

In a study investigating occupational exposure to ionizing radiation, it was reported that increased levels of reversible DNA damage occurred in the leukocytes of nuclear medicine personnel, and the level of DNA damage was dependent on the type and duration of work. The authors suggested that although most DNA damage detected by the comet assay was repaired, radiation safety needed to be further improved [23]. In a similar study in which human lymphocyte DNA was evaluated using the comet assay among healthcare workers, it was shown that ionizing radiation caused DNA damage [24]. In another study, the effects of 0.1 and 0.4 Gy gamma radiation on human lymphocytes were investigated using the standard and modified comet assay analyses. The authors showed that the parameters of the standard comet assay were significantly higher in the samples exposed to the 4 Gy radiation dose than in those exposed to 0.1 Gy and the control sample [25].

He et al. (2000) used the comet assay and micronucleus test to determine the genotoxic effects of X-ray radiation on human lymphocytes. The authors applied in vitro radiation doses of 0.00, 0.02, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 and 2.00 Gy to the isolated human lymphocytes to compare the relationship and sensitivity of these two detection methods. They reported that the mean comet length increased in a dose-dependent manner, but the results of the micronucleus test were not significant, suggesting that comet analysis was more sensitive than the micronucleus test in X-ray-induced genotoxicity [26]. Wilkins et al. (2002) also used the comet assay to quantify apoptosis based on characteristic DNA fragmentation patterns and stated that this method could be used to determine late phase apoptosis, while Annexin V was effective in showing all stages of apoptosis [27].

In the current study, the experimental data of the radiation dose on peripheral blood lymphocytes exposed to individuals who underwent a CT-guided percutaneous thoracic biopsy were investigated with the comet assay. To this end, blood samples were taken before and after the procedure from 16 patients who underwent a CT-guided biopsy. DNA damage was detected in all patients before and after the procedure, but the degree of damage was found to be significantly higher after the procedure. In the statistical analysis of the radiation dose received by the patients and the comet scores, there was no significant correlation between the DLP dose and the comet scores. Our results suggest that the comet assay can be a useful complement to the standard biodosimetric methods. Detection of immediate DNA damage reflects the simultaneous exposure and actual levels of DNA damage in the peripheral blood lymphocytes of patients undergoing CT-guided biopsy.

As a result, there was a significant difference in the comet scores before and after the CT-guided biopsy procedure. We also observed that the radiation dose received during the procedure increased DNA damage. Future studies that determine more specific parameters of the comet assay and/or investigate the same parameters in larger samples can make further contributions to our results.

Declaration of Ethical Code

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

The study was approved by Clinical Research Ethics Committee of Suleyman Demirel University Faculty of Medicine (date: 07.10.2020, decision number: 304). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, 2013.

References

- [1] McLean, A.R., Adlen, E.K., Cardis, E., Elliott, A., Goodhead, D.T., Harms-Ringdahl, M., et al. 2017. A restatement of the natural science evidence base concerning the health effects of low-level ionizing radiation. Proc. R. Soc., 284: 1-7.
- [2] Tang, F.R., Loganovsky, K. 2018. Low dose or low dose rate ionizing radiation-induced health effect in the human. J. Environ.Raidoact., 192: 32-47.

- [3] Jones, A.E., Kline, J.A. 2003. Availability of technology to evaluate for pulmonary embolism in academic emergency departments in the United States. *J Thromb Haemost.*, 1: 2240-2.
- [4] Richman, P.B., Courtney, D.M., Friese, J., Matthews, J., Field, A., Petri, R., et al. 2004. Prevalence and significance of nonthromboembolic findings on chest computed tomography angiography performed to rule out pulmonary embolism: a multicenter study of 1,025 emergency department patients. *Acad Emerg Med*, 1: 642-647.
- [5] Webb, W. R., Higgins, C. B. 2011. *Thoracic Imaging: Pulmonary and Cardiovascular Radiology*. Lippincott Williams & Wilkins, 27: 656-682.
- [6] Karabas, H. C., Ozcan, I., Sener, L., Guler, S., Albeniz, I., Erdem, T. 2019. Evaluation of cell and DNA damage induced by panoramic radiography. *Nigerian Journal of Clinical Practise*, 22 (8): 1041-1048.
- [7] Vodicka, P., Vodenkova, S., Opattova, A., Vodickova, L. 2019. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. *Mutat Res Gen Tox En*, 843: 95–110.
- [8] Kuchařová, M., Hronek, M., Rybáková, K., Zadák, Z., Štětina, R., Josková, V., et al. 2019. Comet Assay and Its Use for Evaluating Oxidative DNA Damage in Some Pathological States. *Physiol. Res.*, 68: 1-15.
- [9] Kumaravel, T.S., Jha, A.N. 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research*, 605: 7-16.
- [10] Ostling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 123: 291-298.
- [11] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1998. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 75: 184-191.
- [12] Collins, A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249–261.
- [13] Carolina, A., Sozua, F., Yujra, V.Q., Pisani, L.P., Viana, M.D.B., Castro, G.M.D., et al. 2019. The Use of Single-Cell Comet Assay on Oral Cells: A Critical Review. *Anticancer Res*, 39: 4011-4017.
- [14] Hininger, I., Chollat-Namy, A., Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., et al. 2004. Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutation Res*, 558: 75–80.
- [15] Hausleiter, J., Meyer, T., Hadamitzky, M., Huber, E., Zanki, M., Martinoff, S., et al. 2006. Radiation dose estimates from cardiac multislice computed tomography in daily practice: impact of different scanning protocols on effective dose estimates. *Circulation*, 113: 1305-1310.
- [16] Kaur, S., Sangeeta, G.K.K., Gautam, N. 2017. Assessment of Radiation Induced DNA Damage in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using COMET Assay. *Int. J. Life Sci Scienti. Res*, 3 (4): 1208-1214.
- [17] Hofer, K.G., Lin, X., Schneiderman, M.H. 2000. Paradoxical effects of iodine-125 decays in parent and daughter DNA: A new target model for radiation damage. *Radiat. Res.*, 153: 428–435.
- [18] Lara, C.M., Hill, M.A., Jenner, T.J., Papworth, D., O'Neill, P. 2001. Dependence of the yield of DNA double strand breaks in Chinese hamster V79-4 cells on photon energy of characteristic ultrasoft X rays. *Radiat. Res.*, 155: 440–448.
- [19] Nikjoo, H., Neill, P.O., Wilson, W.E., Goodhead, D.T. 2001. Computational Approach for Determining the Spectrum of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. *Radiation Res.*, 156:577-583.
- [20] Gloss, L.M., Placek, B.J. 2002. The effect of salts on the stability of the H2A–H2B histone dimer. *Biochem.*, 41 (50): 14951-59.
- [21] Santivasi, W.L., Xia, F. 2014. Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxid. Redox Signal.*, 21 (2): 251–259.
- [22] Touil, N., Aka, P.V., Buchet, J.P., Thierens, H., Kirsch-Volders, M. 2002. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagen*, 7 (3): 223-32.
- [23] Dobrzyńska, M.A., Pachocki, K.A., Gajownik, A., Radzikowska, J., Sackiewicz, A. 2014. The Effect Occupational Exposure to Ionizing Radiation on the DNA Damage in Peripheral Blood Leukocytes of Nuclear Medicine Personnel. *J Occup Health*, 56: 379–386.

[24] Garaj – Vrhovac, V., Kopjar, N. 2003. The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis*, 8 (3): 265-271.

[25] Mikloš, M., Gajski, G., Garaj – Vrhovac, V. 2009. Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiol Oncol*, 43 (2): 97-107.

[26] He, J.L., Chen, W.L., Jin, L.F., Jin, H.Y. 2000. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res*, 469 (2): 223-31.

[27] Wilkins, R.C., Kutzner, B.C., Truong, M., Sanchez-Dardon, J., McLean, J.R.N. 2002. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry*, 48 (1): 14-9.

Synthesis, Theoretical Studies, Cytotoxicity of 2-((4-(Dimethylamino)Benzylidene)Amino)-5-Methylphenol with Potential JNK1 Inhibitory Activity

Potansiyel JNK1 İnhibe Edici Aktiviteye Sahip 2-((4-(dimetilamino)benziliden)amino)-5-metilfenol'ün Sentezi, Teorik Çalışmaları, Sitotoksitesisi

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU ^{1*}, Halil BERBER ², Ülkü Dilek UYSAL ²

¹ Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Özdağ Science Faculty, Biology Department, Karaman, Turkey
² Eskişehir Technical University, Science Faculty, Chemistry Department, Eskişehir, Turkey

ABSTRACT

Cisplatin, doxorubicin, hydroxycamptothecin, leucovorin, vincristine and 5-fluorouracil resistance of cancer cells are associated with the activities of C-Jun N-Terminal Kinase 1 (JNK1). Inhibition of the JNK1 by pharmacological agents could be a beneficial attempt for reversing the chemoresistance of various cancer cells. However, there is no FDA-approved JNK inhibitor for safe use in clinics in today's clinics. In this study, a Schiff base 2-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)-5-methylphenol, (7S4) has been synthesized and characterized by ¹H, ¹³C-NMR, FT-IR and elemental analysis. The stable geometry of 7S4 has been determined by DFT method with Gaussian09 program (B3LYP/6-311g++(d,p)). The Gibbs Free energies, stable tautomer forms, H-bond, Mulliken charges, dipole moment, natural bond orbital (NBO), HOMO, LUMO and band gap energy (E_{GAP}), molecular electrostatic potential (MEP) and solvent accessibility surface areas (SASA) have been calculated. Drug-likeness, anticancer and JNK1 inhibitory activities of 7S4 have been evaluated. Enol tautomer form of trans 7S4 was characterized as the most stable structure. 7S4 was observed to be a reactive compound in chemical reactions with a low E_{GAP} value. In addition, high and low electron density regions of 7S4 are responsible for the establishment of chemical bonds in biological systems. 7S4 exhibited strong druggability with the agreement on Lipinski, Ghose, Veber, Egan, and Muegge rules. Cytotoxicity tests and molecular docking revealed that 7S4 poses a potential JNK1 inhibitor activity.

Keywords: Schiff bases, DFT method, JNK1 inhibitors, antitumor agents, druglikeness, molecular docking

Alınış / Received: 06.06.2023 Kabul / Accepted: 03.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



Ö Z

Kanser hücrelerinin sisplatin, doksorubisin, hidrosikamptotesin, lökovorin, vinkristin ve 5-fluorourasil direnci, C-Jun N-Terminal Kinaz 1 (JNK1) aktiviteleri ile ilişkilidir. JNK1'in farmakolojik ajanlar tarafından inhibisyonu, çeşitli kanser hücrelerinin kemodirencini tersine çevirmek için yararlı bir yaklaşım olabilir. Ancak günümüz kliniklerinde güvenli kullanım için FDA onaylı bir JNK inhibitörü bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bir Schiff bazı 2-((4-(dimetilamino)benziliden)amino)-5-metilfenol, (7S4) sentezlenmiş ve ¹H, ¹³C-NMR, FT-IR ve element analizi ile karakterize edilmiştir. 7S4'ün kararlı geometrisi Gaussian09 programı (B3LYP/6-311g++(d,p)) ile DFT yöntemi ile belirlenmiştir. Gibbs Serbest enerjileri, kararlı tautomer formları, H-bağı, Mulliken yükleri, dipol momenti, doğal bağ orbital (NBO), HOMO, LUMO ve bant boşluk enerjisi (EGAP), moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) ve çözücü erişilebilirlik yüzey alanları (SASA) hesaplanmıştır. 7S4'ün ilaca benzerliği, antikanser ve JNK1 inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir. Trans 7S4'ün enol tautomer formu en kararlı yapı olarak nitelendirildi. 7S4'ün düşük EGAP değeri ile kimyasal reaksiyonlarda reaktif bir bileşik olduğu gözlemlendi. Ayrıca 7S4'ün yüksek ve düşük elektron yoğunluklu bölgeleri biyolojik sistemlerde kimyasal bağların kurulmasından sorumludur. 7S4, Lipinski, Ghose, Veber, Egan ve Muegge kurallarına ilişkin anlaşma ile güçlü uyandırulabilirlik sergiledi. Sitotoksikite testleri ve moleküler kenetlenme, 7S4'ün potansiyel bir JNK1 inhibitör aktivitesi oluşturduğunu ortaya çıkardı.

Anahtar Kelimeler: Schiff bazları, DFT yöntemi, JNK1 inhibitörleri, antitümör ajanlar, ilaca benzerlik, moleküler kenetlenme



1. Introduction

Cancer is at least the second substantial reason of decease in advance the age of 70 years in 112 of 183 countries [1]. Chemotherapy is a standard method of cancer treatment that relies on cytotoxic drugs for the destruction or inhibition of the growth and metastasis of cancer cells. There has been a considerable effort to discover anticancer agents for cancer chemotherapy [2–6]. However, cancer chemotherapy often adversely affected from the chemoresistance which is the skill of tumor cells to adopt the presence of cytotoxic drugs. Various factors including personal variations in medication susceptibility, location of cancer, aggressivity of tumor, and modifications in intracellular molecules conduce the chemoresistance of cancer cells [7]. New cytotoxic drugs which are useful for overcoming chemoresistance hold significant value.

C-Jun N-Terminal Kinase 1 (JNK1) is a constituent of stress-activated protein kinases (SAPKs) that are primarily switched on in reply to cellular pressure [8]. JNK1 is involved in 5-fluorouracil and leucovorin resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma patients [9]; cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma and ovarian cancer cells [10,11]; doxorubicin resistance of breast cancer, chronic myelogenous leukemia, hepatocellular carcinoma, small cell lung cancer, and stomach cancer cells [12–15], vincristine resistance of epidermoid carcinoma cells [15]; hydroxycamptothecin resistance of colon cancer cells [16]; and oxaliplatin resistance of colon cancer cells [17]. Therefore, restriction of the kinase function of JNK1 by pharmacological agents could be a beneficial attempt for reversing the chemoresistance of various tumor cells. Developing efficient and specified JNK inhibitors is a quite vibrant field in distinct laboratories in the globe. In the past decade, many JNK inhibitors such as SP600125, AS601245, JNK-IN-8 were discovered [18]. However, to the best of our knowledge, there is no FDA-approved JNK1 inhibitor for safe use in clinics (<https://www.ppu.mrc.ac.uk/sites/default/files/2021-04/small-molecule-inhibitors.pdf>). There are many successful kinase inhibitors, such as imatinib, nilotinib for different kinase enzymes like ALK, B-Raf, BCR-Abl, EGFR, and VEGFR [19]. So, it is possible to assume that effective and safe small molecules can be developed to inhibit JNK1.

Schiff bases, which are small molecules, and their complexes have certain properties such as chemo sensor [20,21], catalytic [22], optical switching devices [23], solvato chromic [24,25], fluorescent material [24], and liquid crystal [26]. Compounds derived from aromatic ortho hydroxy Schiff bases are of particular interest due to their nonlinear optical properties and abilities for polymerization and metal bond formation. Moreover, various activity studies such as antifungal, antimicrobial, antimalarial, trypanocidal, antiproliferative, anti-inflammatory, antipyretic, herbicide and antitumor activity such compounds are available in the literature [20,21,33,34,22,26–32].

In this study, first of all, the synthesis and characterization of the new 2-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)-5-methylphenol compound (7S4) was performed. The stable structure of the compound and possible tautomer stabilities was then determined theoretically. The utility of 7S4 as an anticancer agent was evaluated in five different cancer and two control cell lines. Moreover, pharmacokinetics, druglikeness and molecular docking analysis were performed comparatively between 7S4 and previously reported JNK inhibitors that are SP600125 [35], and a Pyrrolopyrimidine [36]. The demonstration of the binding activity of the Pyrrolopyrimidine to the JNK1 by an eminent study [36] provided the possibility to compare the JNK1 inhibitory activity of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine. SP600125 is a bilateral ATP-competitive inhibitor of JNK1. Some of in vitro and in vivo studies proved the JNK1 inhibitor activity of SP600125 [37–39]. However, toxicity induced by SP600125 could be the major problem for the clinical utility of this small molecule [18].

2. Material and Method

Chemistry

General

All solvents and organic compounds used in the synthesis are of spectroscopic purity and were obtained from Sigma-Aldrich. Synthesis reaction of the molecule 7S4 was given in Figure 1. Spectroscopic analysis of the compound; ^1H and ^{13}C NMR spectra were performed by Agilent 400 MHz NMR Magnet Spectrometer in deuterium dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6), FT-IR spectra were performed with KBr pellets by Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer and elemental analysis was performed on LECO-932 CHNS-O Elemental Analyzer. The original spectra (NMR and IR) of the synthesized compound 7S4 are given in Supplementary materials_experimental1.

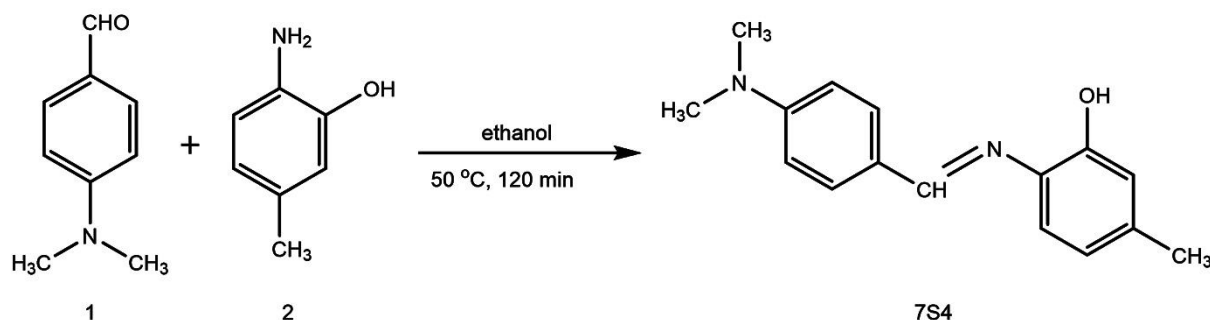


Figure 1: Synthesis reaction of 2-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)-5-methylphenol (7S4).

General Procedure for the Synthesis of 7S4

0.01 mole of 4-(dimethylamino)benzaldehyde (1) and 0.01 mole of 2-amino-5-methylphenol (2) compounds were dissolved in 10 mL of ethyl alcohol in separate containers by slightly heating. 2-amino-5-methylphenol solution was added to the 4-(dimethylamino)benzaldehyde solution with slow stirring. The product started to precipitate within the first 30 minutes and the mixing process was continued for another 90 minutes. The precipitated product was filtered off, then it was recrystallized in ethanol and dried first in the open air and then in a desiccator. The structure of the 7S4 was elucidated by spectroscopic techniques. 2-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)-5-methylphenol (7S4): FT-IR (KBr,

disk, ν cm^{-1}), 3436 (O-H), 3361, 3079, 3039 and 3002 (C-H, aromatic), 2915, 2893, 2860 and 2818 (C-H, aliphatic), 1611 (C=N), 1526 and 1499 (C=C, aromatic), 1228 (C-O, aromatic). ^1H NMR (400 MHz, dmsO) δ 8.60 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.68 (s, 1H), 6.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.01 (s, 6H), 2.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, dmsO) δ 157.81 (s), 152.57 (s), 151.41 (s), 136.16 (s), 136.12 (s), 130.77 (s), 124.68 (s), 120.48 (s), 118.22 (s), 116.45 (s), 111.77 (s), 40.19 (s), 21.24 (s). Elemental analysis, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$, Calculated (Found), %: C, 75.56 (75.00); H, 7,13 (7,311); N, 11.01 (11.12).

Theoretical Calculation Procedure

Theoretical calculations were made by Gaussian09 [40] [34] and GaussView 5.0.9 [41] programs using the DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory. Before Gaussian calculation; CS ChemBioDraw Ultra 16.0.1.4 for Microsoft Windows [42] and MarvinSketch 19.27.0 [43] programs were used as preliminary experiments to identify possible stable molecular structures of the compound (7S4). Calculations were made in vacuum and certain solvent phases [acetone (ACT), acetonitrile (ACCN), chloroform (CHCl_3), dichloromethane (DCM), N,N-dimethyl formamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethyl alcohol (ETOH), methyl alcohol (METOH) and vacuum (V)] using the DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory and CPCM model.

Biology

Cell culture

Five cancer and two cells including A549, Caco-2, HCT-116, Huh7, MCF-7, 3T3-L1, hTERT-HPNE were used in this study. Detailed explanations for the source and cultivation of these cell lines can be found from our previous publication [4].

Cytotoxicity

Cytotoxicity of 7S4 was assessed by neutral red uptake (NRU) assay as was described previously [4]. In brief, 10000 cells were plated to 96-well culture plate (Thermo Scientific, Germany), next incubated for an overnight at 37 °C in 5% CO_2 , then 30, 15, 7.5, 3.25, 1.6, 0.8 and 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 7S4 were administered to cells. After the 72h incubation medium was poored, 200 μl of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ neutral red dye medium was applied to each well and cells were incubated for an extra 3h. Further, the neutral red medium was discarded and wells were rinsed by 200 μl phosphate buffer saline (PBS), then dye was extracted with the application of 200 μL acidic ethanol solution comprising of acetic acid-water-ethanol (1:49:50:v:v:v). The plates were retained for 15 min at room temperature for firm extraction of the dye on an orbital-rocking shaker GFL 3012 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany). Absorbance was quantified by an ELx 808 Ultra Microplate Reader (BioTek, Winooski, Vermont, USA) decorated with a 540 nm filter. Cells applied with 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) were used as solvent control for assessing the viability. The IC50 quantities were estimated as the concentrations of test compounds that were necessary to halve the number of cells and assessed by a calibration curve as previously mentioned [44]. In the whole wells DMSO concentration was not higher than 0.1%.

In Silico Pharmacokinetics and Druglikeness

SwissADME [45] was utilized for the comparative analysis of absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and druglikeness of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine. Chemical structures of SP600125 and the Pyrrolopyrimidine are presented in Figure 2.

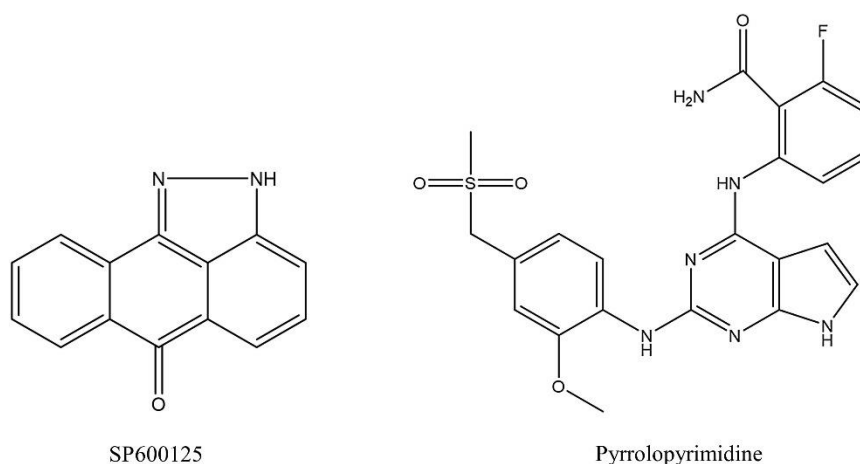


Figure 2: Chemical structures of reference compounds, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine.

In Silico Molecular Docking

Protein Data Bank at the Research Collaboration for Structural Bioinformatics (RCSB) website [www.rcsb.org] (PDB: 3ELJ) was used for obtaining the X-ray crystal structure of JNK1 co-crystallized with the Pyrrolopyrimidine [36]. AutoDockTools-1.5.6 [46] was used for the definition of docking sites, rotatable bonds and the addition of polar hydrogen atoms. Vina forcefield was used for generating affinity maps. A selective JNK1 inhibitor, SP600125 [35] and native ligand of 3ELJ, the Pyrrolopyrimidine [36] were used as positive controls. While JNK1 was regarded as rigid, the ligands were regarded as flexible molecules in this molecular docking procedure. The binding affinity of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine to the JNK1 was calculated by AutoDock Vina [47]. The 3D structure of the JNK1-7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine interaction was visualized and documented by using PyMOL [48].

3. Results

The compound 7S4, commercially purchased compounds of 4-(dimethylamino)benzaldehyde (1) and 2-amino-5-methylphenol (2), were synthesized according to the procedure outlined in experimental section using ethyl alcohol solvent. The synthesis reaction of 7S4 is shown in Figure 1. The synthesis took place at approximately 50 °C and a total of 120 minutes. After the purity of the 7S4 was proved by thin layer chromatography (TLC) technique, it was characterized by ¹H, ¹³C-NMR, FT-IR and elemental analysis. In experimental and theoretical calculations; this compound, characterized by its purity and structure, was used.

Theoretical Calculations

Identification of the Stable Structure for the Compound (7S4)

In order to identify the stable structure of the molecule (7S4), different cis and trans structures of it were drawn by the Chem Draw program. Firstly, the energy of each cis and trans structure was calculated by minimizing them with MM2 in Chem3D. Then, the second calculation was performed by conformation calculation with MarvinSketch 19.27.0 program to determine the stable structure of the 7S4. Each structure determined by the MarvinSketch program was minimized again with MM2 in Chem3D and their energies were calculated. It is determined that the most stable structure (the lowest energy structure of the compound) for 7S4 was determined by the above two methods (7S4_M7_7). Different possible stable structures were investigated by scanning calculation of the most stable structure of the 7S4 (7S4_M7_7) in Chem3D program and by using dihedral angles of imine (CH=N) and hydroxyl (O-H) groups. The possible tautomer form was drawn by using the determined most stable trans structure of the compound (7S4_M7_7). The drawn enol and keto tautomer forms were named as 7S4_M7_7_E and 7S4_M7_7_K, respectively (Figure 3).

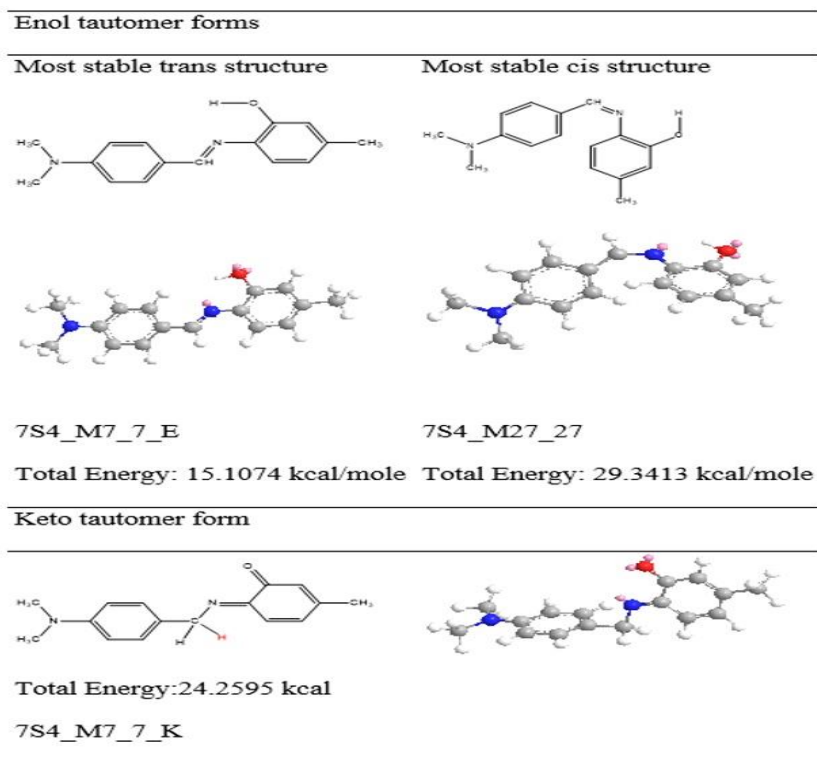
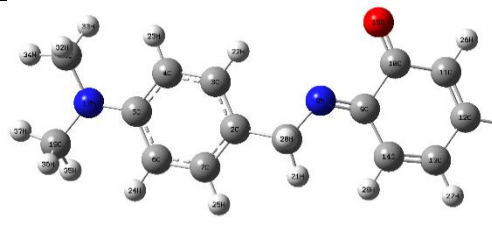
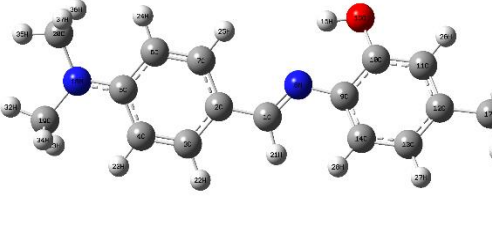


Figure 3: Shapes and minimized energies of the most stable trans and cis structures for 7S4 (E, enol form; K, possible) tautomer form.

Table 1: The bond angles, energies and shapes of the calculated most stable conformations of the 7S4 (using B3LYP method and 6-311++g(d,p) basis set).

Molecule	Dihedral angle		Energy (kcal/mole)	Conformation
1_7S4_M7_7_K_opt	2C-1C-8N-9C	138	-505412.6	
	3C-2C-1C-8N	41		
	15O-10C-9C-8N	0.3		
2_7S4_M7_7_E_opt	9C-10C-15O-16H	0.002	-505446.8	
	3C-2C-1C-8N	-0.014		
	2C-1C-8N-9C	180		
3_7S4_M7_7_E_scan150	9C-10C-15O-16H	0.004	-505446.9	
	3C-2C-1C-8N	-4		
	2C-1C-8N-9C	178		

4_7S4_M7_7_K_scan8 N	2C-1C-8N-9c	-139	-505412.6	
	3C-2C-1C-8N	-38		
	15O-10C-9C-8N	-0.2		
5_7S4_M7_7_E_scan8 N	9C-10C-15O-16H	3	-505446.9	
	3C-2C-1C-8N	-180		
	2C-1C-8N-9C	177		

Optimization Calculations

First of all, the optimization calculation of the 7S4_M7_7_E and 7S4_M7_7_K conformations was performed using the B3LYP method and the 6-311++g(d,p) basis set. We preferred this method and the basis set since these are the most used method and basis set in the general calculations of this molecule and similar molecules [4, 23-25]. In addition, the scan calculation of the 7S4_M7_7_E form with 9C-10C-15O-16H atoms (7S4_M7_7_E_scan15O) and 3C-2C-1C-8N (7S4_M7_7_E_scan8N) atoms were done by the B3LYP method with 6-311++g(d,p) basis set. The scan calculation of 7S4_M7_7_K form with 2C-1C-8N-9C (7S4_M7_7_K_scan8N) atoms was done by the same method and basis set. The bond angles, energies and shapes of the most stable conformations determined by this calculation are given in Table 1 (Supplementary materials1).

From the scan calculation of the enol form 7S4_M7_7_E with the angle 9C-10C-15O-16H, it was determined that the most stable conformation was 3_7S4_M7_7_E_scan15O with an energy of -505446.950 kcal/mole. This conformation was used for other enol form calculations (Supplementary materials1). From the scan calculation of the keto form 7S4_M7_7_K with the angle of 2C-1C-8N-9C, the most stable conformation was the 1_7S4_M7_7_K_opt conformation with an energy of -505412.646 kcal/mole. The conformation was used for other keto form calculations (Supplementary materials1).

Tautomer

Knowledge about the probability and ratio of the tautomer form of the molecule is important in terms of reactions, spectroscopic analyses, biological and pharmacological properties. Calculation results of 3_7S4_M7_7_E_scan15O molecule and its possible tautomer form in vacuum and solvent phase are shown in Table 2.

Table 2: SETFE energies and K_T values of the enol and keto tautomer forms of the studied molecule.

Molecule				Tautomer
31_7S4_M7_7_E_scan15O_freq		11_7S4_M7_7_K_freq		E \rightleftharpoons K
Solvent	SETFE* (kcal/mole)	Solvent	SETFE* (kcal/mole)	K_T^{**} (kcal/mole)
ACT	-505290.749	ACT	-505259.665	31.084
ACCN	-505290.928	ACCN	-505259.965	30.963
CHCl3	-505291.234	CHCl3	-505257.446	33.788
DCM	-505290.217	DCM	-505258.778	31.438
DMF	-505291.832	DMF	-505258.023	33.810
DMSO	-505290.985	DMSO	-505260.062	30.924
ETOH	-505290.822	ETOH	-505259.787	31.035
METOH	-505290.905	METOH	-505259.927	30.978

* SETFE: Sum of electronic and thermal free energies

**The K_T tautomer shows the tautomer equilibrium values between the enol form (31_7S4_M7_7_E_scan15O_freq) and the keto form (11_7S4_M7_7_K_freq). $K_T = SETFE_K - SETFE_E$ (negative value indicates that form E is more stable)

Since the K_T tautomer has positive values in vacuum and in all solvents (approximately 30-33 kcal/mole), it seems that the enol tautomer forms are more stable and the equilibrium is towards the enol form. This means that the probability of formation of the K_T tautomer form in the reaction medium is very unlikely. The most stable enol form (31_7S4_M7_7_E_scan15O_freq) of the compound determined by tautomer calculation was used in all other calculations.

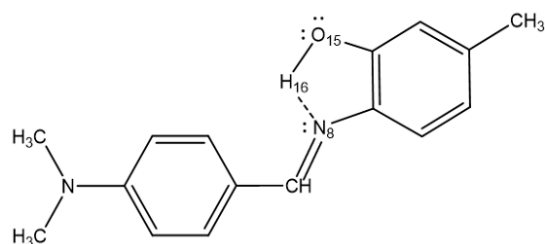
Intramolecular H-bond

The B3LYP method and the Natural Atomic Orbital and Natural Bond Orbital (NBO) Analysis calculations on the 6-311g++(d,p) basis set were calculated in vacuum by Gaussian NBO Version 3.1. The calculated H-bond values are given in Figure 4.

The intramolecular H-bond affects the stability of the molecule. In the tautomer equilibrium (K_T) of the calculated enol and keto forms; the contribution of the H-bond is also inevitable for the balance to favor the enol form. Intramolecular H-bonding is observed only in the enol form and not in the keto form. The fact that the calculated intramolecular H-bond was 2.033 Å caused the enol form to be more stable, and due to this situation, the high K_T values in the tautomer equilibrium (30-33 kcal/mole) resulted in the equilibrium being towards the enol form.

Dipole Moment

The dipole moment value gives information about the charge distribution in the molecule. In addition, a high dipole moment means that the charge distribution is dense in different atoms groups or regions in the molecule, and low means that it is less. The dipole moment also helps us to understand solvent-solute interaction. Dipole moment values in frequency calculation in vacuum by B3LYP method and on 6-311g++(d,p) basis set are given in Table 3.



31_7S4_M7_7_E_scan150_freq

Bond length (Å)

H16.....N8

2.033

Figure 4: Intramolecular H-bond.

It was observed that the dipole moment values were high (approximately 5-7 Debye) in the form 31_7S4_M7_7_E_scan150_freq. Since the dipole moment of the form of 31_7S4_M7_7_E_scan150_freq is high, it is understood that the charge is polarized in certain atoms, groups and regions (see section molecular electrostatic potential (MEP)). The higher electronegativity of nitrogen and oxygen compared to hydrogen and carbon causes the change in the charge distribution of the changing functional groups in the molecular structure, and therefore the dipole moment to be higher. High dipole moment value means that the compound dissolves more easily in polar and protic solvents.

Table 3: Dipole moment values.

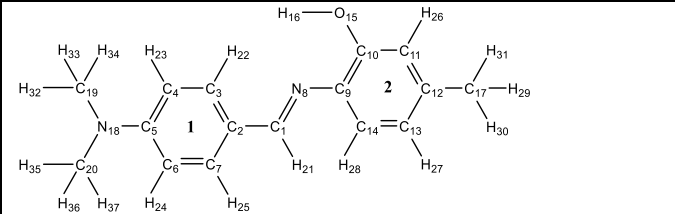
Molecule	
31_7S4_M7_7_E_scan150_freq	
Solvent	Dipole (Debye)
ACT	7.813
ACCN	7.869
CHCl3	7.399
DCM	7.646
DMF	7.506
DMSO	7.888
ETOH	7.836
METOH	7.862
V	5.945

Natural Bond Orbital (NBO)

Electron-rich and electron-deficient centers in the molecule are determined by calculating the atomic charges. Knowing the electron-rich or electron-deficient atoms and centers helps us to know the center where electrophiles or nucleophiles will attack in reactions and to understand the reaction mechanism. Another advantage of knowing the atomic charges is that it allows us to predict the solvent-solute interaction, intramolecular or intermolecular H-bonding. Also, basic and acidic centers can be estimated. If the molecule has a biologically active property, it can be predicted from which atom or functional group the may be active. If the molecule is used as a ligand in complex reactions, it can be understood with which atoms the coordinate covalent bond will be formed. NBO calculation for stable enol form was done with B3LYP method and 6-311g++(d,p) basis set in vacuum by Gaussian NBO Version 3.1 (Table 4).

According to the NBO calculation results, it is seen that the aromatic ring (1) with C2-C7 carbon atoms contains more electron-rich atoms (with lower negative values) than the atomic charges in the aromatic ring (2) with C9-C14 carbon atoms (Table 4). The higher charges of the C2-C7 carbon atoms are due to the strong mesomeric electron repulsion to the ring with the contribution of the N18 (N(CH₃)₂) atom and the methyl group attached to this atom. In the aromatic ring with C9-C14 carbon atoms, there is weak mesomeric electron repulsion of the O15 atom and the C17 methyl group attached to the ring (Table 4). In the compound, they are hetero atoms with the highest electron charge and their electron charges are O15: -0.681, N8: -0.514 and N18: -0.477, respectively. The polarity and activity of the molecule are due to these heteroatoms. Of all the hydrogens, the hydrogen with the fewest electrons, that is, the most electron-deprived (with the higher positive value), is hydrogen H16: 0.489. Since hydrogens with a higher positive value are usually acidic hydrogens, it can be said that hydrogen H16 is acidic hydrogen. The theoretical pKa calculation was calculated for H16 as pKa=8.582 with the PM6 method by MOPAC2016 package program.

Table 4: Natural Bond Orbital (NBO).



Atom No	Natural Charge*	Atom No	Natural Charge*
C1	0.152	C20	-0.351
C2	-0.166	H21	0.149
C3	-0.134	H22	0.217
C4	-0.257	H23	0.208
C5	0.212	H24	0.208
C6	-0.276	H25	0.204
C7	-0.131	H26	0.211
N8	-0.514	H27	0.199
C9	0.061	H28	0.201
C10	0.337	H29	0.211
C11	-0.257	H30	0.204
C12	-0.016	H31	0.208
C13	-0.230	H32	0.199
C14	-0.202	H33	0.186
O15	-0.681	H34	0.195
H16	0.489	H35	0.199
C17	-0.587	H36	0.186
N18	-0.477	H37	0.194
C19	-0.351		

* Negative charge values mean electron rich and positive charge values mean electron weak.

HOMO, LUMO and Band Gap Energy (E_{GAP})

The HOMO and LUMO energies of the molecule and the difference between these two energies (band gap energy, E_{GAP}) help us to understand the chemical behavior, optical, electronic, conductivity, etc. properties of the molecule. The HOMO, LUMO and E_{GAP} energy values and shapes determined by the calculation made with the DFT TD-SCF B3LYP method and the 6-311g++(d,p) basis set are given in Figure 5. From the E_{HOMO} and E_{LUMO} calculations, it was determined that the electrons were distributed throughout the molecule and the ΔE_{GAP} energy (2.366 eV) was not very high.

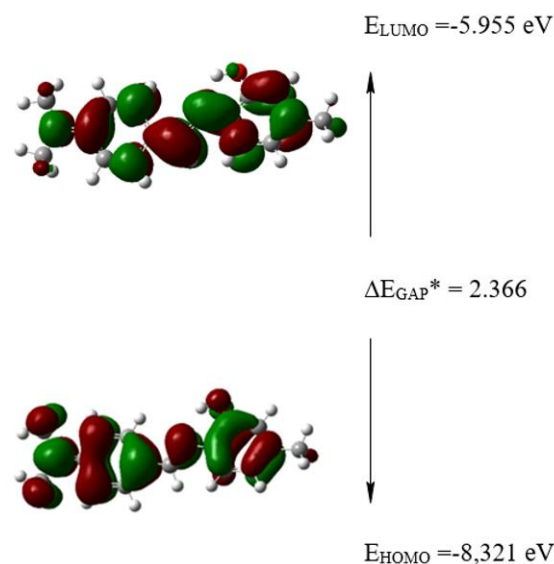


Figure 5: E_{HOMO} , E_{LUMO} and E_{GAP} values of the studied molecule.

Molecular Electrostatic Potential (MEP)

Molecular electrostatic potential energy maps allow us to see the charge distributions of molecules in three dimensions and to visually see the charged regions of the molecule. The red color represents the region with the most electrons (electron rich) and the blue area represents the region with the least electrons (electron weak). The MEP shape of the molecule determined by the calculation made with the DFT B3LYP method and the 6-311g++(d,p) basis set is given in Figure 6. The electron-rich center of the molecule is the aromatic ring containing OH and the other aromatic ring is less electron-rich (Figure 6). It is seen that the methyl groups attached to the amine are the electron weakest center, and the hydrogens in the molecule are also electron weak.

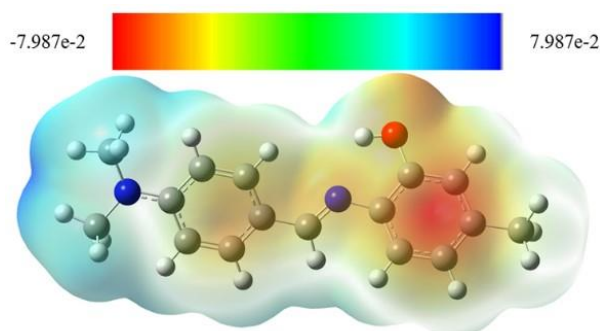


Figure 6: Molecular electrostatic potential (MEP) shape of the molecule.

Solvent Accessible Surface Area (SASA)

SASA (Solvent accessible surface area) is an image that helps us see how a molecule dissolved or to be dissolved in the solvent interacts with the solvent molecule. The SASA shape determined by the calculation made with the DFT B3LYP method and the 6-311g++(d,p) basis set is given in Figure 7. In the Figure 7, blue and red atoms represent polar centers, and gray colors represent nonpolar centers. It means that polar and polar protic solvents will be activated with blue and red colored atoms and nonpolar solvents will be activated with gray colored atoms.

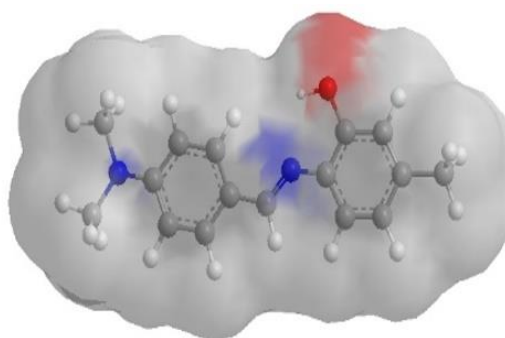


Figure 7: The SASA shape of the molecule.

Cytotoxicity

By using the NRU assay the cytotoxicity of 7S4 was screened on five cancer cells including A549, Caco-2, HCT-116, Huh-7, MCF-7; and two normal cells including hTERT-HPNE and 3T3-L1. The IC₅₀ values that were the 7S4 concentration to halve the cell number and the selectivity indexes (SIA, SIB) that were the division of 7S4 concentration to halve the hTERT-HPNE cells and the 7S4 concentration to halve the 3T3-L1 cells were by the 7S4 concentration to halve the cancer cells, were calculated and presented in Table 5. It was observed that the 7S4 concentration to halve the cell number was higher than 11.85 µg/mL and increased among the cell lines with the order of 3T3-L1, Huh-7, MCF-7, HCT-116, A549, hTERT-HPNE, and Caco-2. Caco-2 was the most resistant and 3T3-L1 was the most sensitive cell line for the 7S4 induced toxicity. When the SIA values were compared it was observed that Huh-7 cells were 1.9-fold MCF-7 cells were 1.67-fold sensitive to the 7S4 induced cytotoxicity than the normal hTERT-HPNE cells. This result implies a role for the selective toxicity for 7S4 to the hepatocellular carcinoma and breast cancer cells. However, this idea weakens when the S2 values that were 0.82 and 0.71 are considered. Therefore, it was concluded that 7S4 was moderately toxic to both cancer and normal cells.

Table 5: IC₅₀ values* (µg/mL) and selectivity indexes** (SIA and SIB) of 7S4 on cancer and normal cell lines. Results from three different biological replicates were exhibited as mean ± SD.

	A549	Caco-2	HCT-116	Huh-7	MCF-7	hTERT-HPNE	3T3-L1
IC₅₀ of 7S4	27.61±3.37 (SIA 1; SIB 0.42)	>30	27.41±3.66 (SIA 1; SIB 0.43)	14.46±0.35 (SIA 1.9; SIB 0.82)	16.57±3.29 (SIA 1.67; SIB 0.71)	27.65±1.70	11.85±0.61

IC₅₀*: half inhibitory concentration; NRU: neutral red uptake; SD: standard deviation. **The selectivity indexes were calculated by the division of IC₅₀ values of hTERT-HPNE (for SIA) and 3T3-L1 (for SIB) by the cancer cell lines.

Pharmacokinetics and druglikeness

By using the SwissADME computational tool, the pharmacokinetic characteristics and druglikeness of test molecules can be predicted with an accuracy of 71% to 89% [35]. Thus, pharmacokinetic characteristics and druglikeness of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine were compared from SwissADME and presented in Table 6. It was observed that SP600125 and 7S4 shared common peculiarities in terms of druglikeness scores and pharmacokinetic characteristics such as gastrointestinal absorption, blood-brain barrier access, CYP450 inhibitory activities that could be better than the Pyrrolopyrimidine. Moreover, since 7S4 was predicted to be more soluble than SP600125 it was suggested that 7S4 has an advantage for being used as a pharmacological agent for inhibiting JNK1 activity.

Table 6: Comparative analysis of absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) between 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine.

	Pecularity	7S4	SP600125	Pyrrolopyrimidine
Physicochemical Properties	Formula	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O	C ₁₄ H ₈ N ₂ O	C ₂₉ H ₂₇ F ₂ N ₈ O ₅ S
	Molecular weight	256.34 g/mole	220.23 g/mole	637.64 g/mole
	Num. heavy atoms	19	17	45
	Num. arom. heavy atoms	6	14	6
	Fraction Csp3	0.31	0.00	0.59
	Num. rotatable bonds	3	0	6
	Num. H-bond acceptors	3	3	12
	Num. H-bond donors	1	1	5
	Molar Refractivity	80.93	74.31	169.49
	Topological molar surface area	35.83 Å ²	44.95 Å ²	211.10 Å ²
Lipophilicity	Log Po/w (iLOGP)	3.06	2.39	0.00
	Log Po/w (XLOGP3)	2.80	3.92	-2.12
	Log Po/w (WLOGP)	3.08	3.67	-1.02
	Log Po/w (MLOGP)	2.18	2.52	1.38
	Log Po/w (SILICOS-IT)	2.37	4.30	1.16
	Consensus Log Po/w	2.70	3.36	-0.12
Water Solubility	Log S (ESOL)	-3.23	-4.28	-2.16
	Solubility	1.51e-01 mg/mL ; 5.90e-04 mole/L	1.14e-02 mg/mL ; 5.20e-05 mole/L	4.41e+00 mg/mL ; 6.91e-03 mole/L
	Class	Soluble	Moderately soluble	Soluble
	Log S (Ali)	-3.21	-4.56	-1.78
	Solubility	1.58e-01 mg/mL ; 6.18e-04 mole/L	6.02e-03 mg/mL ; 2.74e-05 mole/L	1.05e+01 mg/mL ; 1.64e-02 mole/L
	Class	Soluble	Moderately soluble	Very soluble
	Log S (SILICOS-IT)	-2.69	-5.27	-5.69
	Solubility	5.27e-01 mg/mL ; 2.06e-03 mole/L	1.18e-03 mg/mL ; 5.37e-06 mole/L	1.31e-03 mg/mL ; 2.05e-06 mole/L
	Class	Soluble	Moderately soluble	Moderately soluble
	Pharmacokinetics	GI absorption	High	High
BBB permeant		Yes	Yes	No
P-gp substrate		No	No	Yes
CYP1A2 inhibitor		Yes	Yes	No
CYP2C19 inhibitor		No	No	No
CYP2C9 inhibitor		No	No	No

	Pecularity	7S4	SP600125	Pyrrolopyrimidine
	CYP2D6 inhibitor	No	No	No
	CYP3A4 inhibitor	No	No	No
	Log Kp (skin permeation)	-5.88 cm/s	-4.86 cm/s	-11.69 cm/s
Druglikeness	Lipinski	Yes; 0 violation	Yes; 0 violation	No; 2 violations: MW>500, NorO>10
	Ghose	Yes	Yes	No; 4 violations: MW>480, WLOGP<-0.4, MR>130, #atoms>70
	Veber	Yes	Yes	No; 1 violation: TPSA>140
	Egan	Yes	Yes	No; 1 violation: TPSA>131.6
	Muegge	Yes	Yes	No; 5 violations: MW>600, XLOGP3<-2, TPSA>150, #rings>7, H-acc>10
	Bioavailability Score	0.5	0.55	0.17

Molecular docking

In order to predict the JNK1 inhibitory activity of 7S4, molecular docking was performed. For the confirmation of the AutoDock Vina protocol, and its capability to predict the right poses, a well-studied JNK1 inhibitor, SP600125, and the native ligand in the structure of 3ELJ, the Pyrrolopyrimidine, were docked into the binding site, and then the binding affinities of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine were compared. According to the molecular docking results presented in Table 7, the binding affinities of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine to the JNK1 were -7.2, -9.7 and -6.4 kcal/mole, respectively. Therefore, it was concluded that 7S4 has higher JNK1 binding affinity than the Pyrrolopyrimidine but lesser than SP600125.

A comparative molecular visualization analysis of the 3D structure of JNK1 in complex with 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine that were docked by AutoDock Vina was performed and the results were presented in Figure 8. N-terminal and C-terminal atoms of JNK1 were represented as spheres colored by blue and red, respectively. In addition, polypeptide chains were colored by the secondary structure. It was observed from Figure 8 that ASN-114 formed two different hydrogen bonds which are in lengths of 3.1 Å and 3.2 Å with 7S4. MET-111 formed a hydrogen bond which is in the length of 3.3 Å with SP600125. On the other hand, MET-111, GLU-109, MET-111, MET-111, ASN-114, SER-155 and ASN-156 residues formed six different hydrogen bonds which are in lengths of 3.3 Å, 2.9 Å, 3.0 Å, 3.0 Å, 3.2 Å, 3.2 Å, 3.0 Å with the Pyrrolopyrimidine. By relying on these findings, it was suggested that 7S4 targets JNK1, likewise SP600125 and the Pyrrolopyrimidine. In addition, since 7S4 is bound to the hydrophobic pocket of the ATP-binding site of JNK1 like SP600125 [36], it was suggested that 7S4 is a putative ATP-competitive inhibitor of JNK1.

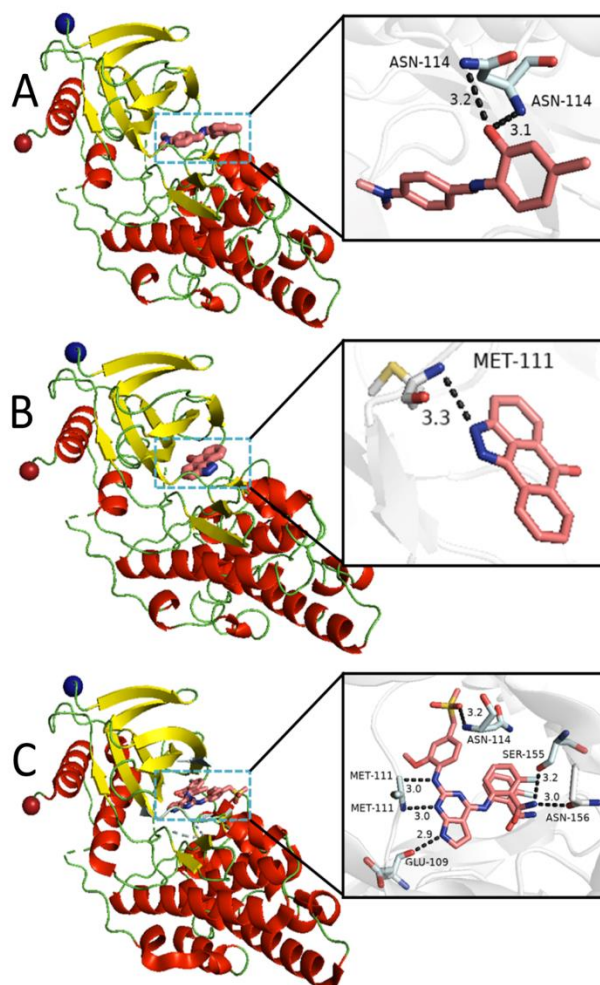


Figure 8: 3D structure of the JNK1 in complex with 7S4 (A), SP600125 (B) and the Pyrrolopyrimidine (C). Analysis of hydrogen bonds formed 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine with JNK1.

Table 7. JNK1 docking of 7S4, SP600125 and the Pyrrolopyrimidine.

Protein	PDB Code	Ligand	ΔG (kcal/mole)	Interacting Residues	Distance (Å)
Crystal structure of JNK1	3ELJ	7S4	-7.2	ASN-114	3.1
				ASN-114	3.2
		SP600125	-9.7	MET-111	3.3
		Pyrrolopyrimidine	-6.4	GLU-109	2.9
				MET-111	3.0
				MET-111	3.0
				ASN-114	3.2
SER-155	3.2				
ASN-156	3.0				

4. Discussion and Conclusion

The compound 2-((4-(dimethylamino)benzylidene)amino)-5-methylphenol (7S4) was synthesized and the accuracy of the structure was proved by spectroscopic techniques (Supplementary materials1). In order to determine the most stable structure in the theoretical calculation, first of all, the stable structures of the possible trans and cis structures of the compound were examined. It was determined that the stable trans structure was 7S4_M7_7_E and the stable cis structure was 7S4_M27_27. Since the trans structure is the more stable structure between these two structures, all calculations were made with this stable trans structure. In addition, the possible tautomer form of the most stable trans structure (7S4_M7_7_K) was drawn. The possible stability of the enol (7S4_M7_7_E) and keto (7S4_M7_7_K)

forms of the stable trans structure was also investigated (Supplementary materials2, Supplementary materials3, Supplementary materials4 and Supplementary materials5).

From the calculations, it was determined that the most stable structure was 31_7S4_M7_7_E_scan15O_freq and all calculations were made with this structure. According to the calculation results, it was determined that the enol tautomer form was quite stable and the K_T balance was approximately 30-33 kcal/mole for all solvents. According to this result, it was concluded that the compound did not show keto tautomer and would only be in enol form (Table 2). All experimental and theoretical calculations will be performed on the enol structure of the compound only in this geometry. The compound has strong intramolecular H-bond (2.033 Å) between H16-N8 atoms (Figure 4). The presence of strong intramolecular H-bond means that this compound is highly stable in this geometry. Experimental and theoretical studies will be carried out on this geometry. From the dipole moment calculations, the dipole of the compound was determined to be quite high (in vacuum: 5.945, in other solvents 7.399-7.888) (Table 3). According to the dipole moment values, it is understood that the compound is a polar compound and will dissolve in polar and polar protic solvents. In experimental studies, it can be concluded that the best results will be in polar and polar protic medium. From NBO calculations, it was calculated that the most electron-rich atoms in the compound were O15 (Natural charge: -0.681), N8: (Natural charge: -0.514 and N18: (Natural charge: -0.477) (Table 4). These centers are active centers in electrophilic attacks. In addition, these centers play a role as active centers in chemical reactions, solvent-solute interactions, and biological systems. It was observed that the weakest center of the electron was the H16 atom (Natural charge: 0.489) (Table 4). The H16 atom is the most sensitive atom to the nucleophile. H16 is acidic hydrogen (PM6 method $pK_a=8.582$ by the MOPAC2016 package program) and reacts in a basic medium. It is concluded that the H16 atom will play a role as an active center in chemical reactions, nucleophilic attacks, basic reactions and biological systems. In addition, HOMO (-8.321 eV) and LUMO (-5.955 eV) energies were observed to be low (Figure 5). In addition, the E_{GAP} value is as low as 2.366 eV; It means that the compound is reactive in chemical reactions, is a colored compound and has a semiconductor feature. From the molecular electrostatic potential energy map, it was determined that the ring containing the OH group was the most electron-dense ring, the electron density gradually decreased towards the other ring, and the least electron density was on the $N(CH_3)_2$ group. In this compound, the red regions with high electron density are active centers against electrophiles, polar and polar protic solvents in solvent-solute interactions, and biological systems. Blue regions with low electron density are active centers against nucleophiles, and against polar and polar protic solvents in solvent-solute interactions and biological systems (Figure 6). From the solvent accessible surface area, polar and polar protic solvents are activated with blue and red colored atoms, and apolar solvents with gray colored atoms in chemical reactions and biological systems (Figure 7).

There are considerable efforts to design efficient drugs for the treatment of cancer. On the other hand, the burden of cancer incidence and mortality are rapidly growing across the world. The treatments generally fail with the effect of chemoresistance. Therefore, it is necessary to find novel cytotoxic chemicals that could be effective for the reversal of chemoresistance. In this study, 7S4 is suggested as a putative chemoresistance relieving agent with its affinity to JNK1, pharmacokinetic characteristics, and cytotoxic effects. The idea that 7S4 has an affinity to JNK1 relies on the observations from molecular docking analysis. In this experiment, the affinity of a widely used JNK1 inhibitor, SP600125, and a native ligand of JNK1, the Pyrrolopyrimidine, was compared with 7S4. It was observed that 7S4 has a better affinity than the native ligand but weaker affinity than the canonical JNK1 inhibitor. Thus, 7S4 could be used to develop an ATP-competitive inhibitor of JNK1. The pharmacokinetic characteristics, druglikeness and solubility of 7S4 are also promising to develop a therapeutic agent. Therefore, further experiments that aim to improve the therapeutic benefits of 7S4 could be promising for better therapy of cancer.

Acknowledgment

Authors are also grateful to Prof. Dr. Hülya Sivas, Ayşe Aydoğdu Erdönmez and Dila Ercengiz for their valuable contributions and suggestions.

The authors are thankful to the Anadolu University Scientific Research Projects (Project No. 1509F633 and 20ADP182) for financial support. The authors also grateful to Anadolu University Scientific Research commission for supporting Gaussian 09 (Project No:1102F027) and Gauss View 5.0 (Project

No: 1304F064) programs with the projects. We would like to thank to Anadolu University for providing the opportunity to use the CS ChemBioDraw Ultra 16.0.1.4 for Microsoft Windows program.

Declaration of Ethical Code

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

References

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.*, 71 (3), 209–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Baser, K. H. C. 2003. Inhibition of DNA Synthesis by Carvacrol in Mouse Myoblast Cells Bearing a Human N-RAS Oncogene. *Phytomedicine*, 10 (4), 292–299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/094471103322004785>.
- [3] Demiroglu-Zergeroglu, A., Ergene, E., Ayvali, N., Kuete, V., Sivas, H. 2016. Quercetin and Cisplatin Combined Treatment Altered Cell Cycle and Mitogen Activated Protein Kinase Expressions in Malignant Mesotelioma Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 16 (1), 281. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1267-x>.
- [4] Uysal, U. D., Ercengiz, D., Karaosmanoğlu, O., Berber, B., Sivas, H., Berber, H. 2021. Theoretical and Experimental Electronic Transition Behaviour Study of 2-((4-(Dimethylamino)Benzylidene)Amino)-4-Methylphenol and Its Cytotoxicity. *J. Mol. Struct.*, 1227, 129370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129370>.
- [5] Borges, A. A., de Souza, M. P., da Fonseca, A. C. C., Wermelinger, G. F., Ribeiro, R. C. B., Amaral, A. A. P., de Carvalho, C. J. C., Abreu, L. S., de Queiroz, L. N., de Almeida, E. C. P., Rabelo, V. W., Abreu, P. A., Pontes, B., Ferreira, V. F., da Silva, F. de C., Forezi, L. da S. M., Robbs, B. K. 2022. Chemoselective Synthesis of Mannich Adducts from 1,4-Naphthoquinones and Profile as Autophagic Inducers in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules*, 28 (1), 309. <https://doi.org/10.3390/molecules28010309>.
- [6] Di Micco, S., Di Sarno, V., Rossi, M., Vestuto, V., Konno, T., Novi, S., Tecce, M. F., Napolitano, V., Ciaglia, T., Vitale, A., Gomez-Monterrey, I. M., Bifulco, G., Bertamino, A., Ostacolo, C., Blasi, P., Fasano, A., Campiglia, P., Musella, S. 2022. In Silico Identification and In Vitro Evaluation of New ABCG2 Transporter Inhibitors as Potential Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (1), 725. <https://doi.org/10.3390/ijms24010725>.
- [7] Liu, Z., Zou, H., Dang, Q., Xu, H., Liu, L., Zhang, Y., Lv, J., Li, H., Zhou, Z., Han, X. 2022. Biological and Pharmacological Roles of M6A Modifications in Cancer Drug Resistance. *Mol. Cancer*, 21 (1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01680-z>.
- [8] Bonventre, J. V. 2003. Molecular Response to Cytotoxic Injury: Role of Inflammation, MAP Kinases, and Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Semin. Nephrol.*, 23 (5), 439–448. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0270-9295\(03\)00115-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0270-9295(03)00115-3).
- [9] Lipner, M. B., Peng, X. L., Jin, C., Xu, Y., Gao, Y., East, M. P., Rashid, N. U., Moffitt, R. A., Herrera Loeza, S. G., Morrison, A. B., Goltz, B. T., Vaziri, C., Graves, L. M., Johnson, G. L., Yeh, J. J. 2020. Irreversible JNK1-JUN Inhibition by JNK-IN-8 Sensitizes Pancreatic Cancer to 5-FU/FOLFOX Chemotherapy. *JCI Insight*, 5 (8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129905>.
- [10] Li, F., Meng, L., Zhou, J., Xing, H., Wang, S., Xu, G., Zhu, H., Wang, B., Chen, G., Lu, Y.-P., Ma, D. 2005. Reversing Chemoresistance in Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cells: A Role of c-Jun NH2-Terminal Kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 335 (4), 1070–1077. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.169>.
- [11] Liu, X.-Y., Liu, S.-P., Jiang, J., Zhang, X., Zhang, T. 2016. Inhibition of the JNK Signaling Pathway Increases Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells to Cisplatin by Down-Regulating Expression of P-Glycoprotein. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 20 (6), 1098–1108.
- [12] Shinoda, C., Maruyama, M., Fujishita, T., Dohkan, J., Oda, H., Shinoda, K., Yamada, T., Miyabayashi, K., Hayashi, R., Kawagishi, Y., Fujita, T., Matsui, S., Sugiyama, E., Muraguchi, A., Kobayashi, M. 2005. Doxorubicin Induces Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 in Human Small Cell Lung

- Cancer Cell Lines by the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway. *Int. J. Cancer*, 117 (1), 21–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.21094>.
- [13] Kim, J.-H., Lee, S. C., Ro, J., Kang, H. S., Kim, H. S., Yoon, S. 2010. Jnk Signaling Pathway-Mediated Regulation of Stat3 Activation Is Linked to the Development of Doxorubicin Resistance in Cancer Cell Lines. *Biochem. Pharmacol.*, 79 (3), 373–380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.09.008>.
- [14] Kim, J.-H., Kim, T. H., Kang, H. S., Ro, J., Kim, H. S., Yoon, S. 2009. SP600125, an Inhibitor of Jnk Pathway, Reduces Viability of Relatively Resistant Cancer Cells to Doxorubicin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387 (3), 450–455. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.036>.
- [15] Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., Yang, J., Tan, W. 2015. JNK Is Required for Maintaining the Tumor-Initiating Cell-like Properties of Acquired Chemoresistant Human Cancer Cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 36 (9), 1099–1106. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.58>.
- [16] Zhu, M. M., Tong, J. L., Xu, Q., Nie, F., Xu, X. T., Xiao, S. D., Ran, Z. H. 2012. Increased JNK1 Signaling Pathway Is Responsible for ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Human Colon Cancer. *PLoS One*, 7 (8), e41763.
- [17] Vasilevska, I. A., Selvakumaran, M., Roberts, D., O'Dwyer, P. J. 2016. JNK1 Inhibition Attenuates Hypoxia-Induced Autophagy and Sensitizes to Chemotherapy. *Mol. Cancer Res.*, 14 (8), 753 LP – 763. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0035>.
- [18] Wu, Q., Wu, W., Jacevic, V., Franca, T. C. C., Wang, X., Kuca, K. 2020. Selective Inhibitors for JNK Signalling: A Potential Targeted Therapy in Cancer. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 35 (1), 574–583. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1720013>.
- [19] Roskoski, R. 2019. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors. *Pharmacol. Res.*, 144, 19–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.006>.
- [20] Berhanu, A. L., Gaurav, Mohiuddin, I., Malik, A. K., Aulakh, J. S., Kumar, V., Kim, K.-H. 2019. A Review of the Applications of Schiff Bases as Optical Chemical Sensors. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 116, 74–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.025>.
- [21] Yu, X., Wang, K., Cao, D., Liu, Z., Guan, R., Wu, Q., Xu, Y., Sun, Y., Zhao, X. 2017. A Diethylamino Pyridine Formyl Schiff Base as Selective Recognition Chemosensor for Biological Thiols. *Sensors Actuators B Chem.*, 250, 132–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.147>.
- [22] Kajal, A., Bala, S., Kamboj, S., Sharma, N., Saini, V. 2013. Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore. *J. Catal.*, 2013, 893512. <https://doi.org/10.1155/2013/893512>.
- [23] Sıdır, İ., Sıdır, Y. G., Berber, H., Demiray, F. 2019. Electronic Structure and Optical Properties of Schiff Base Hydrazone Derivatives by Solution Technique for Optoelectronic Devices: Synthesis, Experiment and Quantum Chemical Investigation. *J. Mol. Struct.*, 1176, 31–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.067>.
- [24] Sıdır, Y. G., Aslan, C., Berber, H., Sıdır, İ. 2019. The Electronic Structure, Solvatochromism, and Electric Dipole Moments of New Schiff Base Derivatives Using Absorbance and Fluorescence Spectra. *Struct. Chem.*, 30 (3), 835–851. <https://doi.org/10.1007/s11224-018-1228-8>.
- [25] Sıdır, Y. G., Pirbudak, G., Berber, H., Sıdır, İ. 2017. Study on the Electronic and Photophysical Properties of the Substitute-((2-Phenoxybenzylidene)Amino)Phenol Derivatives: Synthesis, Solvatochromism, Electric Dipole Moments and DFT Calculations. *J. Mol. Liq.*, 242, 1096–1110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.070>.
- [26] Gowda, A., Roy, A., Kumar, S. 2017. Synthesis and Mesomorphic Properties of Novel Schiff Base Liquid Crystalline EDOT Derivatives. *J. Mol. Liq.*, 225, 840–847. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.010>.
- [27] Kausar, N., Muratza, S., Raza, M. A., Rafique, H., Arshad, M. N., Altaf, A. A., Asiri, A. M., Shafqat, S. S., Shafqat, S. R. 2019. Sulfonamide Hybrid Schiff Bases of Anthranilic Acid: Synthesis, Characterization and Their Biological Potential. *J. Mol. Struct.*, 1185, 8–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.056>.
- [28] Ünver, H., Boyacıoğlu, B., Zeyrek, C. T., Yıldız, M., Demir, N., Yıldırım, N., Karaosmanoğlu, O., Sivas, H., Elmali, A. 2016. Synthesis, Spectral and Quantum Chemical Studies and Use of (E)-3-[(3,5-Bis(Trifluoromethyl)Phenylimino)Methyl]Benzene-1,2-Diol and Its Ni(II) and Cu(II) Complexes as an Anion

- Sensor, DNA Binding, DNA Cleavage, Anti-Microbial, Anti-Mutagenic and Anti-Canc. *J. Mol. Struct.*, 1125. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.06.058>.
- [29] Judith Percino, M., Cerón, M., Castro, M. E., Ramírez, R., Soriano, G., Chapela, V. M. 2015. (E)-2-[(2-Hydroxybenzylidene)Amino]Phenylarsonic Acid Schiff Base: Synthesis, Characterization and Theoretical Studies. *J. Mol. Struct.*, 1081, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.10.030>.
- [30] Alpaslan, G., Boyacioglu, B., Demir, N., Tümer, Y., Yapar, G., Yıldırım, N., Yıldız, M., Ünver, H. 2019. Synthesis, Characterization, Biological Activity and Theoretical Studies of a 2-Amino-6-Methoxybenzothiazole-Based Fluorescent Schiff Base. *J. Mol. Struct.*, 1180, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.11.065>.
- [31] Cunha Almeida, T., Gonzaga Ribeiro, L. H., Ferreira dos Santos, L. B., da Silva, C. M., Tupinambá Branquinho, R., de Lana, M., Ramos Gadelha, F., de Fátima, Â. 2018. Synthesis, in Vitro and in Vivo Anti-Trypanosoma Cruzi and Toxicological Activities of Nitroaromatic Schiff Bases. *Biomed. Pharmacother.*, 108, 1703–1711. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.176>.
- [32] Saadaoui, I., Krichen, F., Ben Salah, B., Ben Mansour, R., Miled, N., Bougatef, A., Kossentini, M. 2019. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Schiff Bases of 4-Amino-1,2,4-Triazole Derivatives as Potent Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Antioxidant Activities. *J. Mol. Struct.*, 1180, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.12.008>.
- [33] Zaltariov, M.-F., Avadanei, M., Balan, M., Peptanariu, D., Vornicu, N., Shova, S. 2019. Synthesis, Structural Characterization and Biological Studies of New Schiff Bases Containing Trimethylsilyl Groups. *J. Mol. Struct.*, 1175, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.019>.
- [34] Al-Shemary, R. K. R., Al-khazraji, A. M. A., Niseaf, A. N. 2016. Preparation, Spectroscopic Study of Schiff Base Ligand Complexes with Some Metal Ions and Evaluation of Antibacterial Activity. *Pharma Innov. J.*, 5, 81–86.
- [35] Heo, Y.-S., Kim, S.-K., Seo, C. II, Kim, Y. K., Sung, B.-J., Lee, H. S., Lee, J. II, Park, S.-Y., Kim, J. H., Hwang, K. Y., Hyun, Y.-L., Jeon, Y. H., Ro, S., Cho, J. M., Lee, T. G., Yang, C.-H. 2004. Structural Basis for the Selective Inhibition of JNK1 by the Scaffolding Protein JIP1 and SP600125. *EMBO J.*, 23 (11), 2185–2195. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600212>.
- [36] Chamberlain, S. D., Redman, A. M., Wilson, J. W., Deanda, F., Shotwell, J. B., Gerding, R., Lei, H., Yang, B., Stevens, K. L., Hassell, A. M., Shewchuk, L. M., Leesnitzer, M. A., Smith, J. L., Sabbatini, P., Atkins, C., Groy, A., Rowand, J. L., Kumar, R., Mook, R. A., Moorthy, G., Patnaik, S. 2009. Optimization of 4,6-Bis-Anilino-1H-Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine IGF-1R Tyrosine Kinase Inhibitors towards JNK Selectivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19 (2), 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.077>.
- [37] Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O’Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., Anderson, D. W. 2001. SP600125, an Anthrapyrazolone Inhibitor of Jun N-Terminal Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98 (24), 13681–13686. <https://doi.org/10.1073/pnas.251194298>.
- [38] Li, P., Zhao, Q.-L., Rehman, M., Jawaid, P., Cui, Z.-G., Ahmed, K., Kondo, T., Saitoh, J.-I., Noguchi, K. 2023. Isofraxidin Enhances Hyperthermia-induced Apoptosis via Redox Modification in Acute Monocytic Leukemia U937 Cells. *Mol. Med. Rep.*, 27 (2), 41. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12928>.
- [39] Yuan, M.-K., Kao, J.-W., Wu, W.-T., Chen, C.-R., Chang, C.-I., Wu, Y.-J. 2022. Investigation of Cell Cytotoxic Activity and Molecular Mechanism of 5 β ,19-Epoxycucurbita-6,23(E)-Diene-3 β ,19(R),25-Triol Isolated from *Momordica Charantia* on Hepatoma Cells. *Pharm. Biol.*, 60 (1), 1214–1223. <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2077766>.
- [40] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. Gaussian 09 Revision A.2. 2009.
- [41] Dennington, R., Keith, T., Millam, J. GaussView. Semichem Inc.: Shawnee Mission, KS 2009.

- [42] CS ChemBioDraw Ultra 16.0.1.4 for Microsoft Windows.
- [43] MarvinSketch 19.27.0.
- [44] Kuete, V., Ngnintedo, D., Fotso, G. W., Karaosmanoğlu, O., Ngadjui, B. T., Keumedjio, F., Yeboah, S. O., Andrae-Marobela, K., Sivas, H. 2018. Cytotoxicity of Seputhecarpan D, Thonningiol and 12 Other Phytochemicals from African Flora towards Human Carcinoma Cells. *BMC Complement. Altern. Med.*, 18 (1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2109-9>.
- [45] Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. 2017. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.*, 7 (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [46] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30 (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [47] Trott, O., Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.*, 31 (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [48] L DeLano, W. 2002. Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool. *{CCP4} Newsl. Protein Crystallogr.*, 40, 82–92.

Yoğun Bakımda Çalışan Hemşirelerin Yaşlı Ayrımcılığı ile İlgili Görüşlerinin İncelenmesi

Examination of the Opinions of Nurses' Working in Intensive Care About Ageism

Sıddıka ERSOY¹ , Sultan PALANTÖKEN^{1*} 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z

Amaç: Bu çalışma, yaşlı bakımında etkin rol oynayan sağlık bakım profesyonelleri olan yoğun bakım hemşirelerinin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumlarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal-Metot: Yoğun bakım üniteleri hemşirelerin ve yaşlı bireylerin bir arada olduğu önemli alanlardan biridir. Araştırmanın evrenini Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde çalışan hemşireler (N=149); örneklem grubunu ise çalışmaya katılmayı kabul eden ve katılma şartlarını karşılayan 136 hemşire oluşturmuştur. Araştırmanın verileri, araştırmacılar tarafından hazırlanan sosyodemografik veri formu ve Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği (PNYAÖ) kullanılarak toplandı.

Bulgular: Yoğun bakım üniteleri hemşirelerin ve yaşlı bireylerin bir arada olduğu önemli alanlardan biridir. Araştırmanın evrenini Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde çalışan hemşireler (N=149); örneklem grubunu ise çalışmaya katılmayı kabul eden ve katılma şartlarını karşılayan 136 hemşire oluşturmuştur. Araştırmanın verileri, araştırmacılar tarafından hazırlanan sosyodemografik veri formu ve Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği (PNYAÖ) kullanılarak toplandı. Katılımcı hemşirelerin PYA tutum puanı $42,76 \pm 5,32$ iken NYA tutum puanı $24,18 \pm 6,47$ olarak bulunmuştur. Bu veriye dayanarak; çalışmadaki katılımcı profesyonel sağlık ekibinin üyesi olan hemşirelerin yaşlı ilerlemiş bireylere yönelik tutumlarının olumlu olduğu ifade edilebilir.

Sonuç: Yaşlılara yönelik olumlu tutumların geliştirilmesine yönelik bireysel ve kurumsal stratejilerin planlanıp uygulamaya aktif olarak dahil edilmesi önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Yaşlı ayrımcılığı, yoğun bakım, hemşire

Alınış / Received: 13.07.2023 Kabul / Accepted: 03.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Objective: This study aims to investigate the attitudes of intensive care nurses, who play an active role in elderly care, towards ageism.

Materials and Methods: Intensive care units are important settings where nurses and older individuals coexist. The study population consisted of nurses (N=149) working in the Intensive Care Units of Başakşehir Çam ve Sakura City Hospital, and the sample group comprised 136 nurses who agreed to participate and met the inclusion criteria. Data were collected using a socio-demographic questionnaire and the Positive and Negative Ageism Scale (PNAS). The mean attitude score towards positive ageism (PAS) was found to be 42.76 ± 5.32 , while the mean attitude score towards negative ageism (NAS) was 24.18 ± 6.47 . Based on these data, it can be stated that the participating nurses exhibited positive attitudes towards older adults.

Results: Intensive care units are important settings where nurses and older individuals coexist. The study population consisted of nurses (N=149) working in the Intensive Care Units of Başakşehir Çam ve Sakura City Hospital, and the sample group comprised 136 nurses who agreed to participate and met the inclusion criteria. Data were collected using a socio-demographic questionnaire and the Positive and Negative Ageism Scale (PNAS). The mean attitude score towards positive ageism (PAS) was found to be 42.76 ± 5.32 , while the mean attitude score towards negative ageism (NAS) was 24.18 ± 6.47 . Based on these data, it can be stated that the participating nurses exhibited positive attitudes towards older adults.

Conclusion: Individual and organizational strategies should be planned and actively implemented to enhance the development of positive attitudes towards older adults.

Keywords: Ageism, intensive care, nurse



1. Giriş

Yaşlanma tüm canlılarda ortaya çıkan, fonksiyonlarda gerilemeye neden olan, kalıtsal ve çevresel faktörlerden etkilenen ve döllenmeden başlayıp yaşamın sonuna kadar devam eden bir süreçtir [1, 2]. Tıp alanındaki gelişmeler, ilerleyen teknoloji, erken tanı ve tedavi yöntemlerinin uygulanması, koruyucu sağlık bakımlarındaki ilerlemeler [3] ile yaşam kalitesinin değişmesi, doğurganlık oranının azalmasına bağlı olarak toplumların giderek yaşlanmasına yani yaşlı nüfusunda artışa neden olmuştur [4, 5]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün son tanımlamalarına göre yaşlılık dönemi "65 yaş ve üzeri" olarak adlandırılmaktadır. Tüm dünyada ve hatta ülkemizde yaşlı birey sayısı her geçen gün artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya nüfusunun %11'i 60 yaşın üzerindedir ve bu sayının 2050 yılına kadar yaklaşık 2 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [6]. Bu duruma paralel olarak Türkiye'nin nüfusu da hızla yaşlanmaktadır. 2019 yılında 65 yaş ve üstü kişilerin Japonya'nın toplam nüfusu içindeki oranı %9,1 iken, 2050 yılında bu oranın %20,8'e ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca TÜİK verilerine göre 2019-2021 hayat tabloları incelendiğinde beklenen yaşam süresi 77,7 yıl olarak belirlenmiştir [7]. Ortalama yaşam süresinin artmasına ek olarak yaşlılık, sağlık, güvenlik, eğitim, iş olanakları, kültürel faaliyetler, aile ve yasal alanların hepsini tüm yönleri ile etkilemektedir [8]. Yaşlı nüfusun artışı ile birlikte toplumlar da yaşlılar için barınma, yeterli gelir elde etme, sağlık harcamalarının karşılanması ve iş olanakları gibi konularda sorunlar yaşamaya başlamaktadır [9]. Nüfusun yaşlanması, halk sağlığı ve refah sistemleri üzerinde doğrudan etkileri olan, gelişmiş toplumların karşı karşıya olduğu en zor sorunlardan biridir. Hızla artan yaşlı nüfus, sağlık hizmetlerine erişimde, sağlıkla ilgili masrafların ödenmesinde, sosyal güvenlik kurumlarının örgütlenmesinde, hizmet ihtiyaçlarının ve istihdam olanaklarının karşılanmasında zorluklar yaratmaktadır. Ayrıca ailelerin küçülmesi, tüketim çılgınlığı, uzun ömürlülüğe bağlı kronik hastalıklar ve sanayileşmenin etkisiyle artan bakım ihtiyacı yaşlılarda aile

bağlarının zayıflamasına ve yaşlanmaya bağlı sorunların ortaya çıkmasına neden olmuştur [10, 11, 12]. Genellikle bireyler yaşlandıkça güç ve verimin azalması, artan sağlık sorunları nedeniyle yaşadıkları toplumlar tarafından bağımlı ve topluma yük olarak değerlendirilmektedirler [13,14]. Yaşlıların sağlığını korumak ve geliştirmek için tıbbi ve kurumsal hizmetlerin etkin bir şekilde uygulanabilmesi için bu alanlarda çalışan tüm sağlık çalışanlarının önyargıları, tutumları, değerleri ve inançları değerlendirilmelidir [15]. Bunun nedeni, sağlık bakım sistemlerinin ve sağlık çalışanlarının tutumlarının yaş gruplarına göre farklılık göstermesi ve yaşlı insanlara yönelik bu tutumların ağırlıklı olarak olumsuz özellikler göstermesidir [13]. Tüm bunların sonucunda toplumun yaşlanmaya bakış açısı değişiyor. Bakış açısındaki değişiklikler, yaşlıları ilgilendiren tüm süreçlerde tutum ve davranışlara yansır [9]. Bu konulardan biri de yaş ayrımcılığıdır [10, 12, 15]. Yaş ayrımcılığı genellikle sağlık hizmetlerinde, sosyal yaşamda ve ailede ortaya çıkar [9,10,16].

Yaşlılık/yaş ayrımcılığı, ilk kez 1969 yılında Robert Butler tarafından tanımlanmıştır. Bir kişinin sadece yaşı nedeniyle sergilediği olumsuz davranışlar, ön yargılar, farklı tutum ve davranışlara atıfta bulunan çok özel bir terimdir [10, 17]. Bu, yalnızca yaşları, önyargıları, tutumları ve davranışları nedeniyle insanlara karşı farklı tutumları ifade eden hem olumlu hem de olumsuz tutumları içerir. Olumlu davranış; merhamet, bilgelik, güvenilirlik, siyasi güç, özgürlük, mutluluk gibi unsurları kapsarken, olumsuz tutumlar ise hastalık, iktidarsızlık, çirkinlik, zihinsel gerileme, delilik, işe yaramazlık, izolasyon, yoksulluk ve depresyon gibi yönleri içerir [18]. Toplumun sosyo-kültürel yapısı, tutum ve davranışlardaki değişimler, bireysel ve toplumsal yaşlanmaya bakış açılarının yaşlılara sunulan hizmetlere yansması, geriatri bakımını birçok klinik alanda sağlık açısından cazip hale getirmektedir. Ancak hala alanla ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır [10, 15, 16]. Sağlık çalışanlarının yaşlılara yönelik tutumları, toplumun yaşlılara ve yaşlanmaya yönelik tutumları kadar önemlidir. Yaşam beklentisinin artması, kronik hastalıkların tedavisi, sağlık hizmetlerine erişimin artması ve toplumlarda eğitim seviyesinin yükselmesi ile yaşlıların sağlık hizmetlerinden yararlanma oranları artmaktadır [14, 16, 17,19]. Bununla birlikte sağlık çalışanları tarafından yaşlılar, sağlık yardımı verenlerden yeterli bakım almadıkları için, hizmetlerde tercih edilen grup gençler olduğu için, bilgi toplanmadığı için ve aşağıdaki nedenlerle ayrımcılığa uğrayabilirler. İleri yaşlarda, gençlere kıyasla hastalık tedavisinin ihmal edilmesi ile ilişkilendirilmektedir [20, 21, 22]. Sağlık çalışanlarının yaşlı insanlara karşı tutumları, yaşlı insanlara nasıl davranıldığını etkileyen temel faktörlerden biridir [2]. Sağlık çalışanlarında toplumdaki yaşlıların sağlık sorunlarının normal yaşlanma sürecinin bir parçası olduğu düşüncesini hakim olabilmekte ve bu durum yaşlıların etkisiz tedavi edilmesiyle sonuçlanabilmektedir [23].

Bakımda önemli role sahip olan hemşireler yaşlı insanlarla pek çok alanda etkileşim halinde olduklarından, onların sağlık ihtiyaçlarının değerlendirilmesi ve planlanmasında ve ayrıca sağlıklarının sürdürülmesinde ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynarlar. Yoğun bakım üniteleri, bakım verenler ve yaşlılar için en önemli birliktelik alanlarından biridir. Tıp alanında hemşirelerin yaşlanmaya ve yaşlı bakımına yönelik tutumları geniş çapta tartışılrsa da, bu çalışmalar genel olarak hemşirelik öğrencileri ve genel hemşirelik alanı düşünülerek yapılmıştır. Naldan, Kara ve ark. araştırması yoğun bakımda çalışan sağlık çalışanları ile yapılmış ancak özel bir grup olan yoğun bakımda çalışan hemşireler ile çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma, yaşlı bakımda etkin rol oynayan sağlık bakım profesyonelleri olan yoğun bakım hemşirelerinin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumlarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Tanımlayıcı nitelikteki araştırmanın verileri 15.12.2021 tarihinden itibaren 1 aylık süre içinde toplanmıştır. Araştırmanın evrenini Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde çalışan hemşireler oluşturmaktadır (N=149). Evren içinde çalışmaya katılmayı kabul eden ve katılma şartlarını karşılayan 136 hemşire örneklem grubunu oluşturmuştur. Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen, çalışmanın yapıldığı tarihlerde izin, rapor, vb. nedenlerle ulaşılamayan ve anketin tamamını doldurmayanlar çalışma dışında bırakıldı. Araştırmanın verileri, araştırmacılar tarafından hazırlanan sosyodemografik veri formu ve Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği (PNYAÖ) kullanılarak toplandı.

Sosyodemografik Veri Formu; Araştırmacılar tarafından hazırlanan formda hemşirelerin sosyodemografik özelliklerinin (yaş, cinsiyet, medeni durum gibi) yanı sıra; çalışılan klinik (çalıştığı klinik, klinikteki yaşlı hasta oranı) ile ilgili sorular bulunmaktadır.

Pozitif ve Negatif Yaş Ayrımcılığı Ölçeği (PNYAÖ): Bu çalışmada yaş ayrımcılığını değerlendirmeye yardımcı olması için Yurttaş ve Sarıkoca'nın Geçerlik ve Güvenilirliğini yaptığı (2018) [17], iki alt boyutu

olan Pozitif ve Negatif Yaş Ayrımcılığı Ölçeği' (PNYAÖ) seçilmiştir. Ölçekte 23 farklı terim bulunmakta ve ölçekteki her soruya 1'den 5'e kadar likert derecelendirmesi verilmektedir. Ölçeğin genel Cronbach alfa katsayısı (0.801) ölçeğin oldukça güvenilir olduğunu göstermektedir. Yapısal geçerlik çalışmasında iki faktörlü bir ölçek olarak belirlenmiştir. Analizden elde edilen bulgular (0,062 RMSEA, 0,90 NNFI ve 0,91 CFI) alt faktörler ve ölçekler arasında iyi bir uyum olduğunu göstermektedir. Bu ölçeğin uygulaması için alabileceğiniz en yüksek puan 65, en düşük puan ise 13'tür. Toplam puana göre elde edilebilecek yüksek puan, yaşlılara yönelik olumlu tutumun yüksek olduğunu göstermektedir. Olumsuz alt sorular, artan puanlarla (10'dan 50'ye) ters olarak puanlanmakta ve yaşlı yetişkinlere karşı daha az olumsuz tutum olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda istatistiksel analiz SPSS 29.0 programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov Z testi ile belirlendi. Veriler normal dağıldığı için analiz için parametrik testler kullanıldı. İki sürekli değişken grubunu karşılaştırmak için Student t testi kullanıldı ve iki veya daha fazla grubu karşılaştırmak için çok yönlü ANOVA kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık kabul edildi.

Çalışmanın yapılabilmesi Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan klinik araştırmalar için izin alınmıştır. (Sayı: 2021.11.265). Ayrıca çalışmanın yapılacağı kurumdan yazılı onam ve çalışmaya dahil edilen hemşirelerden de bilgilendirilmiş onam alınarak çalışma tamamlandı.

3. Bulgular

Çalışmada toplanan veriler değerlendirilmiş, sosyodemografik veriler göre elde edilen bulgular tablo halinde sunulmuştur (Tablo 1).

Buna göre katılımcıların ortalama $26,45 \pm 3,11$ yaşında olduğu ve $2,40 \pm 1,20$ yıldır çalışmakta oldukları görülmektedir. Yüzdeler olarak incelendiğinde çoğunluğu kadın (%56,60), bekar (%69,10) gelir- gideri eşit (%56,60), büyük şehirde yaşamakta (%71,30), çalışma süresi 2 yıl (%39,70), çalışma yeri genel yoğun bakım (%47,80) olarak bulunmuştur. Tabloda yer verilmemiş olmakla birlikte çalışmaya dahil olan hemşirelerin tamamı lisans eğitimini tamamlamıştır. Kullanılan yaşlı ayrımcılığı ölçeği ile çalışmaya katılan hemşirelerin PYA ve NYA tutum puanları değerlendirilmiş (Tablo 2) ve PYA tutum puanı $42,76 \pm 5,32$ iken NYA tutum puanı $24,18 \pm 6,47$ olarak bulunmuştur.

Tablo 1:Sosyo-Demografik Özellikler

Değişkenler		Min-Max	Ort± SS
Yaş		20-42	26,45±3,11
Değişkenler		n	%
Cinsiyet	Kadın	77	56,60
	Erkek	59	43,40
Medeni durum	Bekar	94	69,10
	Evli	42	30,90
Aile yapısı	Çekirdek	107	78,70
	Geniş	29	21,30
Gelir Düzeyi	Gelirim giderimden az	44	32,40
	Gelirim giderime denk	77	56,60
	Gelirim giderimden fazla	15	11,00
Yaşanılan yerleşim birimi	Büyükşehir	97	71,30
	Şehir	21	15,40
	Köy / Kasaba	18	13,20
Çalışılan Süre (Yıl)	1 yıl	32	23,50
	2 yıl	54	39,70
	3 yıl	25	18,40

	4 yıl	13	9,60
	5 ve üzeri	12	8,80
Hasta profili	Yaşlılar yarısından az	28	20,60
	En az yarısı yaşlı	35	25,70
	Yarıdan fazlası yaşlı	73	53,70
Çalışılan birim	Genel yoğun bakım	65	47,80
	Koroner yoğun bakım	17	12,50
	Nakil yoğun bakım	19	14,00
	Post-op yoğun bakım	7	5,10
	KVC yoğun bakım	10	7,40
	Pandemi yoğun bakım	8	5,90
	Nöroloji yoğun bakım	10	7,40

Tablo 2: Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği Toplam Puanları

Değişkenler	Min-Max	Ort± SS	Cronbach Alfa
PYA toplam puanı	24-57	42,76±5,32	0,499
NYA toplam puanı	11-39	24,18±6,47	

Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği toplam puanları ankete katılan hemşirelerin sosyo-demografik özellikleri ile karşılaştırılmıştır (Tablo 3). Bu karşılaştırmanın sonuçlarına göre cinsiyet, aile tipi, çalışılan süre ve çalışılan birim ile NYA tutum puanları arasında anlamlı istatistiksel ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 3. Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği Toplam Puanlarının Hemşirelerin Sosyo-Demografik Özellikleri Karşılaştırılması (N=137)

Değişkenler		Pozitif Yaşlı Ayrımcılığı Toplam Puan		Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Toplam Puan	
		Min-Max	Ort±SS	Min-Max	Ort±SS
Cinsiyet	Kadın	33-57	43,71±4,92	11-36	22,50±5,73
	Erkek	24-55	41,52±5,60	14-39	26,37±6,76
		$p= 0,017$	$t = 2,418$	$p= 0,000$ 3,602	$t = -$
Medeni durum	Bekar	24-57	42,75±5,62	11-36	23,50±6,08
	Evli	34-54	42,78±4,66	15-39	25,71±7,10
		$p= 0,976$	$t = -0,031$	$p= 0,065$ 1,860	$t = -$
Aile tipi	Çekirdek	24-57	42,96±5,57	11-39	23,49±6,02
	Geniş	39-50	42,03±4,31	10-39	26,72±7,49
		$p= 0,407$	$t = 0,832$	$p= 0,017$ 2,425	$t = -$
Gelir Düzeyi	Gelir giderden az	33-47	40,80±4,36	15-36	25,80±6,95
	Gelir gidere denk	24-55	42,62±5,30	11-39	23,18±6,31
	Gelir giderden fazla	32-57	43,68±5,56	14-36	25,38±6,40
		$p= 0,183$	$F= 1,719$	$p=0,116$ 2,187	$F=$
Yaşanılan yerleşim birimi	Büyükşehir	24-57	42,61±5,65	11-36	23,59±6,06
	Şehir	37-52	44,14±3,75	15-39	24,66±7,20

	Kasaba/köy	36-55	41,94±4,96	15-36	26,77±7,38
		p= 0,388	F = 0,953	p= 0,150 1,927	F=
Çalışılan Süre (Yıl)	1 yıl	24-48	41,84±5,04	16-35	25,43±6,12
	2 yıl	31-55	42,61±5,48	14-39	25,09±6,72
	3 yıl	33-57	43,68±5,69	11-33	20,64±5,85
	4 yıl	38-50	43,00±3,89	16-34	24,30±6,58
	5 ve üzeri	32-52	43,75±6,18	17-36	23,25±5,44
			p=0,709	F =0,537	p=0,034
Meslekte Çalışılan Alan	Genel yoğun bakım	35-57	43,87±5,06	14-35	23,89±5,91
	Koroner yoğun bakım	31-53	40,82±5,86	11-39	28,00±7,98
	Nakil yoğun bakım	36-48	42,36±3,71	15-34	23,42±5,74
	Postop yoğun bakım	38-51	43,14±4,67	16-32	20,71±6,77
	KVC yoğun bakım	24-55	40,90±8,19	16-34	26,00±6,61
	Pandemi yoğun bakım	33-50	41,62±5,85	14-28	19,75±4,89
	Nöroloji yoğun bakım	34-47	42,10±4,86	14-34	25,20±6,77
			p= 0,325	F = 1,173	p= 0,037 F=2,311

4. Tartışma ve Sonuç

Hemşirelerin geriatrik yaş grubundaki hastalara yönelik tutumları ve bunları etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla yapmış olduğumuz çalışmamızın bulguları yorumlandığında, hemşirelerin yaşlıya yönelik tutumlarının genel manada olumlu olduğu ifade edilebilir. Pozitif tutum puanı değerlendirildiğinde yalnızca cinsiyet açısından (kadınlar) anlamlı istatistiksel farklılık gözlenmiş olup diğer parametrelerin yaşlıya yönelik pozitif ayrımcılık puanı üzerine istatistiksel anlamlı etkisinin olmadığını göstermektedir. Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Toplam Puanların sosyodemografik verilerden etkilenme durumları incelendiğinde ise; erkeklerde, geniş aileye sahip olanlarda, evlilerde, koroner yoğun bakımda çalışanlarda Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Toplam Puanı daha yüksek bulunmuştur. Ek olarak 3 yıldır hemşire olarak çalışanlar ve pandemi yoğun bakımda çalışanlarda ise Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Toplam Puanı daha düşük bulunmuştur. Çalışan tüm hemşirelerin en az lisans mezunu olması nedeni ile eğitim düzeyinin yaşlı ayrımcılığına etkisi değerlendirilememiştir.

Sağlık çalışanlarının yaşlanan nüfus hakkındaki tutumları, özellikle davranışları, etkileşimleri ve sağlık hizmetleri ve diğer hizmetler sunmaları açısından yaşlı insanlara sundukları tedaviyi etkileyebilir [24]. Bundan dolayı, yaş ayrımcılığının incelenmesi önemlidir, çünkü olumsuz bir tutum tanının tedavisini ve daha sonra yaşlı hastanın tedavisini etkileyebilir. Birçok anormal hastalık sürecini yaşlanmanın normal bir parçası olarak reddetme eğilimi literatürde sıkça tanımlanmıştır. Buna ek olarak, hemşirelerin tutumları yaşlı insanlarla çalışma tercihini ve onlara sunulan bakım kalitesini etkilemektedir [24, 25, 26].

Günümüzde yaşlı bakım hizmetlerinin kalitesinin iyileştirilmesi konusu ve buna yönelik yaklaşımlar gündemi meşgul etmektedir [27]. Bu konuların önceliğini sağlık hizmetlerinin sunumunda yaşlılara yönelik tutum gelmektedir [28, 29]. Genel olarak yaşlılar, sağlık bakım desteği veren kurumlar ve sağlık personelleri tarafından "yatak işgal eden, hastanede uzun süre kalmayı gerektiren, hastane ve bakım etkinliğini azaltan" bir grup olarak tanımlanmakta, sağlık kurumlarının ve sağlık personelinin onları tedavi edememesi nedeniyle de sağlık sisteminin başarısızlığı olarak tanımlanmaktadır [27, 30]. Sağlık profesyonellerine göre, bu dönemde ortaya çıkan hastalıklar yaşa bağlı ortaya çıkan hastalıklar olarak kabul edilebilir ve bu nedenle yaşlı bakımı ile ilgilenmek onlar için "alt sınıf- düşük statülü" bir meslek olarak kabul edilir [31].

Sağlık profesyonelleri ekibinde yer alan hemşirelerin temel amaçlarından biri bireysel, ailevi ve toplumsal ihtiyaçlar konusunda eğitim ve danışmanlık hizmeti vermektir [2]. Sağlık bakım hizmeti sağlayıcıları, yaşlı insanlardaki kronik sorunları ele almaktansa gençlerdeki akut sağlık sorunlarına odaklanmayı tercih edebilir. Yapılan çalışmalarda sağlık çalışanlarında özellikle hemşireler için yaşlı bakımı, beceri düzeyi, palyatif bakım ve yaşlılarda ağrı yönetimi gibi temel konular ve etik anlayış hakkında daha geniş eğitimin gerekliliği ortaya konulmuştur [5]. Sağlık personellerine yeterli seviyede geriatrik eğitim verilmemesi, klinik bakımda eşitsizliklere yol açabilecek bir unsurdur. bunun nedeni sağlık çalışanlarının yaşlı insanların özel bakım gereksinimleri hakkında çok az bilgiye sahip olmalarıdır [32]. Bir diğer çalışmanın sonuçlarında, Türkiye’de yaşlılara yönelik tutumlarda kültürel, dini ve sosyal değerlerin önemli bir belirleyici olduğu ve bu faktörlerin yaşlılara yönelik tutumu eğitimden daha fazla etkilediği ortaya konulmuştur [33]. Bizim çalışmamızda hemşirelerin tamamının lisans mezunu olması nedeni ile eğitim düzeyi farklılığının yaşlı ayrımcılığına etkisi net olarak ortaya konulamamıştır. Yapılacak diğer çalışmalar için; hemşirelik lisans eğitimi süresince yaşlı bakımına dair ders alıp almadıkları sorusu sosyodemografik veri formuna eklenebilir.

İranda yapılan niteliksel bir çalışmanın sonuçlarında yoğun bakımlarda yaşlılarla ilgili kararların alınmasında ahlaki ikilemleri ve manevi sıkıntıları çok fazla yaşadıkları vurgulanmıştır [11, 30]. Hemşirelerin ahlaki duyarlılığını geliştirmenin, hemşirelerde yaşlı ayrımcılığını önlemek ve bunlarla mücadele etmek için umut verici yeni bir yol olabileceğini vurgulamıştır. Bakımla ilgili stres, yaşlı ayrımcılığına ve istismara yol açabilecek diğer bir faktördür. Huzurevleri gibi bakım hizmetlerinin verildiği kurumlarda yaşlı istismarı evde olduğundan daha yaygındır [10, 34]. Çalışmamızdaki soruların içeriği üzerinden değerlendirdiğimizde bizde yoğun bakım ünitelerinde iş yükünün fazlalığı, personel sayısının azlığı gibi birçok sebebin yaşlı ayrımcılığını tetikleyebileceğini, ancak ahlaki duyarlılıkla ilgili yapılacak eğitimlerin bu konuda destekleyici olabileceğini düşündük. Çalışılan birimlerdeki negatif tutum puanının koroner yoğun bakımda en yüksek ve pandemi yoğun bakımda en düşük olarak bulunması; çalışılan yoğun bakımlarda hastanın iyileşme beklentisindeki artışın da pozitif ayrımcılığı artırabileceğini görüşünü destekleyen bir veridir.

Yapılan çalışmaların çoğunda hem hemşireler hem de hemşirelik öğrencilerinin, yaşlı yetişkinlerin bakımında görev almayı tercih etmemekle birlikte; yaşlıya yönelik olumlu tutumlar ve pozitif ayrımcılık bildirirken, yaşlı bakımına yönelik yanılgıları da bulunmaktadır. Bu odak temelinde yaşlı bireylere yönelik olumlu tutumları teşvik edecek stratejiler aktif olarak planlanmalı ve uygulanmalıdır (gerontoloji eğitimi, bakım veren hemşirelerin yaşlanma konusundaki şahsi görüşlerinin değerlendirilmesi, eğitimciler ve uygulama alanlarında görev alan rol modellerin olumlu tutumları destekler tutum sergilemesi, işe yeni başlayan hemşirelere ve öğrencilere yaşlı bireylerle çalışabilme imkanlarının sağlanarak etkin öğrenme deneyiminin sunulması, planlı araştırmaların yürütülmesi)[15, 24, 29, 35].

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde hasta bakımından birinci derecede sorumlu olan hemşirelerin yaşlılara karşı olumlu tutumları olmasına rağmen, bilgi, beceri, deneyim eksikliklerinin yaşlı bireylere bakım vermelerini zorlaştırdığı unutulmamalıdır. Bu noktada bizi net olarak karşılayan temel sonuç bakım ihtiyacı olan yaşlılara etkin gerontolojik değerlendirmeyi ve uygulamalarını içeren geniş ölçekli bir eğitimin planlanıp hemşirelere verilmesi gerekliliğidir. Ayrıca kurumlardaki yönetim anlayışı ve personel yetersizliği gibi nedenlerle hastanelerde geriatrik bireyler için ayrı bir geriatri kliniğinin bulunmamasının, yaşlı hastalarda sunulan bakım sırasında zaman yetersizliğine yol açtığı ve bakım vermeyi olumsuz etkilediği saptanmıştır [29].

Etik Beyanı

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

Kaynakça

1. [Göçer Ş. 2012. Hacılar ilçe merkezinde yaşlılarla yaşayan bireylerin yaşlılık ve yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri, 2012.]

2. [Vefikuluçay D. 2008. Üniversitede öğrenim gören öğrencilerin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumları. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Kadın Hastalıkları Hemşireliği Programı, Ankara, 2008]
3. [Güven ŞD, Muz GU, Ertük NE. 2012. Üniversite öğrencilerinin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumları ve bu tutumların bazı değişkenlerle ilişkisi. Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi 15(2); 99-105.
4. [Sevil Ü, Bayram Değer V. 2019. Geriatriye Disipliner Arası Yaklaşım. Güven Plus Grup A.Ş. Yayınları: Aralık 35 / 2019 İstanbul]
5. [Rees j, King L, Schmitz K. 2009. Nurses' perceptions of ethical issues in the care of older people Nurs Ethics.16(4); 436-52.]
6. [Öztürk Başol, R. 2019. The Appearance of Elderly Population in Turkey and EU Countries. KOSBED, 37; 35 – 46.]
7. [www.tuik.gov.tr. 2023. Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni. Sayı:45592. 26. nisan 2023. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayat-Tablolari-2019-2021-45592>]
8. [Komşu UC. 2014. Yaşlılık, yaşlı nüfusun sorunları ve yetişkin eğitimi, Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi, 2(1);370-89.]
9. [Bulut E, Çilingir D, Hintistan S. 2017. Hemşirelik Bölümü Öğrencilerinin Yaşlı Ayrımcılığına İlişkin Tutumları. Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi, 10(3); 137-143.]
10. [Akdemir N, Çınar Fİ, Görgülü Ü. 2007.Yaşlılığın algılanması ve yaşlı ayrımcılığı. Turkish Journal of Geriatrics,10(4); 215- 222.]
11. [Arhiri L, Gherman MA, Holman AC. 2022. Ageism against older patients in nursing: conceptual differentiations and the role of moral sensitivity. J Elder Abuse Negl. 34(3);198-221.
12. [Ersin F, Bahar Z. (2014). Küreselleşmenin hemşireliğe etkisi. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 11(3).]
13. [Gething L, Fethney J, McKee K, Persson LO, Goff M, Churchward M, Matthews S, Halvarsson M, Johannsson I. 2004. Validation of the Reactions to Ageing Questionnaire: assessing similarities across several countries. Journal of gerontological nursing, 30(9); 47–54.]
14. [Van Wicklin SA. 2020. Ageism in Nursing. Plastic surgical nursing : official journal of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgical Nurses, 40(1); 20–24.]
15. [Abudu-Birresborn D, McCleary L, Puts M, Yakong V, Cranley L. 2019 Preparing nurses and nursing students to care for older adults in lower and middle-income countries: A scoping review. Int J Nurs Stud, 92;121-134.]
16. [Rababa M, Hammouri AM, Hweidi IM & Ellis JL. 2020. Association of nurses' level of knowledge and attitudes to ageism toward older adults: Cross-sectional study. Nursing & health sciences, 22(3), 593–601.]
17. [Yurttaş S, Sarıkoca E. 2018. Pozitif ve Negatif Yaşlı Ayrımcılığı Ölçeği (PNYAÖ) geçerlilik ve güvenilirlik çalışması. Atatürk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi. 22(Özel Sayı 2);1977-1991.]
18. [Boz H, Gökçe N, Özüstün Kırıl A, Mutlu E, Selvi N, Ünlü D, Yılmaz G. 2017. Sağlık Bilimleri Fakültesi ve İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi öğrencilerinin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumları. Kastamonu Sağlık Akademisi Dergisi, 2(1); 32- 54.]
19. [Kalinkara V, Kalaycı I. 2017. Yaşlıya evde bakım hizmeti veren bireylerde yaşam doyumu, bakım yükü ve tükenmişlik. Yaşlı Sorunları Araştırma Dergisi. 10(2):19-39.]
20. [Özbek-Yazıcı S, Kalaycı I, Kaya E, Tekin A. 2015. Yaşlı bakım programı öğrencilerinin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumları. Yaşlı Sorunlarını Araştırma Dergisi. (2): 77-87.]
21. [Hwang EH, & Kim KH. 2021. Quality of Gerontological Nursing and Ageism: What Factors Influence on Nurses' Ageism in South Korea?. International journal of environmental research and public health, 18(8); 4091.]

22. [Liu YE, Norman IJ, While AE. 2013. Nurses' attitudes towards older people: a systematic review. *International journal of nursing studies*, 50(9); 1271–1282.]
23. [Özdemir Ö, Bilgili N. 2014. Sağlık hizmetlerinde yaşlı ayrımcılığı. *Gülhane Tıp Derg*, 56(2);128-31]
24. [Dahlke S, Davidson S, Kalogirou MR, Swoboda NL, Hunter KF, Fox MT, Pollard C, Baumbusch J, Salyers V. 2020. Nursing faculty and students' perspectives of how students learn to work with older people. *Nurse Educ Today*. 93;104537.]
25. [Pehlivan S, Vatansever N. 2019. Hemşirelerin Yaşlıya Tutumları ve Etkileyen Faktörler. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 45 (1); 47-53 .]
26. [Olak A, Tümer A. 2018. Hemşirelik 1. ve 4. Sınıf Öğrencilerinin Yaşlı Ayrımcılığına İlişkin Tutumları. *OPUS Uluslararası Toplum Araştırmaları Dergisi*. 8 (14); 53-67.]
27. [Erdem Ö, Sarı E. 2018. Klinik Hemşirelerinin Yaşlılara İlişkin Düşünce ve Tutumları. *Ankara Tıp Dergisi*. 18 (4);1]
28. [Karadağ E, Vardar İnkaya B, Karatay G. 2012. Hemşirelik öğrencilerinin yaşlı ayrımcılığına ilişkin tutumları. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi*. 28; 31-40.]
29. [Adıbelli D, Türkoğlu N, Kılıç D. 2013. Öğrenci hemşirelerin yaşlılığa ilişkin görüşleri ve yaşlılara karşı tutumları. *Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Elektronik Dergisi*. 6 (1); 2-8.]
30. [Nikbakht Nasrabadi A, Wibisono AH, Allen KA, Yaghoobzadeh A, Bit-Lian Y. 2021. Exploring the experiences of nurses' moral distress in long-term care of older adults: a phenomenological study. *BMC Nurs*. 31;20(1):156.]
31. [Kulakçı H. 2010. Hemşirelik Lisans Programı Birinci ve Dördüncü Sınıf Öğrencilerinin Yaşlılık ve Yaşlanmaya İlişkin Düşüncelerinin ve Görüşlerinin Değerlendirilmesi. *DEUHYO ED*. 3(1); 15-22
32. [Özütürker M. 2021. Yaşlı Ayrımcılığı. *OPUS Uluslararası Toplum Araştırmaları Dergisi*, 17 (36); 3043-3056.]
33. [Tufan F, Yürüyen M, Kızıllarslanoğlu MC. et. al. 2015. Geriatrics Education is Associated with Positive Attitudes toward Older People in Internal Medicine Residents: A Multicenter Study. *Arch Gerontol Geriatr*. 60(2); 307–310.]
34. [Duru-Aşiret G, Türten-Kaymaz T, Canbolat Ö, Kapucu S. 2015. Hemşirelerin yaşlıya ilişkin tutumları. *Hemşirelikte Araştırma Geliştirme Dergisi*. 17(1); 10-20.]
35. [Cozort RW. Student nurses' attitudes regarding older adults: Strategies for fostering improvement through academia. *Teaching and Learning in Nursing*. 2008;3:21-5.]

İnsan İdrarında Valasiklovirin Tayini için RPLC Yöntemin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Development and Validation of the RPLC Method for the Determination of Valaciclovir in Human Urine

Y. Doğan DALDAL ^{1*} 

¹ Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kahramanmaraş, Türkiye



Ö Z

Sunulan çalışmada, herpes ve megalovirüslerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercihli olarak kullanılan ilaçlardan valasiklovirin katkılanmış idrarda ters faz sıvı kromatografik yöntemle tayini için yöntem geliştirilmiştir. Yöntem geliştirmede, valasiklovirin sistematik olarak pH-kapasite faktörü ilişkisini değerlendirilip, mobil faz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İnceleme sonunda, optimum ayırma koşulu %4 asetonitril-su (h/h), pH 5,0 ve 37°C kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Sonrasında, belirlenen optimum koşulun Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) yönergelerine göre validasyonu gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem 2-12 µg/mL derişim aralığında muhteşem doğrusallık göstermiştir ve idrar ortamında gerçekleştirilen geri kazanma sonuçları (%) valasiklovirin iki farklı derişimi için 100,147±0,800 ve 100,208±0,604 olarak bulunmuştur. Ayrıca, geliştirilen yöntemde sağlamlık testleri de uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar t-testiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen validasyon ve sağlamlık testleri sonucunda, geliştirilen yöntemin hassas, tekrar edilebilir, doğru, kesin ve sağlam olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı, geliştirilen yöntemin rutin analizler için uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antiherpes, valasiklovir, metot geliştirme, pKa, RPLC

Alınış / Received: 07.06.2023 Kabul / Accepted: 05.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

In the present study, a method has been developed for the determination of valaciclovir, one of the preferred drugs for the treatment of infections caused by herpes and megaloviruses, in spiked urine by reversed-phase liquid chromatographic method. In developing the method, the pH-capacity factor relationship of valaciclovir was systematically evaluated and mobile phase optimization was performed. At the end of the examination, the optimum separation condition was determined as 4% acetonitrile-water (v/v), pH 5.0, and 37°C column temperature. Subsequently, the determined optimum condition was validated according to the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH). The developed method showed excellent linearity in the concentration range of 2-12 µg/mL, and the recovery results (%) performed in urine were found to be 100.147±0.800 and 100.208±0.604 for two different concentrations of valaciclovir. In addition, robustness tests were also performed for the developed method and the results were evaluated using the t-test. The results of the validation and robustness tests showed that the developed method is sensitive, reproducible, accurate, precise and robust. Therefore, the developed method was found to be suitable for routine analysis.

Keywords: Antiherpes, Valaciclovir, method development, pKa, RPLC



1. Giriş

Asiklik guanin nükleozitinin bir analogu olan valasiklovir, asiklovirin L- valil ester ön ilacıdır [1-3]. Bu bileşik ve diğer antiherpes ajanları, 1990'lardan beri herpesvirüs ve megalovirüsün sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygınca kullanılan ilaçlardır [1,2]. Bu nedenle, bu bileşiklerin tayini için analitik yöntemlerin geliştirilmesi çok önem arz etmektedir.

İlaçların tayininde kullanılan analitik metotlar içerisinde, geliştirilen yöntemin doğruluğu, kesinliği, kullanım kolaylığı ve tekrarlanabilen sonuçlar gibi sahip olduğu birçok avantajdan dolayı, ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi, analiz laboratuvarlarında ve ilaç endüstrisinde en çok tercih edilen yöntemdir [5]. Bu yöntemde ana tanımlayıcı parametre, bileşiğin sıvı kromatografik kolonda elde edilen alıkonma zamanıdır ve bu parametre, çeşitli deneysel değişkenler ve çalışılan kolonun kimyasal yapısına göre farklılaşmaktadır [6-8]. Seçilen kolonun çalışma boyunca sabit kalacağı düşünüldüğünde, bileşiklerin alıkonma değerleri üzerine etkisi olduğu bilinen en önemli parametreler, mobil faz organik modifiyer derişimi, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığıdır [5-9].

RPLC yöntemle gerçekleştirilen bileşiklerin eş zamanlı tayinlerinde, bileşiklerin alıkonma değerleri üzerine etkisi olan deneysel değişkenlerin çeşitli kombinasyonlarına göre, belli kurallar dahilinde elde edilen bileşiklerin alıkonma değerlerinin kontrol altına alınarak, onların birbirinden ayrılmasını sağlamak ve analizi mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirmek amaçlanmaktadır [6,8]. Bu amaç için birçok araştırmacı, bileşiklerin eş zamanlı sıvı kromatografik tayinde optimum ayırma koşulunu elde etmeye çalışırken, genellikle alıkonma üzerine etkisi olduğu bilinen deneysel değişkenleri tek tek ve rastgele bir şekilde değiştirerek optimum ayırma koşulunu elde etmeye çalışmaktadır [6,8,9]. Deneme – yanılma adı verilen bu yaklaşım, herhangi bir sistematik temele dayanmadığı için birçok deneysel kombinasyonu içermektedir ve özellikle polar bileşiklerin tayini olmak üzere, optimum ayırma koşulunu belirlemek oldukça zorlaşmaktadır [6-10]. Literatürde valasiklovir tayininde de deneme-yanılma yaklaşımının tercih edildiği görülmektedir [11-21]. Valasiklovir için literatürde bulunan çalışmaların çoğu RPLC yöntemle ve izokratik modda gerçekleştirilmesiyle beraber, bileşiğin tablet formülasyonunda [11-17] ve biyolojik sıvılardaki tayiniyle alkalıdır [18-21]. Valasiklovirin tayini için literatürdeki çalışmaların çoğunda mobil fazda organik modifiyer olarak asetonitril (ACN)-su ikili karışımı tercih edilmiştir [13,14,17,20,21]. Literatürde valasiklovir tayini için metanol (MeOH)-su [11,12,16] ve ACN-MeOH-su [18] karışımlarının kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Son olarak, bu çalışma boyunca literatürde valasiklovir tayini için rastlanan en güncel çalışma, Morgan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmadır [17]. Bu çalışmada

araştırmacılar, valasiklovirin analizi için ince tabaka sıvı kromatografi ve RPLC yöntemlerinden oluşan kromatografik yöntemler ile kolorimetrik yöntemin seçiciliklerini kıyaslamak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir ve sonuç olarak çalışılan metotların benzer sonuçlar verdiğini ifade etmişlerdir. Kolorimetrik yöntem, valasiklovirin ferri hidroksamat ile renkli kompleksi oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Kolorimetrik yöntemle valasiklovirin tayini için geliştirilen yöntem 0,20-1,60 mg.mL⁻¹ aralığında doğrusal iken, RPLC yöntem için geliştirilen yöntem 2,00-5,00 mg.mL⁻¹'de, ince tabaka sıvı kromatografisi için geliştirilen yöntem ise 10,00-900,00 ng/band aralığında doğrusaldır. Çalışmada geliştirilen yöntemler, ICH parametrelerine göre valide edilmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, yapısında iyonlaşabilen fonksiyonel grup bulunduran valasiklovir ve iç standart madde olarak kullanılan valgansiklovirin, sabit organik modifiyer derişimi ve kolon sıcaklığında, mobil faz pH'sı ve kapasite faktörü (k) ilişkisini değerlendirerek optimum sıvı kromatografik ayırma yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH)'nin yönergelerine göre validasyonu ve sağlamlık testleri gerçekleştirilmiştir. Valasiklovir için geliştirilen yöntemin geri kazanma çalışmaları insan idrarında gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan valgansiklovir hidroklorür ve valasiklovir hidroklorür, Sigma Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır. Valasiklovir hidroklorür (2-[(2-amino-6-okso-1H-purin-9-il)metoksi]etil (2S)-2-amino-3-metilbutanoat;hidroklorür) ve valgansiklovir hidroklorür ([2-[(2-amino-6-okso-1H-purin-9-il)metoksi]-3-hidroksipropil](2S)-2-amino-3-metilbutanoat;hidroklorür), sırasıyla, 124832-27-5 ve 175865-59-5 CAS numarasına sahip bileşiklerdir. Valasiklovir hidroklorürün moleköl ağırlığı 360,80 g.mol⁻¹; valgansiklovir hidroklorürün moleköl ağırlığı 390,82 g.mol⁻¹'dür. Valasiklovir hidroklorür ve valgansiklovir hidroklorür, sırasıyla, -0,41 ve -0,72 log P değerleriyle oldukça polar ve sudaki çözünürlükleri yüksek bileşiklerdir. Organik modifiyer olarak kullanılan asetonitril (ACN) ve pH metre kalibrasyonu için kullanılan potasyum hidrojen ftalat, Merck (Darmstadt, Almanya)'den tedarik edilmiştir. Mobil faz tamponunu hazırlamak için kullanılan o-fosforik asit ve sodyum hidroksit, Sigma Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safıktadır.

Kullanılan Cihazlar

Sıvı kromatografik çalışmada, gaz giderme ünitesi, kolon fırını, UV Visible dedektör ve bir pompadan oluşan Shimadzu yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) sistemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mobil fazların pH ayarlamalarında, Mettler Toledo MA pH/iyon analiz cihazı ve Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrot (Schwerzenbach, İsviçre) kullanılmıştır. İncelenen bileşiklerin çözeltilerinin ve mobil fazların hazırlanmasında kullanılan ultra saf su, Millipore Direct Q3-UV (Merck) su saflaştırma sistemiyle elde edilmiştir.

Kromatografik Çalışma

Bu çalışmada, valasiklovir ve iç standart madde (I.S) olarak kullanılan valgansiklovir için optimum ayırma koşulunu geliştirmede içerisinde 30 mM o-fosforik asit içeren ve ACN derişimi %4 (h/h) olan ACN-su ikili karışımında çalışılmıştır. Hazırlanan mobil fazların çalışma pH aralığı 5,0-8,0'dır. Tüm kromatografik çalışmalar YMC Triart C18 (3µm, 150 × 4.6mm I.D.) kolonda, 37°C'de, 1 mL.dak⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin analizi için UV dedektör 254 nm'ye ayarlanmıştır.

Standart Çözeltilerin ve Mobil Fazın Hazırlanması

Sıvı kromatografik çalışma için valasiklovir ve valgansiklovir 0,0010 g tartılmış, 10 mL çalışılan mobil fazda çözülmüştür. Böylece, bileşiklerin 100 µg.mL⁻¹ 'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır. Sonrasında, bileşiklerin kalibrasyon doğrusunda belirtilen derişimleri, bu standart çözeltilerin mobil fazla seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Mobil fazların hazırlanmasında, 100 mL' lik stok ortam için 96 mL saf su alınmış ve üzerine 4 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak, asetonitril-su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. pH 5,0-8,0 aralığında hazırlanacak her bir mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde o-fosforik asit (o- H₃PO₄) ilave edilmiştir. Mobil fazların pH değerleri çalışılacak değere, mobil fazlara 1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek

getirilmiştir. Hazırlanan her mobil faz, ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm çözeltiler günlük taze hazırlanıp, kullanımına kadar 4 °C'de saklanmıştır.

İdrar Örneklerinin Hazırlanması

Sağlıklı ve herhangi bir ilaç kullanmayan gönüllü bir bireyden alınan idrar örnekleri, 1:20 oranında seyreltilmiş ve 2 mL seyreltilmiş idrar örneği alınmıştır. Sonrasında, alınan idrar örneklerinin üzerine idrar proteinlerini çöktürebilmek için 3 mL ACN ilave edilmiştir. Hazırlanan bu 5 mL idrar-ACN karışımının üzerine, valgansiklovir (I.S) çözeltide sabit 1 µg.mL⁻¹ derişimde, valasiklovir ise kalibrasyon noktalarındaki derişim değerlerinde olacak şekilde katkılanırılıp çözelti 10 mL'ye tamamlanmıştır. En son olarak hazırlanan 10 mL çözeltiler, 0,45 µm boyutundaki filtreden geçirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir [22].

Kalibrasyon Doğrusu

Bu çalışmada valasiklovir için kalibrasyon verileri, idrar çözeltilerine valgansiklovir (I.S) sabit derişimde (1 µg.mL⁻¹) ve Valasiklovir değışen derişimlerde (2,0; 4,0; 6,0; 8,0;10,0 ve 12,0 µg.mL⁻¹) olacak şekilde hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinden elde edilmiştir. Valasiklovirin kalibrasyon doğrusu ise, valasiklovirin derişimine karşı, valasiklovirin alanının I.S'ın alanına oranının işaretlenmesiyle elde edilmiştir.

Geri Kazanım Çalışması

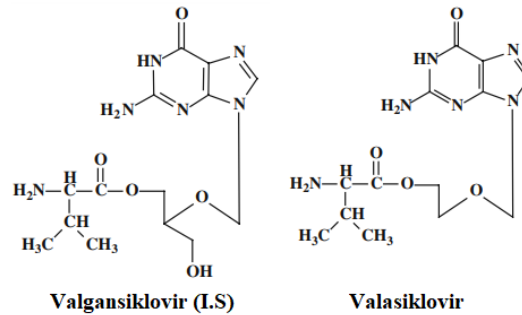
Geri kazanım çalışmaları, valasiklovir tayini için geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini test etmek için gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, I.S'nin sabit derişimi için valasiklovirin 4,0 ve 8,0 µg.mL⁻¹ olmak üzere 2 iki farklı derişimine uygulanmıştır. Geri kazanım çalışmaları, valasiklovirin idrardaki gerçek derişimi üzerine eklenen standart derişimin kıyaslanmasıyla hesaplanmıştır.

Sağlamlık Testi

Yöntemin sağlamlığı, çalışılan bileşiklerin akış hızı (± 0,2), organik modifiyer içeriği (± % 3), mobil fazın pH'sı (± 0,5) ve kolon sıcaklığı (± 2 °C) değıştirildikten sonra analiz edilerek, optimum ayırma koşulunda elde edilen verilere göre t-testi uygulanarak değeriendirilmiştir.

3. Bulgular

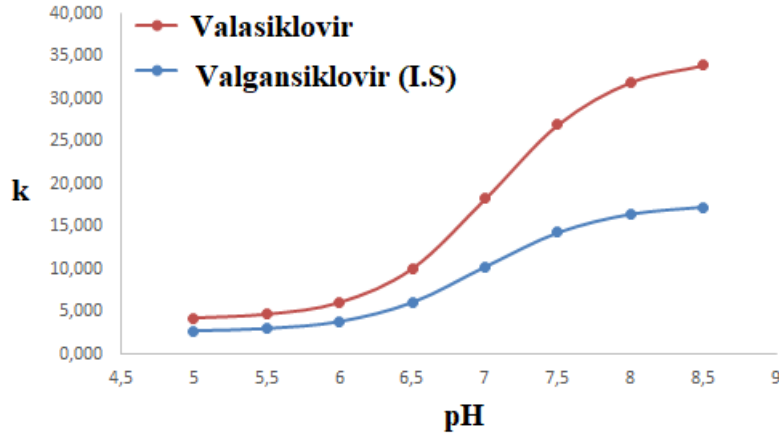
Valasiklovir ve valgansiklovir (I.S) guanin halkasından türetilmiş bileşiklerdir (Şekil 1). Bundan dolayı da bu bileşikler oldukça polardır (Valasiklovir: logP -0,41; log S -1.28, valgansiklovir: logP -0,72; logS -0.98) [10,24,25]. Polar yapıdaki bileşiklerin RPLC analizi, bileşiklerin geleneksel C18 kolonlarda çok erken elue olmasından dolayı zordur. Bu zorluklar, yüksek karbon yüklemesine sahip, yeni nesil kolonların kullanılmasıyla aşılmaktadır. Bu nedenle, yüksek karbon yüklemesiyle polar bileşiklerle çalışmak için uygun, geniş pH çalışma aralığına sahip kolon olan YMC Triart C18 (15 × 0,46 cm I.D., 3 µm), bu çalışma için tercih edilmiştir. Elde edilen simetrik pik şekilleri ve teorik tabaka sayıları, seçilen kolonun doğru seçim olduğunu göstermektedir [26].



Şekil 1: Çalışılan bileşiklerin kimyasal yapısı

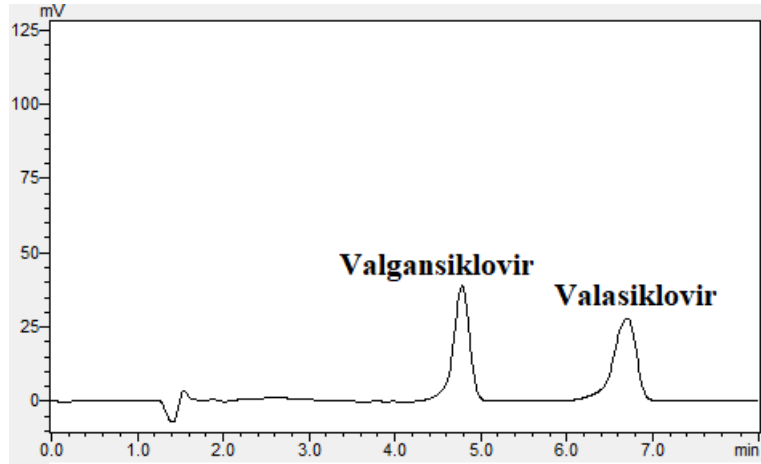
Bu çalışmada, valasiklovirin kantitatif tayini RPLC yöntemle gerçekleştirilmiştir ve yöntem geliştirilmesinde, sistematik olarak mobil faz optimizasyonu uygulanmıştır. Bunun için, sabit mobil faz derişimi ve kolon sıcaklığında, yapısında iyonlaşabilen fonksiyonel grup bulunduran valasiklovir ve valgansiklovirin (I.S), değişen mobil faz pH değerlerine karşı kapasite faktörü (k) değerlerindeki değişim incelenmiştir. Mobil faz pH çalışma aralığı olarak bileşiklerin moleküler ve iyonik formlarda olduğu pH aralığı olan pH 5,0 ve pH 8,0 aralığı belirlenmiştir. Bu aralığın belirlenmesinde bileşiklerin pK_a değerlerinden yararlanılmıştır. Bu değerlerin yaklaşık 1,5 pH birimi altı bileşiğin iyonik formunu ifade ederken, 1,5 pH birim üstü bileşiğin moleküler halde olduğu formu ifade etmektedir [7].

Çalışmada ön deneme olarak bileşiklerin k değerleri, bileşiklerin moleküler ve iyonik türde olduğu pH değerlerinde, 37°C kolon sıcaklığında, yapısında %4, %6 ve %8 ACN-su (h/h) içeren mobil fazlarda hesaplanmıştır. Bileşiklerin k değerleri, %4 ACN-su (h/h) ikili karışımında, %6 ACN-su (h/h) ikili karışımındakilerden daha büyüktür. Ayrıca %8 ACN-su (h/h) ikili karışımında, valgansiklovirin k değerleri 1'in altına düşmüştür. Bundan dolayı, valasiklovirin optimum ayırma koşulu için mobil faz organik modifiyer derişimi %4 ACN-su (h/h) ikili karışımı olarak belirlenmiştir. Bu oranda ACN-su içeren ikili karışımlarda ve pH 5-8 aralığında sistematik olarak değişen pH'larda, bileşiklerin alıkonma değerleri (t_R) ve kolonda tutulmayan tür olan urasil çözeltisinin alıkonma değeri (t₀) elde edilmiş ve bu değerler kullanarak, valasiklovirin ve valgansiklovirin k değerleri hesaplanmıştır [5,7]. Bileşiklerin %4 ACN-su ikili karışımlarında, farklı pH değerlerine karşı hesaplanan k değerleri grafiğe geçirildiğinde, bir sigmoidal davranış elde edilmektedir (Şekil 2). Bu sigmoidal davranış, bileşiklerin yapılarında bulunan metil bütanoat kısmına bağlı amino grubuna ait azotun protonasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 2: Çalışılan bileşiklerin %4 ACN-su (h/h) ortamında elde edilen pH-k ilişkisi

Şekil 2'de gösterilen sigmoidal grafiklerin yaklaşık olarak orta noktaları, çalışılan %4 ACN-su ikili karışımı için bileşiklerin pK_a değerlerinin olduğu bölgeyi belirtmektedir. Bir bileşiğin pK_a değeri, onun %50'sinin iyonlaşmış %50'sinin iyonlaşmadan kaldığı andaki pH değeri olarak ifade edilir. RPLC yöntemle bileşiklerin eş zamanlı tayinlerinde, bileşiklerin yaklaşık olarak pK_a değerlerinin olduğu pH bölgesi, küçük pH değişimlerinden bileşiğin alıkonma değerlerinin çok fazla etkilendiği bir bölgedir. Ayrıca, bileşiğin iyonik ya da moleküler formunun birbirlerine baskın olmadığı bu bölgede, bileşiklerin kromatogramlarında kantitatif tayinlerde istenmeyen kuyruklanma görülmektedir [5,7]. Bu nedenle bileşiklerin ayrılması için optimum koşulu belirlerken bileşiğin tamamen iyonik ya da moleküler formda olduğu pH değerleri tercih edilir [5,7]. Ayrıca, bileşiklerin tayini için optimum koşulun belirlenmesinde, bileşiklerin k değerlerinin 1 ila 10 arasında (1 ≤ k ≤ 10) olması, iki pik arasındaki seçicilik faktörü (α) değerinin 1,15 veya bu değerden büyük olması ve iki pik arasındaki ayırma gücü (R_s) değerlerinin 1,5'den büyük olması gerekmektedir. Bu şartları sağlayan ve mümkün olan en kısa zamanda gerçekleşen sıvı kromatografik koşul, optimum koşul olarak belirlenir. Bu çalışmada, bu şartları sağlayan koşul, yapısında %4 ACN-su içeren ve pH değeri 5,0 olan ACN-su ikili karışımı olarak belirlenmiştir. Çalışmanın vücut sıcaklığında gerçekleştirilmesi istendiğinden, tüm kromatografik analizler 37°C'de yapılmıştır. Purnell bağıntısıyla hesaplanan kromatografik parametrelere göre belirlenen optimum koşul, istenilen kromatografik şartları sağlamaktadır (Valgansiklovir için k: 2,162; Valasiklovir için k: 3,283; valgansiklovir/Valasiklovir için α: 1,519, R_s: 6,072'dir.) Belirlenen optimum koşula göre elde edilmiş bileşiklerin standart kromatogramı Şekil 3'de, verilmiştir.



Şekil 3: Çalışılan bileşiklerin optimum koşula göre elde edilmiş standart kromatogramı

Geliştirilen Analitik Metodun Validasyonu

Valasiklovir tayini için optimum ayırma koşulu belirlendikten sonra, geliştirilen metodun doğrusalılık, hassaslık, kesinlik, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik testlerinden oluşan ICH yönergelerindeki parametrelere göre validasyonu gerçekleştirilmiştir [27]. Valasiklovirin kantitatif tayini gerçekleştirilirken, iç standart (I.S) metodundan faydalanılmıştır. Bu metod, bileşiklerin enjeksiyonlarında meydana gelen rastgele ve sistematik hataların bertaraf edilmesi için tercih edilen bir metottür.

Yapılan analiz için kromatografik sistemin tekrarlanabilirliği, sistem kararlılık parametreleriyle test edilmiştir. Sistem kararlılık testleri, tekrarlanan enjeksiyonlar için alıkonma süresi (t_R), kapasite faktörü (k), teorik tabaka sayısı (N) ve % Bağıl standart sapma (% BSS) (t_R için)'dan oluşur. Bu çalışmada belirlenen optimal koşulda, valasiklovir ve valgansiklovir (I.S) için sistem uygunluk testleri yapılmıştır [6]. Valgansiklovir (IS) ve valasiklovir ve için alıkonma zamanları sırasıyla 4,935 ve 6,231 olarak belirlenmiştir. Valgansiklovir için teorik tabaka sayıları (N) 6421; valasiklovir için 8700 olarak hesaplanmıştır. Seçicilik faktörleri valgansiklovir (IS)/valasiklovir için 1,518, ayırma gücü (R_s) 6,096 olarak belirlenmiştir. Taze hazırlanmış çözeltiler belirli konsantrasyonlarda sisteme üç kez enjekte edildikten alıkonma zamanlarının (t_R) bağıl standart sapma değerleri sırasıyla valgansiklovir (IS) için %0,060, Valasiklovir için %0,044 olarak hesaplanmıştır. Valgansiklovir ve valasiklovir için kuyruklanma faktörü (t_f) değerleri sırasıyla, 0,940 ve 0,947 olarak belirlenmiştir. Sistem kararlılık testine göre elde edilen sonuçlar, sistem kararlılık sonuçlarının önerilen değer aralıkları içinde olduğunu göstermektedir. Bu da geliştirilen RPLC yönteminin, rutin farmasötik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir [27].

Geliştirilen metodun doğrusallığını tayin etmek için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında doğrusaldır. Kalibrasyon doğrusu, derişime karşı valasiklovirin alanının I.S olarak kullanılan valgansiklovirin alanına oranlanmasıyla elde edilen değerlerin işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Elde edilen doğrusal regresyon sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 3'de verilen tayin limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerleri, sırasıyla, 3,3:1 ve 10:1 sinyal/gürültü oranlarına göre hesaplanmıştır [27].

Tablo 1: Valasiklovirin kalibrasyon eğrisi verileri

Parametreler	Valasiklovir
Doğrusallık aralığı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2-12
Regresyon Denklemi	$y = 0,906x + 0,018$
Eğimin standart Hatası	0,003
Kesimin Standart Hatası	0,023
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Tayin limiti (LOD) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,083
Kantitatif tayin limiti (LOQ) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,251

Geliştirilen sıvı kromatografik metodun doğruluğunu ve kesinliğini test etmek için gün içi-günler arası çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gün içi çalışmaları aynı gün, iki farklı konsantrasyon ve üç bağımsız valasiklovir çözeltilisiyle gerçekleştirilirken, günler arası çalışmaları, üç farklı günde ve iki farklı konsantrasyonda, valasiklovirin üç bağımsız çözeltilisiyle gerçekleştirilmiştir. Valasiklovir tayininin kesinliği ve doğruluğuna ilişkin gün içi ve günler arası çalışmalarının sonuçları, Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de sunulan sonuçlar, geliştirilen RPLC yönteminin yeterli hassasiyete ve doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

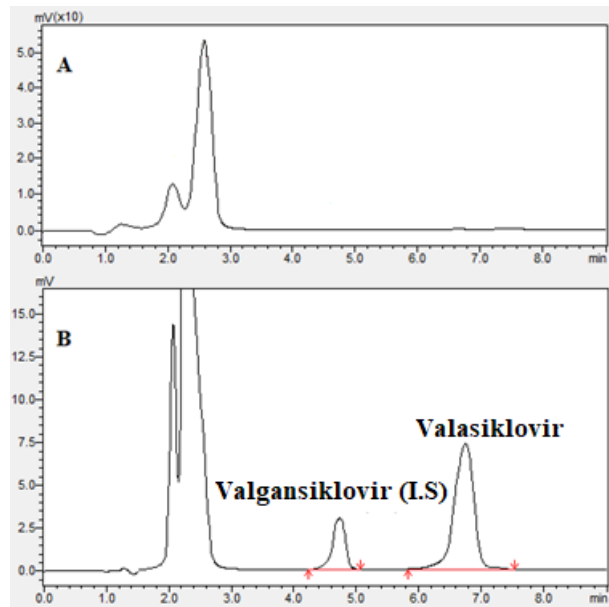
Tablo 2: Valasiklovirin gün içi-günler arası

Bileşik	Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Gün İçi Konsantrasyon Ortalaması ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% BSS	Günler Arası Konsantrasyon Ortalaması ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% BSS
Valasiklovir	4,0	4,009	0,388	4,026	0,608
	10,0	10,008	0,126	10,030	0,350

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini doğrulamak ve idrar örneğindeki proteinlerin geliştirilen yöntemle etkileşime girip girmediğini anlamak için önerilen yöntem geri kazanım testleri ile değerlendirilmiştir. Valasiklovir için önerilen yöntemin doğruluğu, katkılандırılmış insan idrarında geri kazanım testleri ile belirlenmiştir. Geri kazanım çalışmaları, valasiklovir için 3 tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Valasiklovir için geri kazanım sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. Ayrıca, optimum ayırma koşulunda valasiklovirin ve valgansiklovirin (I.S) idrar ortamında gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasına göre elde edilen kromatogramlar Şekil 4'de verilmiştir. Şekil 4'de A ile belirtilen kromatogram ortamda valasiklovir ve valgansiklovirin olmadığı idrar kromatogramını; B ile belirtilen kromatogram ise idrar ortamında valasiklovir ve valgansiklovirin olduğu kromatogramı göstermektedir.

Tablo 3: İdrarda valasiklovirin RPLC analizi için geri kazanım sonuçları

Teorik konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	N	Bulunan ortalama konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Standart Hata	BSS (%)	Geri Kazanım (%)	Standart Hata	BSS (%)
4	3	4,006 \pm 0,032	0,013	0,322	100,147 \pm 0,800	0,323	0,322
8		8,017 \pm 0,048	0,019	0,243	100,208 \pm 0,604	0,244	0,243



Şekil 4: Geri kazanım çalışmasından elde edilen kromatogramlar: (A) Çalışılan bileşiklerin olmadığı idrar kromatogramı, (B) Valgansiklovir (I.S) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve valasiklovir ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) içeren kromatogram

Gerri kazanım sonuçlarına göre, önerilen yöntemin yeterli doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu ve ayrıca idrar proteinlerinin önerilen yöntemle etkileşime girmediği bulunmuştur.

Geliştirilen optimum ayırma koşulunun sağlamlığını belirlemek için sağlamlık testleri gerçekleştirilmiştir. Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntemden elde edilen kantitatif sonuçların metod parametrelerindeki küçük değişikliklerden etkilenmeyip değişmeden kalabilmesi olarak ifade edilmektedir [6]. Bu çalışma için optimum koşula göre kurulan deney seti ve sonuçları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Geliştirilen metodun sağlamlık testi sonuçları

Parametreler	Valasiklovir	
	Pik Alanı ($8\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Kuyruklanma Faktörü
Optimum Koşul (%4 ACN; pH 5; 37°C)	74874	0,947
Artırılmış Organik Modifiyer (7:93)	74636	0,950
Azaltılmış Organik Modifiyer (1:99)	74860	0,949
Artırılmış Mobil Faz pH'sı (pH: 5,5)	74707	0,944
Azaltılmış Mobil Faz pH'sı (pH: 4,5)	74857	0,968
Azaltılmış Akış Hızı (0,8 mL/dakika)	74788	0,955
Artırılmış Sıcaklık (39°C)	74815	0,950
Azaltılmış Sıcaklık (35 °C)	74796	0,940

Bu çalışmada, kantitatif tayinler için çok önemli olan kuyruklanma faktörü ve sistem kararlılık testlerinde de kullanılan $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimdeki valasiklovirin pik alanı değerleri sağlamlık testleri için incelenmiştir. Elde edilen verilerin optimum koşulda elde edilen verilerle uyumu Minitab 17 programı aracılığıyla tek örnek t-testi uygulanarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen inceleme neticesinde, pik alanı için ortalama alan 74770; T_r değeri için ortalama t_r değeri 0,953 olarak belirlenmiştir. t testi sonucunda pik alanı için -2,4; t_r için 1,520 değeri elde edilmiştir. Minitab 17 programıyla gerçekleştirilen t-testinde p değerleri 0,05'den büyük bulunmuştur. p değerlerinin 0,05'den büyük olması, optimum koşulda elde edilen verilerle, sağlamlık testi sonucu elde edilen veriler arasındaki farkların önemsiz olduğu şeklinde yorumlanır. Tüm bu verilere göre, optimum ayırma koşulunu oluşturan deneysel parametrelerdeki küçük değişiklikler, valasiklovirin kantitatif sonuçlarında herhangi bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Böylece, geliştirilen yöntemin sağlamlığı kanıtlanmıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, valasiklovirin idrarda ters faz sıvı kromatografik olarak tayini gerçekleştirilmiştir. Bu tayin için optimum ayırma koşulunun belirlenmesinde, valasiklovirin pH-k ilişkileri değerlendirilerek sistematik olarak mobil faz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Mobil faz optimizasyonu gerçekleştirilirken bileşiklerin pK_a değerleri dikkate alınmıştır. Valasiklovir ve diğer antiherpes grubu ilaçlar için literatürde mevcut olan sıvı kromatografik tayin çalışmalarının çoğunda deneme-yanılma yaklaşımından yararlanıldığı görülmektedir [11-21]. Antiherpes grubu ilaçlar yapılarındaki guanin halkasından kaynaklanan yüksek polarlıklarından dolayı, deneme-yanılma yaklaşımıyla bu bileşiklerin tayinleri çok uğraş gerektiren çalışmalardır ve bundan dolayı gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda, tek bir bileşiğin kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda da bileşiklerin çözücü pikinden tamamen ayrıldığı $k \geq 1$ kriterinin dikkate alınmadığı görülmektedir.

Sunulan bu çalışmada tüm kriterleri sağlayacak şekilde belirlenen optimum ayırma koşulunun validasyonu, ICH yönergesindeki kriterlere göre gerçekleştirilmiştir. Validasyon sonuçlarına göre geliştirilen yöntemin hassas, doğrusal, doğru ve kesin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, geliştirilen yöntem sağlamlık testleri de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar t-testiyle değerlendirilmiş, değerlendirme sonunda optimum koşulda elde edilen veriler ile sağlamlık testine göre elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Bundan dolayı, geliştirilen yöntem sağlamdır. Geliştirilen yöntem için tüm elde edilen validasyon ve sağlamlık testi sonuçlarına göre, geliştirilen yöntemin rutin analizler için uygun olduğu görülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2021/3-1 BAP).

Etik Beyanı

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

Kaynakça

- [1] Kayaalp, O. 2000. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9th, edition. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara, 880s.
- [2] Hilal-Dandan, R., Laurence, L. B. 2017. Goodman & Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. 2nd, edition. Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 1205s.
- [3] Katzung, B. G. 2011. Basic & Clinical Pharmacology. 12th, edition. The McGraw-Hill Companies, San Francisco, 1245s.
- [4] Dar, B. P. W., Öksüz, Z., Algül, Ö. 2019. Antiviral İlaçlardaki Gelişmeler ve Değerlendirilmesi. Lokman Hekim Dergisi, 9(2),160-170.
- [5] Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. 1st, edition. Wiley-Interscience, Canada, 1135s.
- [6] Uysal, R., Daldal, Y. D., Üstün, Z., Demiralay, E. Ç. 2017. Optimization of RPLC Method for Separation of Some Acetylcholinesterase Inhibitors by Using Central Composite Design. Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 2(1), 23-43.
- [7] Kuzucanli, E., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z., Konçe, İ., Alsancak, G. 2022. Development and Validation of RPLC Method for The Simultaneous Analysis of ACE Inhibitors in Tablet Formulations. Turkish Journal of Chemistry, 4(2),103–110.
- [8] Gündoğan, B., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z. 2017. Determination of Optimum Separation Condition for Some Carbapenem Antibiotics Using RPLC with the Aid of Central Composite Design and Desirability Function. Current Pharmaceutical Analysis, 13, 100-109.
- [9] Demiralay, E. Ç. 2012. An Experimental Design Approach to Optimization of the Liquid Chromatographic Separation Conditions for the Determination of Metformin and Glibenclamide in Pharmaceutical Formulation. Acta Chimica Slovenica, 59(2), 307-314.
- [10] Bosch, M. E., Sánchez, A. J. R., Rojas, F. S., Ojeda C. B. 2009. Ganciclovir: A Review of its Analytical Determination. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 4(4),254-264.
- [11] Sheetal Ramya Lahari, N. A. 2013. Method Development and Validation of Valacyclovir in Bulk & Tablet Dosage Form by RPHPLC Method. IOSR journal of pharmacy, 5(1), 56-75.
- [12] Ganesh, M., Bhagiyalakshmi, M., Hemalatha, P., Rao, C. V. N., Jang, H. T., Rajasekar, K. 2011. RP-HPLC Estimation of Valacyclovir HCl in Tablet Formulation. Asian Journal of Chemistry, 23(3), 1317-1320.
- [13] Rasool, S. K., Naik, D. V., Babu, D. P., Nalluri, B. N. 2012. RP-HPLC Method for The Estimation of Valacyclovir in Bulk and Pharmaceutical Formulations. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(1), 214-218.
- [14] Patil, G. D., Yeole, P. G., Puranik, M., Wadher, S. J. 2009. A Validated Specific Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for the Determination of Valacyclovir in the Presence of its Degradation Products in Bulk Drug and in Tablet Dosage Form. International Journal of ChemTech Research, 1(1), 16-26.
- [15] Prasad Reddy, D.V., Gurupadayya, B.M., Manohara, Y.N., Vijaya Bhaskar, V. 2007. Spectrophotometric Determination of Valacyclovir Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Formulations. Asian Journal of Chemistry, 19(4), 2797-2800.
- [16] Palacios, M.L., Demasi, G., Pizzorno, M.T., Segall, A.I. 2005. Validation of an HPLC Method for the Determination of Valacyclovir in Pharmaceutical Dosage. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28(5), 751-762.

- [17] Morgan, E.M., Lotfy, H.M., Fayez, Y.M., Abdelkawy, M. 2022. Comparative Study of the Selectivity Power of Colorimetric Method Over Chromatographic Methods for the Analysis of Valaciclovir Hydrochloride. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 105(3), 717–726.
- [18] Caglar, S. 2014. Determination of Valacyclovir Hydrochloride in Tablets and Spiked Plasma Samples by Spectrofluorimetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 69, 362–366.
- [19] Savaşer, A., Özkan, C.K., Özkan, Y., Uslu, B., Özkan, S.A. 2003. Development and Validation of an RP-HPLC Method for the Determination of Valacyclovir in Tablets and Human Serum and Its Application to Drug Dissolution Studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(11), 1755-1767.
- [20] Darville, J. M., Lovering, A. M., MacGowan, A.P. 2007. Development, Evaluation and Application of An Isocratic High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Assay for The Simultaneous Determination of Aciclovir and its Metabolite 9-Carboxymethoxymethylguanine in Human Serum and Cerebrospinal Fluid. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 30–33.
- [21] Kasiari, M., Gikas, E., Georgakakou, S., Kazanis, M., Panderi, I. 2007. Selective and Rapid Liquid Chromatography/Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Method for The Quantification of Valacyclovir and its Metabolite in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*, 864, 78–86.
- [22] Çubuk Demiralay, E., Koç, D., Daldal, Y.D., Alsancak, G., Ozkan, S.A. 2014. Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine. *Biomedical Chromatography*, 28(5), 660-666
- [23] Rajeswari, K. R., Nageswararao, P., Sankar, G. G., Rao, A. L., Raju, D. B., Rao, J. L. N. S. 2006. Estimation of Valacyclovir in Tablets and Human Serum by RP-HPLC Method. *Asian Journal of Chemistry*, 18(4), 2515-2518.
- [24] Chemicalize program. <http://www.chemicalize.org> (Erişim Tarihi: 02.06.2023).
- [25] SwissADME program. <http://www.swissadme.ch> (Erişim Tarihi: 04.08.2023).
- [26] Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J. 2017. RP-HPLC Determination of Dissociation Constant Using Solely Aqueous Mobile Phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 143–148.
- [27] ICH Validation of Analytical Procedures, Text and methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonization, 2005.

In vitro Testing to Investigate Effects of Excipients in Drug Formulation

Yardımcı Maddelerin İlaç Formülasyonundaki Etkilerini Araştırmak İçin *In vitro* Testler

Hulya YILMAZ^{1*}, Fatma SERTGOZ², Ayşe CINKILIC², Mustafa CULHA¹

¹ Sabanci University Nanotechnology Research and Application Center, Istanbul, Turkey

² Department of Genetics and Bioengineering, Yeditepe University, 34755 Istanbul, Turkey

ABSTRACT

The formulation of drugs requires active pharmaceutical ingredients (API), which can be combined with some excipients, which are not considered pharmacologically active and could have different roles in a drug formulation. Glukofen, a generic name as a biguanide antidiabetic, is used for treating type 2 Diabetes Mellitus, mainly in overweight patients when dietary management and exercise do not help in adequate glycemic control. In Glukofen formulation, metformin-HCl as an API and some excipients such as povidone, magnesium stearate, hypromellose, and titanium dioxide are combined. The goal of this study is *in vitro* investigation of the effects of Glukofen and metformin-HCl on the human bronchial epithelial cell line (Beas-2b). To observe and compare their toxic effects and uptake into cells, cytotoxicity assay and flow cytometry experiments were carried out. The obtained results from this study showed that any toxic effects of both Glukofen and metformin-HCl on Beas-2b cells were not obtained. In addition, uptake of Glukofen into cells was observed more than metformin-HCl. It is evident that the incorporation of excipients to metformin-HCl results in a significant rise in cell proliferation and uptaking into cells.

Keywords: Glukofen, metformin, *in vitro*, Beas-2b, excipients, toxicity

Alınış / Received: 16.07.2023 Kabul / Accepted: 06.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ÖZ

İlaçların formülasyonu, farmakolojik olarak aktif kabul edilmeyen ve bir ilaç formülasyonunda farklı rollere sahip olabilecek bazı eksipyanlarla birleştirilebilen aktif farmasötik bileşenler (API) gerektirir. Bir biguanid antidiyabetik olarak jenerik bir isim olan Glukofen, diyet yönetimi ve egzersiz yeterli glisemik kontrole yardımcı olmadığında, özellikle aşırı kilolu hastalarda tip 2 Diabetes Mellitus tedavisinde kullanılır. Glukofen formülasyonunda, bir API olarak metformin-HCl ve povidon, magnezyum stearat, hipromelloz ve titanyum dioksit gibi bazı yardımcı maddeler birleştirilir. Bu çalışmanın amacı, Glukofen ve metformin-HCl'nin insan bronşiyal epitel hücre dizisi (Beas-2b) üzerindeki etkilerinin *in vitro* araştırılmasıdır. Toksik etkilerini ve hücrelere alımlarını gözlemek ve karşılaştırmak için sitotoksikite testi ve akış sitometrisi deneyleri yapıldı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, hem Glukofen hem de metformin-HCl'nin Beas-2b hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisinin elde edilmediğini göstermiştir. Ayrıca Glukofen'in hücrelere alımı, metformin-HCl'den daha fazla gözlemlendi. Yardımcı maddelerin metformin-HCl'ye dahil edilmesinin, hücre çoğalmasında ve hücrelere alınmasında önemli bir artışa yol açtığı açıktır.

Anahtar Kelimeler: Glukofen, metformin, *in vitro*, Beas-2b, yardımcı maddeler, toksisite



1. Introduction

In pharmaceutical industry, drug formulations are created with utmost precision, ensuring that active pharmaceutical ingredients (API) and other essential components are included in optimal concentrations to achieve maximum efficacy [1]. Maintaining the safety and efficacy of drugs is crucial in drug therapy, as both the APIs and impurities play a significant role in determining the drug's safety. The pharmacological-toxicological profile of APIs and impurities determines the drug's overall safety. In order to achieve this, the pharmaceutical industry adheres to strict safety standards while treating diseases to protect public health.

A drug's chemical properties can significantly affect its pharmacokinetics and pharmacodynamics properties [2]. For a drug to be absorbed and distributed to its intended site of action or elimination, it must be able to dissolve in aqueous solutions, be released from its formulation, and cross several hydrophobic and hydrophilic barriers [3]. However, most APIs are not well water-soluble, so excipients are added to help increase solubility. Additionally, excipients play a crucial role in maintaining the drug's stability, shelf-life, and dosage uniformity, ensuring maximum therapeutic efficacy by providing reproducibility of absorption, dissolution, and bioavailability [4]. Although excipients were traditionally not considered pharmaceutically active, they are now crucial in improving the drug's performance [5]. Various excipients, including diluents, binders, disintegrates, glidants, lubricants, tablet coatings, films, and coloring agents, are incorporated into the dosage form to ensure the drug's safety and efficiency [6].

Figure 1 shows the chemical structure of metformin hydrochloride (HCl), the active ingredient of Glukofen, produced by Sandoz drug company. Its IUPAC name is 3-(diamino methylidene)-1,1-dimethylguanidine hydrochloride. Metformin, a type of guanidine from the biguanide class, contains two methyl substituents at position 1. Glukofen treats type 2 diabetes mellitus and can be used with another oral antihyperglycemic agent or insulin. Glukofen works through three active pathways, namely, i) reducing hepatic glucose production by inhibiting gluconeogenesis, ii) improving peripheral glucose uptake and usage by increasing insulin sensitivity in muscle, and iii) retarding intestinal glucose absorption [7].

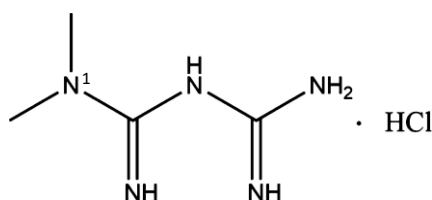


Figure 1. Chemical structure of metformin-HCl

The tablet form of Glukofen includes the excipients listed in Table 1, which shows the specific properties of the formulation.

Table 1. Excipients in Glukofen and their properties in the formulation

Excipients	IUPAC name	Functions	Mechanism	References
Hypromellose	Cellulose hydroxypropyl methyl ether	Film coating- Tablet binder	The grades of hypromellose differ in the extent of substitution and viscosity. In capsules and tablets, high-viscosity grades can be utilized to delay the release of drugs from the matrix.	[8]
Titanium Dioxide	Dioxotitanium	Film coating	White pigment in film-coating suspensions, gelatin capsules, and sugar-coated tablets	[9]
Povidone	(1-Ethenyl-2-pyrrolidinone homopolymer)	Solubilizer- Tablet core	Not absorbed by mucous membranes or the gastrointestinal tract, it might be considered substantially nontoxic when consumed orally.	[10]
Magnesium stearate	Octadecanoic acid magnesium salt	Lubricant- Tablet core	Due to the hydrophobicity, it might delay the dissolution of the drug from a solid-dosage form. When administered orally, it is usually considered nontoxic.	[11, 12]

Studies suggest that long-term use of metformin is linked to decreased levels of serum vitamin B12. This factor can impact respiratory muscle function and increase the likelihood of Chronic Obstructive Pulmonary Disease exacerbation and hospitalization [13]. In light of this information, an investigation of the effects of metformin on lung cells is a vital issue. This study aims to explore how the tablet version of metformin-HCl affects Beas-2b cells. The absorbance of Glukofen was measured to compare to the absorbance of metformin-HCl by using Ultraviolet-visible (UV-vis) spectrophotometry. Next, we conducted studies on the cell viability and uptake of Glukofen and metformin-HCl in Beas-2b cells and observed the morphological changes through white light images. Based on the findings, one can conclude that while metformin does not exhibit any toxicity towards Beas-2b cells, the presence of excipients causes increased cell proliferation.

2. Materials and Methods

Materials

Human Bronchial Epithelial cells (Beas-2b) were purchased from ATCC. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, D6421-500 mL), Fetal Bovine Serum (FBS), Phosphate Buffered Saline (10X PBS with calcium-magnesium), and 0.25% Trypsin-EDTA (1X) were purchased from Gibco, USA. The well plates (Corning™ Costar™, Sweden), serological pipettes (SPL Life Science, Korea), Hemocytometer (Bright Line, Germany), T-flask, automatic pipette (IsoLab, Germany), falcon tubes and Eppendorf tubes (Isolab) were obtained. Glukofen 850 mg retard (Sandoz, Switzerland) contains Polyvinylpyrrolidone (K90), magnesium stearate, polyethylene glycol, hydroxypropyl methylcellulose, and opadry II white as excipients, was obtained from the pharmacy to test in the study. Metformin-HCl and Dimethyl sulfoxide (DMSO) were supplied from Sigma Aldrich. Guava easyCyte™, a Microplate reader from BIO-TEK ELx800, USA, with the software program of KCjunior (Winooski, VT), UV-vis spectrophotometry was used.

Methods

Five technical and three biological replicates were conducted for each experiment. 10% DMSO was used as a positive control. Whereas the cells in the media were used as a negative control, the media was used as a blank. Figure 2 shows a schematic representation of *in vitro* experimental models.

Preparation of standard stock solutions: Increasing concentrations of (0.5, 1, 2.5, 5, 10, and 20 μM) Glukofen and metformin-HCl in DMEM-High glucose were prepared by diluting each drug from stock solutions in a sufficient quantity of media in separate. First, ten tablets of 850 mg Glukofen were ground up by a mortar and pestle to obtain the powder, mixed to homogenize, and weighed. Stock solution (100 μM , 25 mL) as a concentrate for each was prepared to be diluted and stored in 2 mL Eppendorf tubes at -20°C to keep it stable.

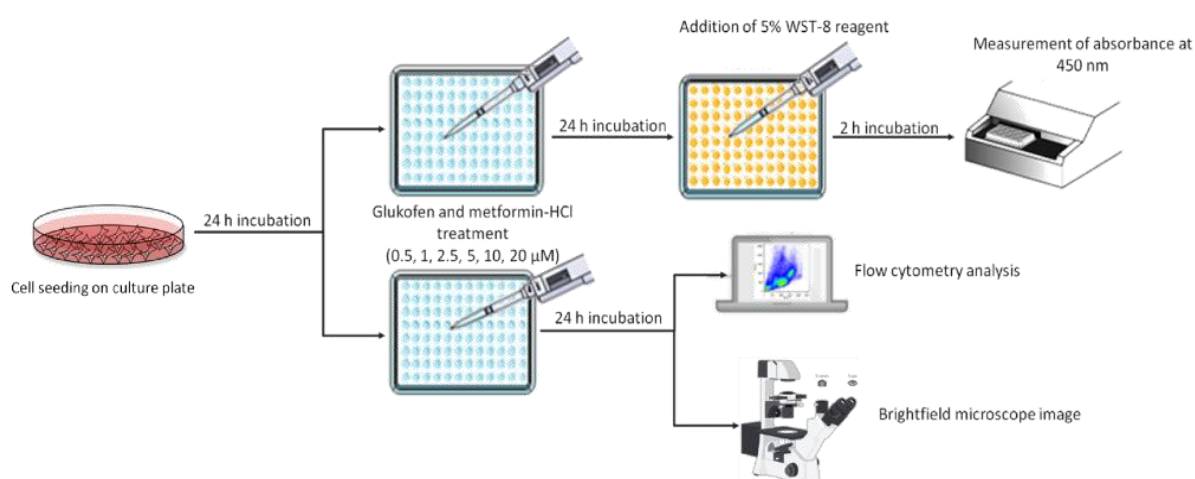


Figure 2. Schematic representation of the *in vitro* experimental procedure

Cell viability: WST-8 Assay was conducted according to the supplier's protocol to test the viability of cells. Initially, 12×10^3 Beas-2b cells/well were cultured in DMEM-High Glucose medium with 5% FBS and incubated at 37°C and 5% CO_2 conditions by reaching a confluence of 80%. Afterward, the prepared six doses (0.5, 1, 2.5, 5, 10, and 20 μM) of Glukofen and metformin-HCl by dilution from stock solutions were exposed to the cells. After 24 hours of incubation, 5% WST-8 reagent with completed media was exposed to the cells and left incubator for 2 hours, and then 96 well-plates were analyzed at 450 nm by ELISA reader.

Uptake Studies: Beas-2b was seeded as 4.2×10^4 cells/well in 24 well plates. After 24h, increasing concentrations of Glukofen and metformin-HCl, like in the cell viability study, were applied to the cells for 24 hours. After incubation of cells with Glukofen and metformin-HCl, each well was washed with PBS, and then, the cells were treated with 0.25% trypsin-EDTA. Afterward, 400 μL complete DMEM-High was added to each well, and these mixtures were transferred into Eppendorf tubes separately. They were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. The supernatants were discarded, and the pellets were dissolved with 200 μL PBS. The samples were analyzed by flow cytometer.

Brightfield Microscope Image: The cells were seeded as 4.2×10^4 cells/well on 24 well plates. After one day of the cultured cells on the wells, six doses (0.5, 1, 2.5, 5, 10, and 20 μM) of both Glukofen, metformin-HCl were prepared. The plates were placed in the incubator and kept for 24 hours. After incubation of cells for 24 hours, the media on each well were discarded, and 500 μL PBS was added into each well. Then, their images were taken for both Glukofen and metformin-HCl treatments at 40X objective by brightfield microscope.

Statistical Analysis: The two-paired Student's t-test was used, and P-values are calculated and given by asterisks, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$. * and ** were given on the graph to avoid redundancy. ($n=5$, mean \pm SD).

3. Results and Discussion

Figure 3 shows the UV/Vis spectra of Glukofen and Metformin-HCl, and, as seen, λ_{\max} is 236 nm, confirming the literature value [14]. From the spectra, it is clear that Glukofen spectrum is dominated by metformin.

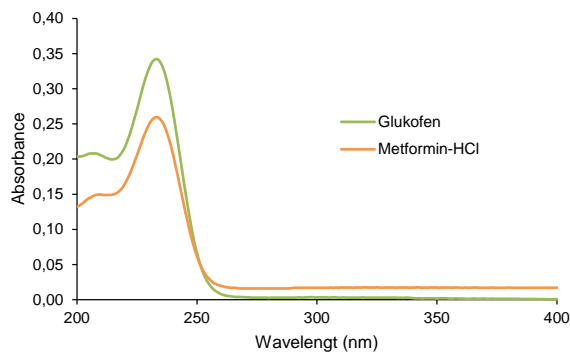


Figure 3. Absorbance of Glukofen and metformin-HCl in diH₂O

In vitro, cytotoxicity assays conducted can aid in identifying cell proliferation or direct cytotoxic effects resulting in cell death when treated with external substances such as drugs [15]. WST-8 reagent was used to determine the percentage of metabolically active cells. Figure 4 shows the viability percentage of Beas-2b cells exposed to Glukofen and metformin-HCl at increasing concentrations. The graph shows that neither Glukofen nor metformin-HCl was toxic on Beas-2b cells. A recent study has also shown that metformin can protect against the acute effects of radiation by reducing the senescence of bronchial-epithelial cells [16]. Glukofen has also influenced the proliferation of cells positively. It can be explained that its combination with excipients may metabolically activate the cells.

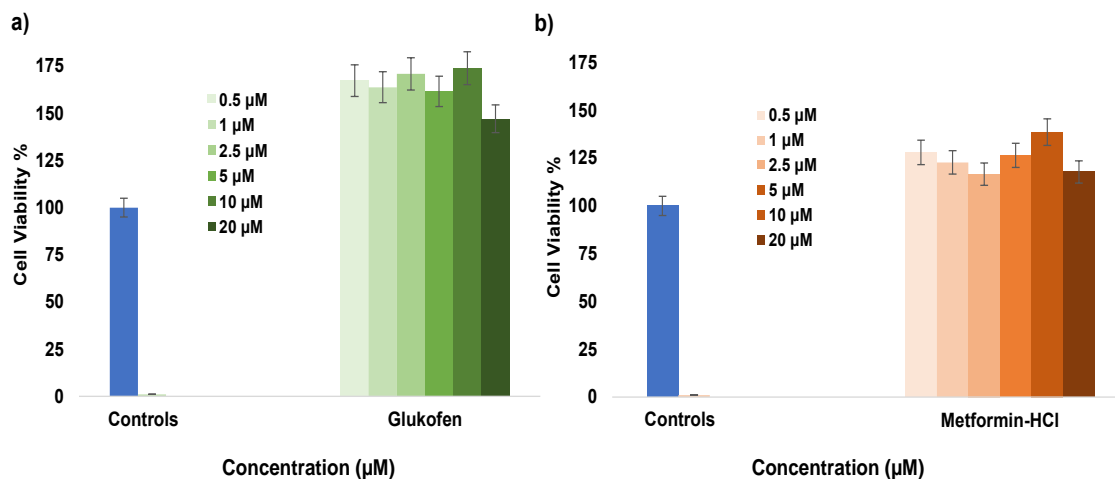


Figure 4: Results of Beas-2b cells cytotoxicity assay for a) Glukofen and b) metformin-HCl

Substances such as drugs can only pass through cell membranes through specific transporters or carriers in the plasma membrane. This is due to their inability to diffuse across the membrane independently. When a substance is taken up by a cell, it increases the cell content/granularity. Metformin, for example, is transported into cells by various organic cation transporters, which have been shown to facilitate the cellular uptake of metformin [17, 18]. In this study, flow cytometry was utilized to monitor the uptake of Glukofen and metformin-HCl into cells comparatively. The laser in flow cytometry has two paths, one along the axis and the other at a 90° angle. The scattered light at two different angles is collected and referred to as forward angle light scattering (FCS) and side angle light scattering (SSC). While the FCS provides information about the cell size, the SSC gives information about the cell granularity (Internal complexity) by comparing it to the control. Therefore, the increasing SSC value on

the histogram means that the cells have higher granularity. Figure 5a shows an SSC shift in the Glukofen treatment with increasing doses. The highest SSC shifts were observed at 10 and 20 μM concentrations, which is a significant finding compared to the control. This indicates that as the Glukofen concentration increased, the cells' granularity also increased. On the Beas-2b cell line, it was observed that the molecules/organelles in the cells also increased with the uptake of Glukofen at increased doses. Therefore, it can be concluded that Glukofen uptake was successfully achieved with these doses on Beas-2b cells. However, in contrast, metformin-HCl uptake by cells was unsuccessful based on the data obtained in this study. As seen in Figure 5b, the SSC shift of metformin-HCl decreases as the concentration increases, in contrast to its drug form, Glukofen. However, no significant difference is observed compared to the control indicating no granularity increase. This observation could be due to the positive charge of metformin at the physiological pH resulting in its strong binding to the proteins in the culture media and preventing them from easily uptake by the cells. However, when metformin is in the drug formulation, several expedients help it to remain stable and uptake by cells easily [19].

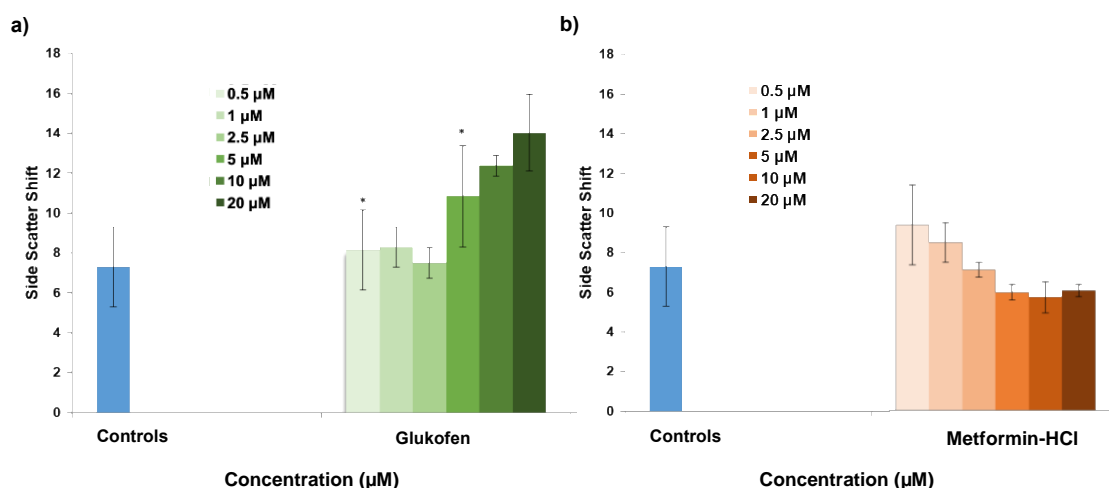


Figure 5. Uptake of a) Glukofen and b) metformin-HCl into Beas-2b cells

Cell morphology is another significant issue for the investigation of the effects of a drug. The morphologies of Beas-2b exposed with Glukofen and metformin-HCl were visualized via brightfield microscopy equipped with a 40X objective after 24 hours of treatment with Glukofen and metformin-HCl. Figure 6 shows adherent Beas-2b cells have a more regular shape, like polygonal. In the control group, the cells are left only in the culture medium without any exposure. When comparing Glukofen and metformin-HCl, it is apparent that as the dose of Glukofen increases, the cells' content expands more than the control group. However, with metformin-HCl, the expansion of cell content is not dependent on the dose increment. Moreover, upon examining the morphology of cells in the control group, it was observed that their shape was altered upon treatment with Glukofen and metformin-HCl. Although the cells remained connected and retained a polygonal shape, they appeared swollen and irregular. As the concentration of the treatments increased, the irregularities in the cell morphology became more pronounced. It can be inferred that the presence of excipients influences the action mechanism of metformin hydrochloride. This is possibly due to the binding of metformin to other excipients influencing the ionization status to help it to be uptake easier by the cells. However, it is challenging easy to elaborate on how and to what degree metformin interacts with the molecular and ionic species in the tablet (see the experimental section). One can easily realize the role of the other molecular and ionic species present in the formulation for cell uptake.

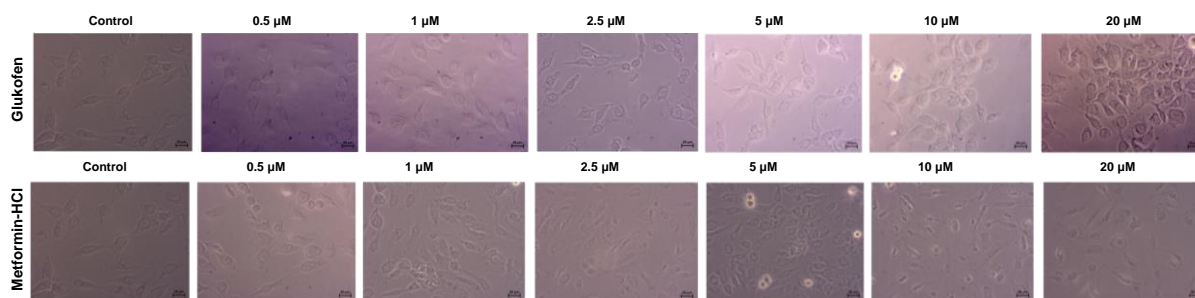


Figure 6. The brightfield microscope images of Glukofen, metformin-HCl, and controls by 40X objective

4. Conclusions

This study is aimed to compare the effects of Glukofen and metformin-HCl on Beas-2b cells *in vitro*. Beas-2b cells were exposed to Glukofen and metformin-HCl at increasing concentrations to determine comparatively which from had a more significant impact on cell viability and uptake. The WST-8 assay and flow cytometry were used for evaluation. While we found that both treatments positively impacted cell viability, Glukofen significantly increased cell proliferation. Both Glukofen uptake and cell viability were raised with the increasing concentration. The metformin-HCl uptake was less with increasing concentration compared to Glukofen. Therefore, it can be concluded that the combination of Metformin-HCl and excipients in Glukofen increases cell viability and its cellular uptake in Beas-2b cells. Further studies on the influence of tablet formulation content on other cellular processes, such as cell cycle and apoptosis, should be investigated to clarify the role of excipients in metformin-based drugs.

Declaration of Ethical Code

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

References

- [1] Katny, M., Frankowski, M. 2016. Impurities in Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47 (3), 187-193
- [2] Jain, D., Basniwal, P. 2013. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 86, 11-35.
- [3] Bardal, S., Waechter, J., Martin, D. 2011. Pharmacokinetics. In S. Bardal, J. Waechter, D. Martin, *Applied Pharmacology* (pp. 17-34). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- [4] Fortunak, J. M., de Souza, R. O., Kulkarni, A. A., King, C. L., Ellison, T., Miranda, L. S. 2014. Active pharmaceutical ingredients for antiretroviral treatment in low- and middle-income countries: a survey. *Antiviral Therapy*, 15-29.
- [5] Fabiano, V., Mameli, C., Zuccotti, G. 2011. Pediatric Pharmacology: Remember the excipients. *Pharmacological Research*, 63 (5), 362-365.
- [6] Hamman, J., Steenekamp, J. 2011. Excipients with specialized functions for effective drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9 (2), 219-230.
- [7] Çubuk, G., İnce, S. 2015. Oral Antidiyabetik İlaçlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 95-102.
- [8] Li, C., Martini, L., Ford, J., & Roberts, M. 2005. The use of hypromellose in oral drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57 (5), 533-546.
- [9] Rowe, R. 1984. Materials used in the film coating of oral dosage forms. *Critical Reports on Applied Chemistry*, 6, 1-36.

- [10] Adeyeye, C., Barabas, E. 1993. Excipient Profile: Povidone. In H. G. Brittain (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* (Vol. 22, pp. 555-585). London: Academic Press.
- [11] Butcher, A., Jones, T. 1972. Some physical characteristics of magnesium stearate. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1P-9P.
- [12] Lerk, C., Bolhuis, G., Smallegenbroek, A., Zuurman, K. 1982. Interaction of tablet disintegrants and magnesium stearate during mixing. II. Effect on dissolution rate. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 282-286.
- [13] Yen, FS., Wei, J.CC., Yang, YC. 2020. Respiratory outcomes of metformin use in patients with type 2 diabetes and chronic obstructive pulmonary disease. *Scientific Reports*, 10, 10298.
- [14] Hinge, M A., Patel, KV. 2016. Development and Validation of Spectrophotometric Method for Metformin and Sitagliptin by Absorbance Ratio Method. *J Pharm Sci Bioscientific Res.* 6(5): 733-739.
- [15] Holley, R. W. 1975. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*, 487-490.
- [16] Hansel, C., Barr, S., Schemann, A.V., Lauber, K., Hess, J., Unger, K., Zitzelsberger, H., Jendrossek, V., Klein, D. 2021. Metformin Protects against Radiation-Induced Acute Effects by Limiting Senescence of Bronchial-Epithelial Cells. *International Journal of Science.* 22, 7064.
- [17] Pandey, P., Balekar, N. 2018. Target-specific Delivery: An insight. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, 117-154.
- [18] Wood, J., Horton, A., Byrne, J., Pedroso, K., Bisnow, M., Auer, R. 1989. *Flow Cytometry: Advanced Research Applications.* (A. Yen, Ed.) Boca Raton, FL: CRC Press.
- [19] Zhang, R., Qin, X., Kong, F., Chen, P., Pan, G. 2019. Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with cell membrane components. *Drug Deliv.* 26(1):328-342.