



TÜRK KLİNİK BİYOKİMYA DERGİSİ

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Türk Klinik Biyokimya Dergisi

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Cilt 18, Sayı 3, 2020 / Volume 18, No. 3, 2020

Kurucu Founder

Oya Bayındır

Sahibi ve Sorumlu Yazı İşleri Müdürü

Türk Klinik Biyokimya Derneği adına

*Owner and Responsible Manager on Behalf of Turkish Society
of Clinical Biochemistry*

Özkan Alataş (Eskişehir Osmangazi Üniv., Tıp Fakültesi, Eskişehir, Türkiye)

Baş Editör Chief Editor

Dilek Özmen (İzmir, Türkiye)

Editörler Editors

Ceyda Kabaroğlu (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)

Ece Onur (Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye)

Sezer Uysal (Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)

Ayşenur Yeğin (Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Antalya, Türkiye)

Yayın Kurulu Editorial Board

- Pınar Akan
- Halide Akbaş
- Figen Narin
- İmge Ergüder

Türk Klinik Biyokimya Dergisi; Index Copernicus Master List, Chemical Abstracts, TÜBİTAK-ULAKBİM
"Türk Tıp Dizini", Türk Medline ve Türkiye Atıf Dizini
(Türkiye Citation Index) kapsamında
yer almaktadır.

Yönetim Yeri

Erzene Mah. 116/2 Sok. No: 10 Bornova/İzmir
Tel: +90 232 343 82 71 Faks: +90 232 339 21 34
E-posta: tkbd@tkbd.org
Web sitesi: www.tkbd.org.tr

Yayının Türü

Dergi, Türk Klinik Biyokimya Derneği yayın
organıdır. Akademik, hakemli dergidir.
Yılda üç kez (Nisan - Ağustos - Aralık)
yayınlanır.

Danışmanlar
Editorial Advisory Board

Abdullah Arpacı, Hatay
Ali Rıza Şişman, İzmir
Aslı Pınar, Ankara
Aslıhan Karul, Aydın,
Asuman Orçun, İstanbul
Ayfer Çolak, İzmir
Ayşe Binnur Erbağcı, Gaziantep
Bahattin Avcı, Samsun
Banu Başok, İzmir
Beyhan Ömer, İstanbul
Burak Çimen, Mersin
Burcu Barutçuoğlu, İzmir
Can Duman, İzmir
Canan Çoker, İzmir
Derya Aldemir, Ankara
Dilek Çımrın, İzmir
Dilek Ülker Çakır, Çanakkale
Duygu Kumbul Doğuç, Isparta
Emel Altekin, İzmir
Emre Sarandöl, Bursa
Evin Ademoğlu, İstanbul
Fatma Taneli, Manisa
Figen Narin, İzmir
Filiz Akbıyık, Ankara
Giray Bozkaya, İzmir
Gültekin Yücel, Antalya

Güneş Ak, İzmir
Halide Akbaş, Antalya
Hülya Aybek, Denizli
Işıl Mutaş, İzmir
Mehmet Köseoğlu, İzmir
Metin Kılınç, Kahramanmaraş
Murat Örmən, İzmir
Neslihan Bukan, Ankara
Osman Çağlayan, Kırıkkale
Özlem Gülbahar, Ankara
Özlem Görüroğlu Öztürk, Adana
Özlem Yavuz, Düzce
Pınar Akan, İzmir
Pınar Tuncel, İzmir
Sara Habif, İzmir
Sebahat Özdem, Antalya
Sembol Türkmen Yıldırım, Giresun
Sevgi Eskiocak, Edirne
Tamer İnal, Adana
Tevfik Noyan, Ordu
Tuncay Küme, İzmir
Tülay Köken, Afyon
Zehra Serdar, Bursa

Basım Yeri

META Basım Matbaacılık Hizmetleri
+ 90 232 343 64 54 Bornova - İzmir
Basım Tarihi: 31/12/2020

Türk Klinik Biyokimya Dergisi

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Cilt 18, Sayı 3, 2020 / Volume 18, No. 3, 2020

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

◆ Nitric Oxide and C-Reactive Protein Levels in Ischemic Stroke

İskemik İnmede Nitrik Oksit ve C-Reaktif Protein Düzeyleri

Sibel Bilgili, Gizem Yalçın, Giray Bozkaya, Nuriye Uzuncan, Arife Erdoğan..... 115

◆ Renal Transplantasyonda Vasküler Kalsifikasyon Belirteçlerinin Prospektif Değerlendirmesi

*A Prospective Evaluation of Vascular Calcification Markers in
Renal Transplantation*

Bilge Karatoy Erdem, Vural Taner Yılmaz, Gültekin Süleymanlar,
Ayhan Dinckan, Halide Akbas 121

◆ D Vitamini Yetersizliği Olan Adölesan Kız Çocuklarında Oksidatif Stres ve Eser Element Düzeyleri

*Oxidative Stress and Trace Element Levels in Adolescent Girls with
Vitamin D Deficiency*

Gürkan ÇIKIM, Metin KILINÇ, Filiz ALKAN BAYLAN 129

◆ Kalp yetmezliği olmayan yüksek ateşli hastalarda NT-proBNP düzeylerinin yüksekliği

Elevation of NT-pro-BNP levels in high fever patients without heart failure

Hacer Koç, Özlem Çakır Madenci, Asuman Orçun, Nihal Yücel, Şeymanur Sağlam, Nurdan Papila Topal	136
♦ Romatoid Artritte Hastalık Aktivitesinin Bir Göstergesi Olarak İskemi Modifiye Albümin <i>Ischemia-modified albumin as a Predictor of the Disease Activity in Rheumatoid Arthritis</i> Ayfer Çolak, Filiz Meryem Sertpoyraz, Anıl Baysol, Elif Merve Girgin, Ali Taylan	144
♦ KLL vakalarında akım sitometri analizi ile κ ve λ hafif zincir ekspresyonlarının değerlendirilmesi <i>Evaluation of κ and λ light chain expressions by flow cytometry analysis in cases of CLL</i> Çiğdem Özdemir, Filiz Yavaşoğlu, Tülay Köken	150
♦ Diyabetik Hastalarda Hemoglobin Subfraksiyonları ve Total Hemoglobinin Değerlendirilmesi <i>Evaluation of Hemoglobin Subfractions and Total Hemoglobin in Diabetic Patients</i> Kadriye Akpınar, Esin Avcı, Süleyman Demir	157
♦ Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda CA 19-9 için Yeni Bir Cut-off Değeri İhtiyacı <i>"The Need for a New Cut-off Value for CA 19-9 in Patients with Type II Diabetes Mellitus"</i> Inanc Karakoyun, Fatma Demet Arslan	165
İÇERİK 2019 (REGISTRY 2020)	171

Nitric Oxide and C-Reactive Protein Levels in Ischemic Stroke

İskemik İnmede Nitrik Oksit ve C-Reaktif Protein Düzeyleri

Sibel Bilgili* Gizem Yalçın* Giray Bozkaya*
Nuriye Uzuncan* Arife Erdoğan**

* Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Bozyaka Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye

** İzmir Çiğli Bölge Eğitim Hastanesi, Acil Tıp, İzmir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 06 Mart 2020

Kabul Tarihi: 19 Aralık 2020

ABSTRACT

Purpose: Nitric oxide(NO) is one of the important substances that are synthesized to keep the blood vessels dilated enough to provide adequate flow and to maintain cerebrovascular homeostasis. C-reactive protein(CRP) is a highly sensitive indicator of inflammation and tissue damage. High CRP concentrations are thought to have effects such as dysfunction of vascular endothelium and decreased NO release. The purpose of this study was to investigate the levels of CRP and NO and to see the correlation of these markers in ischemic stroke patients.

Material and Methods: Fifty ischemic stroke patients and 31 healthy control group were included in this study. Ischemic stroke was differentiated by computerized tomography scan. The patients blood samples were taken at admission to the emergency department, within 24 hours of stroke symptom onset, before any treatment was given. Serum CRP and NO levels were evaluated.

Results: The mean serum NO concentration of the patients (6.52 ± 9.52 $\mu\text{mol/L}$) was significantly lower than control group (20.48 ± 22.17 $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0.01$). Serum CRP levels in patients (13.47 ± 18.58 mg/L) significantly higher than the control group (1.98 ± 1.37 mg/L) ($p < 0.01$). There was no significant correlation between NO and CRP levels ($p > 0.05$).

Conclusion: Although we found decreased NO levels and increased CRP levels in the patients, there was no correlation between these two. The results of this study show NO's possible role in neuroprotection and increased levels of CRP may be associated with ischemic stroke. Further studies are necessary to assess the functional interactions between CRP and NO and their contribution to the pathophysiology of cerebral ischemia.

Key Words: Nitric Oxide, C-Reactive Protein, ischemic Stroke

Sibel Bilgili : 0000-0001-6714-9844
Gizem Yalçın : 0000-0002-3780-6310
Giray Bozkaya : 0000-0002-5756-5796
Nuriye Uzuncan : 0000-0003-1872-0615
Arife Erdoğan : 0000-0003-2488-2012

Sibel Bilgili
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
İzmir Bozyaka Eğitim Ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye
E-mail: sibel.bilgili@yahoo.com.tr

ÖZET

Amaç: Nitrik oksit (NO), kan damarlarını dilate tutarak yeterli akışı sağlayan ve serebrovasküler homeostazın korumasında önemli olabilecek maddelerden biridir. C-reaktif protein (CRP) iltihaplanma ve doku hasarının oldukça hassas bir göstergesidir. Yüksek CRP konsantrasyonlarının vasküler endotelyumun disfonksiyonu ve azalmış NO salınımı gibi etkileri olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı CRP ve NO düzeylerini araştırmak ve bu belirteçlerin iskemik inmeli hastalarda korelasyonunu görmekti.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 50 iskemik inme hastası ve 31 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. İskemik inme bilgisayarlı tomografi taraması ile ayırt edildi. Acil servise başvuruda inme semptomlarının başlamasından 24 saat içinde, herhangi bir tedavi verilmeden önce hastaların kan örnekleri alındı. Serum CRP ve NO düzeyleri değerlendirildi.

Bulgular: Hastaların ortalama serum NO konsantrasyonu (6.52 ± 9.52 $\mu\text{mol/L}$) kontrol grubundan (20.48 ± 22.17 $\mu\text{mol/L}$) anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0.01$). Serum CRP düzeyleri (13.47 ± 18.58 mg/L) kontrol grubundan (1.98 ± 1.37 mg/L) anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.01$). NO ve CRP düzeyleri arasında anlamlı korelasyon yoktu ($p > 0.05$).

Sonuç: Hastalarda NO düzeyleri azalmış ve CRP düzeyleri artmış olsa da, bu ikisi arasında korelasyon tespit edilemedi. Bu çalışmanın sonuçları NO'nin nöroproteksiyondaki olası rolünü göstermektedir ve artmış CRP seviyeleri iskemik inme ile ilişkili olabilir. CRP ve NO arasındaki fonksiyonel etkileşimleri ve serebral iskeminin patofizyolojisine katkılarını değerlendirmek için daha fazla çalışma gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Nitrik Oksit, C-Reaktif Protein, iskemik inme

INTRODUCTION

Stroke is a neurologic dysfunction in focal area of the brain due to interrupted or reduced blood supply. Ischemic stroke is most common (80%–85%) compared to hemorrhagic type (20%–15%) (1).

C-reactive protein (CRP), is a highly sensitive indicator of inflammation and tissue damage. Elevated CRP concentration has been associated with an increased risk of cerebrovascular and cardiovascular events. Many studies have also observed elevated CRP levels in the circulation of patients after acute ischemic stroke. A single measurement of CRP in serum may be a predictor of first or recurrent cerebrovascular events. Also many studies showed that, CRP assay may be important for assessing the acute inflammation and predicting the degree of long-term disability in ischemic stroke patients (2-4).

Nitric oxide (NO) is a principle vasodilator released by the endothelium, maintains cerebrovascular homeostasis and is an important biomarker of inflammation and oxidative stress. Physiological amounts of NO

are neuroprotective, whereas higher concentrations are clearly neurotoxic (5). The CRP has also been associated with endothelial cell dysfunction and progression of atherosclerosis possibly by decreasing NO synthesis. Also it has been suggested that CRP may affect the NO pathway. High CRP concentrations are thought to have effects such as dysfunction of vascular endothelium and decreased NO release (6,7).

The data indicate that in the first 24 hours after ischemic injury, the post-stroke immune response occurs in a time-dependent fashion. Therefore, studies of CRP that have extended the time window beyond 24 hours would not accurately represent baseline inflammatory status. Consequential results were obtained in studies related to NO and CRP levels in ischemic stroke. So the purpose of this study was to investigate the levels of CRP and NO and to see the correlation of these markers in acute ischemic stroke in the early phase.

MATERIAL AND METHODS

50 patients with cerebrovascular infarction and healthy control group of 31 individuals

were included in this study. The study was approved by the ethical committee of the study hospital. Detailed anamnesis of each patient was taken, and neurological and systemic examinations were performed. All patients were examined by a qualified neurologist and ischemic stroke was differentiated by computerized tomography (CT) scan.

Patients with an anamnesis of major renal, hepatic, endocrinological disorders, skeletal disorders, cancerous diseases, cardiac diseases were excluded from this study. We also excluded the patients with recent infections and/or inflammatory events, with a hemorrhagic stroke and subarachnoid hemorrhage. Patients admitted to the hospital 24 hours after stroke symptoms onset were excluded from the study.

Infarct was confirmed on neuroimaging, blood samples for NO and CRP levels were taken within 24 hours of stroke symptom onset. The samples of patients were centrifuged, separated and stored at -80°C for later analysis of NO. A commercial kit using sandwich ELISA method was used to determine serum NO levels (Human nitric oxide ELISA kit Andy Gene Biotechnology, China). Serum CRP levels were measured on Olympus AU 680 autoanalyzer (Beckman Coulter CRP Latex kit). Total cholesterol, LDL, HDL cholesterol and triglyceride levels were estimated by commercially available kits supplied by Beckman Coulter using an Olympus AU 2700 autoanalyzer.

All data were analysed using the statistical software package SPSS Statistics version 21. Kolmogorov Smirnov test was used for to see the normality of the distributions. The data were expressed as mean $\pm$ SD value. Mann-Whitney U test was used to compare means of variables. Correlations were measured with Spearman correlation analysis. Statistical significance level was taken as $p < 0.05$.

RESULTS

Patients (23 women, 27 men) with a mean age of 69.78 ± 12.42 and healthy subjects (15 women, 16 men) without any known disease and drug usage; with a mean age of 50.97 ± 15.15 were included in this study.

The mean serum NO concentrations of the patients and controls are shown in Figure 1.

CRP concentrations of the groups are shown in Figure 2.

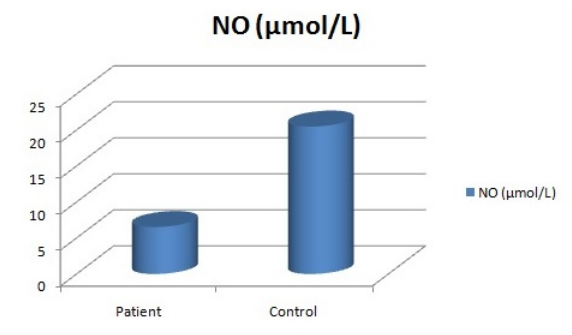


Figure 1. Mean Levels of Serum NO in patients and control group

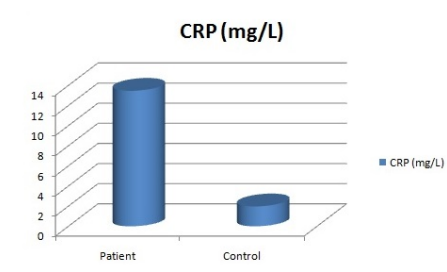


Figure 2. Mean Levels of Serum CRP in patients and control group

Clinical characteristics of stroke patients and controls were shown at Table 1. There were no significant differences between cholesterol, triglyceride and body mass indexes (BMI) of patients and control group levels.

The mean serum NO concentration of the patients was 6.52 ± 9.52 µmol/L and the control group was 20.48 ± 22.17 µmol/L and there was a statistically significant difference between them ($p < 0.01$).

Table 1. Clinical characteristics of stroke patients and controls

	Patients (n=50)	Controls (n=31)
Age	69.78 ± 12.42	50.97 ± 15.15
Male/female	27/23	16/15
Total cholesterol (mg/dl)	189.8±40.55	182.94±36.5
Triglycerides (mg/dl)	143.5±76.93	136.42±69.16
HDL cholesterol (mg/dl)	41.72±11.63	53.45±12.60
LDL cholesterol (mg/dl)	123.22±29.70	104.45±31.76
BMI (kg/m2)	24.2±1.9	24.1±1.7

Age, total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglycerides, body mass index levels are given as mean±SD.

In the comparison of serum CRP levels, the mean value in patients (13.47 ± 18.58 mg/L) was significantly higher than the control group (1.98 ± 1.37 mg/L) ($p < 0.01$).

There was no significant correlation between NO and CRP levels ($p=0.737$, $r=0.049$).

DISCUSSION

Cerebrovascular disease is one of the most common cause of death worldwide and the pathogenesis of stroke need to be further studied. Several studies in different populations have demonstrated that an elevated level of plasma CRP in healthy individuals is a strong predictor of future cerebrovascular and cardiovascular events. Also, the CRP levels have been reported to be elevated in the blood circulation of patients after acute ischemic stroke in some studies (8-12).

Elevated CRP levels secondary to brain damage through activation of the complement system was also detected in animal models of focal cerebral ischemia (13). Previous studies have assessed the value of CRP in the early phase of stroke as a prognostic factor for functional outcome. Most of these studies were small and tested the association between CRP and mortality rather than outcome (14,15). The largest study was carried out by Ladenvall et al. employing 600 patients and 600 controls in a Swedish population (16).

A study by Winbeck et al. documented raised CRP in 127 patients without thrombolysis with a first ischemic stroke no more than 12 h after the symptom onset. They also noticed a CRP increase between 12 and 24 h after symptom onset predicts an unfavorable outcome (17). Also, Kumar et al. found that the hs-CRP level is significantly higher in ischemic strokes and by its elevation within 72 h of symptom onset was a bad prognostic indicator. Elevated hs-CRP values were a risk factor in association with other risk factors such as diabetes/ hypertension (18). Anusha et al. found that CRP was elevated in 60 patients with stroke and patients with elevated CRP had increased risk of mortality. (19). Two prospective studies did not find an association between the CRP levels obtained within 6 or 12 h after symptom onset and death or dependency at follow-up (17,20). In the present study, our result was compatible with most of the other studies. CRP was measured after CT confirmation and within 24 h of onset of symptoms and we found that CRP was elevated in patients compared to control group significantly ($p < 0.01$).

NO has a dual identity including neuroprotection and neurotoxicity during ischemia reperfusion (21). Increased NO metabolite concentration in cerebrospinal fluid has been associated with a greater brain injury and early neurological deterioration. However, endothelium-derived NO has been shown to be beneficial in experimental stroke, and it has been

suggested that administration of NO might be beneficial in acute stroke (22).

In this study, the serum levels of NO were found to be significantly lower in stroke patients in comparison with controls indicating oxidative stress ($p < 0.01$). However, Rajeshwar et al. found that CRP and NO levels were significantly elevated in stroke patients in comparison with controls and they predict the incidence of ischemic stroke and CRP is an independent prognostic factor of poor outcome at 3 months (23). The significant increase in NO in patients studied within the first 24 h from stroke onset in comparison to controls is also reported by El Kossi and Zakhary (24). Also Castillo et al. and Ayg  l et al. reported higher NO levels in ischemic stroke patients (22,25). But Rashid et al. assessed plasma NO levels in patients with acute stroke and their association with both severity and outcome and they found

NO levels lower in ischemic stroke patients like us (26). Similarly, Cano et al. reported significantly decreased NO levels in thrombotic stroke patients compared with control subjects (27).

Although we found decreased NO levels and increased CRP levels in the patients, there was no significant correlation between these two ($p > 0.05$).

The results of this study show NO's possible role in neuroprotection. Endothelial NO loss may be the central mechanism in the pathogenesis of endothelial dysfunction in ischemic stroke patients. Also increased levels of CRP may be biomarker for cerebrovascular infarction. Further studies are necessary to assess the functional interactions between CRP and NO and their contribution to the pathophysiology of cerebral ischemia.

REFERENCES

- Chunyan F, Bin L, Juanjuan Z, Ren Z, Rujie W, Xiaopeng Z et al. Blood biomarkers in ischemic stroke: Role of biomarkers in differentiation of clinical phenotype. *European Journal of Inflammation* 2018; 16: 1-10.
- Arenillas J.F, Alavarez-sabin J, Molina C.A, Chacon P, Montaner J, Rovira A et al. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischaemic attack or stroke patients with intracranial large artery occlusive disease. *Stroke* 2003; 34(10): 2463-8.
- Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C et al. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke* 2005; 36(6): 1316-29.
- VanGilder RL, Davidov DM, Stinehart KR, Huber JD, Turner RC, Wilson KS et al. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. *J Clin Neurosci*. 2014; 21(4): 547-53.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8: 766-75.
- Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology* 2018; 9:754.
- Miralles, J.D, Martínez-Aguilar E, Florez A, Varela C, Bleda S, Acin F. Nitric oxide: link between endothelial dysfunction and inflammation in patients with peripheral arterial disease of the lower limbs. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 2009; 9(1): 107-12.
- Tsuda K. C-reactive protein and nitric oxide production in ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40(6): e471.
- Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack. The Framingham study. *Stroke* 2001; 32(11): 2575-79.
- Arenillas JF, Alavarez-Sabin J, Molinaatal CA, Chacon P, Montaner J, Rovira A. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischaemic attack or stroke patients with intracranial large artery occlusive disease. *Stroke* 2003; 34(10): 2463-8.
- Di Napoli M, Papa F, Bocola V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32: 133-8.
- Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM et al. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2003; 139(1-2): 93-101.
- Gill R, Kemp JA, Sabin C, Pepys MB. Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2004; 24(11): 1214-8.

14. Christensen H, Boysen G. C-reactive protein and white blood cell count increases in the first 24 hours after acute stroke. *Cerebrovascular Diseases* 2004; 18(3): 214–9.
15. Montaner J, Fernandez-cadenas I, Molina CA, Ribó M, Huertas R, Rosell A et al. Post stroke C-reactive protein is a powerful C-Reactive Protein and Nitric Oxide Levels in Ischemic Stroke 983 prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke* 2006; 37(5): 1205–10.
16. Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, Nilsson S, Jern C, Ladenvall P. Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke* 2006; 37: 2018–23.
17. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, Conrad B, Sander D. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33: 2459–64.
18. Kumar S, Kumar GA. Evaluation of the Role of Plasma High Sensitivity C-reactive Protein Levels as a Prognostic and Diagnostic Marker in Acute Ischemic Stroke. *International Journal of Scientific Study* 2016; 4(2): 148-153.
19. Anusha R, Vijaykumar GW, Devarmani SS, Kattimani R, Inamdar SAH. A Study of C - reactive protein in Acute Ischemic Stroke. *Annals of International Medical and Dental Research* 2020; 6(2): 39.
20. Topakion R, Strasak AM, Nuss baumer K, Haring HP, Aichner FT. Prognostic value of admission C-reactive protein in stroke patients undergoing iv thrombolysis. *Journal of Neurology* 2008; 255(8): 1190–6.
21. Chen ZQ, Mou RT, Feng DX, Wang Z, Chen G. The role of nitric oxide in stroke. *Med Gas Res.* 2017; 7(3): 194–203.
22. Castillo J, Rama R, Davalos A. Nitric oxide related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 852 – 7.
23. Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Babu MS, Balakrishna N, Sharma V et al. C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome. *Inflammation* 2012; 35(3):978-84.
24. El Kossi MMH, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 2000; 31: 1889 – 92.
25. Aygöl R, Kotan D, Demirbas F, Ulvi H, Deniz O. Plasma Oxidants and Antioxidants in Acute Ischaemic Stroke. *The Journal of International Medical Research* 2006; 34: 413 – 8.
26. Rashid, PA, Whitehurst A, Lawson N, Bath PM. Plasma nitric oxide (nitrate/nitrite) levels in acute stroke and their relationship with severity and outcome. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2003; 12(2): 82–7.
27. Cano CP, Bermudez VP, Atencio HE, Medina MT, Anilsa A, Souki A. Increased serum malondialdehyde and decreased nitric oxide within 24 hours of thrombotic stroke onset. *Am J Ther* 2003; 10: 473 – 6.

A Prospective Evaluation of Vascular Calcification Markers in Renal Transplantation

Renal Transplantasyonda Vasküler Kalsifikasyon Belirteçlerinin Prospektif Değerlendirmesi

Bilge Karatoy Erdem*

Vural Taner Yılmaz**

Gültekin Süleymanlar**

Ayhan Dinçkan***

Halide Akbas*

* Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, Antalya, Türkiye

*** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Başvuru Tarihi: 16 Ekim 2020

Kabul Tarihi: 05 Aralık 2020

ABSTRACT

Aim: The evaluation of biomarkers linked with inhibition and activation of vascular calcification in pre and post renal transplant period in renal transplant recipients was aimed in this research.

Patients and Methods: 35 recipients who had undergone living-donor kidney transplantation were included. Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D3, serum 25-hydroxyvitamin D3, calcium, phosphorus, inorganic pyrophosphate (PPI), osteoprotegerin (OPG), alpha-2 heremans-schmid glycoprotein (Fetuin-A), alkaline phosphatase (ALP), bone morphogenic protein-2 (BMP-2), creatinine, parathyroid hormone (PTH) levels were analyzed immediately before and 6 months after transplantation. Statistical analysis was done using SPSS version 20.0.

Results: This research reported that vitamin D deficiency continues independently of renal function in renal transplant recipients. Despite the low levels of vitamin D, its active form was increased with the improvement of renal function. It also observed that PPI and Fetuin-A levels increase, OPG and ALP levels decrease with the improvement of graft function.

Conclusion: Serum biomarkers could serve as important indicators of vascular calcification in renal transplant recipients. The increase in serum levels of OPG and ALP, which are thought to play a role as activators in the calcification process in patients with Chronic Kidney Disease may be beneficial in early detection of calcification. Further larger studies are required to evaluate time-dependent changes after renal transplantation.

Key Words: renal transplant, vascular calcification, biomarkers, Fetuin A, PPI

Bilge Karatoy Erdem	0000-0003-3594-0759
Vural Taner Yılmaz	0000-0002-1313-8856
Gültekin Süleymanlar	0000-0001-7935-6402
Ayhan Dinçkan	AAO-2633-2020
Halide Akbas	0000-0003-2191-1789

Yazışma adresi: Halide S. Akbaş
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya
Anabilim Dalı,
Antalya, Türkiye
E-posta: halideakbas@akdeniz.edu.tr

ÖZET

Amaç: Bu araştırmada renal transplant alıcılarında, renal transplant öncesi ve sonrası dönemde vasküler kalsifikasyonun inhibisyonu ve aktivasyonu ile ilişkili biyobelirteçlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntemler: Canlı donörden renal transplantasyon yapılan 35 hasta araştırmaya dahil edildi. Plazma 1,25-dihidroksivitamin D3, serum 25-hidroksivitamin D, kalsiyum, fosfor, inorganik pirofosfat (PPI), osteoprotegerin (OPG), alfa-2 heremans-schmid glikoprotein (Fetuin-A), alkalen fosfataz (ALP), kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), kreatinin, paratiroid hormon (PTH) seviyeleri, transplantasyondan hemen önce ve 6 ay sonra analiz edildi. İstatistiksel analizler için SPSS 20.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Bu araştırma renal transplant alıcılarında D vitamini eksikliğinin greft fonksiyonundan bağımsız olarak devam ettiğini bildirmiştir. Düşük D vitamini seviyelerine rağmen, greft fonksiyonunun düzelmesiyle aktif D vitamini formu artmıştır. Ayrıca greft fonksiyonunun düzelmesiyle PPI ve Fetuin-A düzeylerinin arttığı, OPG ve ALP düzeylerinin ise azaldığı gözlemlenmiştir.

Sonuç: Serum biyobelirteçleri, renal transplant alıcılarında vasküler kalsifikasyonun önemli göstergeleri olarak hizmet edebilir. Kronik böbrek hastalarında kalsifikasyon sürecinde aktivatör olarak rol oynadığı düşünülen serum OPG ve ALP düzeylerindeki artış, kalsifikasyonun erken tespitinde faydalı olabilir. Renal transplantasyondan sonra zamana bağlı değişiklikleri değerlendirmek için daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: renal transplantasyon, vasküler kalsifikasyon, biyobelirteçler, Fetuin A, PPI

INTRODUCTION

Renal transplantation is an ideal treatment for end-stage renal failure. However, it suffers from certain limitations of its own including adverse effects such as increased incidence of infectious diseases, tumor development due to the necessity of a lifelong immunosuppressive therapy and graft function failure.

A literature review revealed that cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of mortality in renal transplant recipients. Mineral-bone disorders and the subsequent vascular calcification, are the leading factors contributing towards cardiovascular morbidity and mortality in chronic kidney disease (CKD) population (1, 2). Secondary hyperparathyroidism remains the upmost important contributor related to vascular calcification in CKD patients. However, there exists substantial gap in present day understanding of the exact mechanism of the uremic calcification process. In previous years, vascular calcification was thought to be associated with serum calcium-phosphorus balance, but recent studies have shown that many minerals (such as citrate, magnesium) and specific proteins also play a role in the pathogenesis

of vascular calcification (3). Activators and inhibitors involved in this pathogenesis regulate the process by virtue of complex mechanisms. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) and Alkaline Phosphatase (ALP) are considered as activators; whereas, Osteoprotegerin (OPG), Alpha-2 Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin-A) and inorganic Pyrophosphate (PPI) are considered as inhibitors of this process. Furthermore, ALP, Osteopontin (OPN), Bone Sialoprotein and proteins such as type I collagen have been found to be associated with calcification in vascular smooth muscle cells (4). There exists scarce literature in context of vascular calcifications in renal transplant recipients. Some authors have reported a trend toward normalization of calcification inhibitors (Fetuin A, matrix Gla protein and OPG) serum levels after transplantation (5).

Vitamin D has been linked with the acceleration of the vascular calcification phenomenon and its levels has been shown to correlate well with the vascular calcification intensity (6). In addition, uremia also stimulates proinflammatory cytokine release. The cytokines such as TNF- α (tumor necrosis factor- α) lead to matrix mineralization in vascular muscle cells of

experimental animals by increasing ALP activity (6).

Previous studies regarding the vitamin D analogues have shown conflicting effects on vascular calcification and cardiovascular organization (7). Additionally, vitamin D has been proven as potent preventer of vascular calcification by inhibiting BMP-2 expression (8).

As the progression of vascular calcification in renal transplant recipients is not homogeneous and is influenced by several factors, some of which still not widely studied till date. The aim of this study was to evaluate the relationship between calcification activators and inhibitors before and 6 months after renal transplantation.

PATIENTS AND METHODS

Adult renal transplant recipients, registered at the kidney transplantation unit, at Akdeniz University Medical Faculty Organ Transplantation Center between March 2013-March 2015, were included in this single-center prospective study. The study was conducted in accordance with the ethical standards of our Institutional Ethics Committee (Approval number: 461) and with the Helsinki Declaration, and all patients provided written informed consent. Patients who had transplantation from a cadaveric donor, malignancy, combined (pancreas or liver) transplantation, graft failure related to surgical causes were excluded. The kidney graft recipients were treated according to our center protocol which include Tacrolimus, mycophenolate mofetil, basiliximab/everolimus/sirolimus. Blood samples were collected before and 6 months after surgery. Estimated Glomerular filtration rates (eGFR) were calculated by "Chronic Kidney Disease Epidemiology" (CKD-EPI) Formula implementing the values of patients serum creatinine (10).

All blood samples were centrifuged and stored at -80 °C until analysis. Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels and serum 25-hydroxyvitamin D₃, calcium, phosphorus, PPI, OPG, Fetuin A, ALP (tissue non-specific

alkaline phosphatase), BMP-2 levels were analyzed.

1,25-dihydroxyvitamin D₃ Analysis by LC-MS/MS

1,25-dihydroxyvitamin D₃ measurements were completed by using a triple quadrupole LC-MS/MS instrument. A commercial kit (1,25(OH)₂D₃/D₂ ImmuTube LC/MS/MS Kit, Immundiagnostik AG, Catalog No. KM1000, Bensheim, Germany) was used. This assay is based on the quantitative measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ after extraction steps. A LCMS-8040 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Japan) combined with ultra fast liquid chromatography (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan) was used by multiple reaction monitoring (MRM) method with positive electrospray ionization (ESI).

Two different solvents were used for the mobile phase, Mobil Phase A and Mobil Phase B, and 1,25(OH)₂D₃-d₆ with isotope labeling was used as the internal standard. A multiple-reaction monitoring (MRM) transition and internal standard data were obtained for each analyte. m/z values were found to be 399.11/134.58 for 1,25(OH)₂D₃; 405.21/134.68 for 1,25(OH)₂D₃-d₆ (internal standard). A column of Raptor™ ARC-18 (100 × 2.1 mm, 2.7 μm particle size) was used for chromatographic separation. The flow rate of the device was 0.3 mL/min, the column temperature was 45 °C and the injection volume was 50 μL, gradient program solvent B was 10% (0.01-2.49 min), 100% (2.5-3.5 min), 10% (3.51-6 min). Analysis and column cleaning time was 6 min for each sample.

25-Hydroxyvitamin D, Calcium and Phosphorus Analysis

Serum 25(OH)D levels were measured by the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method on the COBAS E-602 autoanalyzer using the Vitamin D Total commercial kit (Roche Diagnostics, Germany).

Serum calcium and phosphorus levels were measured by using colorimetric commercial

kits in the COBAS 8000 autoanalyzer (Roche Diagnostics, Germany).

PPi Analysis

Serum PPi levels were measured by fluorometer (BioTek, SynergyMx, USA) using fluorometric ABCAM Pyrophosphate Assay kit (Cat. No: ab112155).

OPG, Fetuin-A, ALP and BMP-2 Analysis

Serum OPG levels were measured using YEHUA Human Osteoprotegerin (OPG) ELISA kit (Cat. No. YHB2218 Hu). Serum fetuin-A levels were measured using QUANTIKINE ELISA Human Fetuin A Immunassay kit (Cat. No. DFTA00). Serum ALP levels were measured using YEHUA Human Alkaline Phosphatase (ALP) ELISA kit (Cat.No: YHB0138Hu). Serum BMP-2 levels were measured using YEHUA Human Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) ELISA kit (Cat. No. YHB0498Hu).

Statistical analysis

All statistical analysis were done using SPSS version 20.0. Kolmogorov-Smirnov test was performed to assess deviation from normal distribution. Quantitative variables were summarized as mean and standard deviation (SD), or as median. Student t test or the Mann-Whitney's U test was used for comparison of continuous variables between groups. Differences in the levels of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃, calcium, phosphorus, PPi, OPG, Fetuin A, ALP and BMP-2 between the groups were examined before and after transplantation. Pearson correlation analysis was performed for the parameters fit the normal distribution, and Spearman Rank correlation analysis was performed for the parameters not fit the normal distribution. A p value of 0.05 was considered significant.

RESULTS

A total of 35 patients were registered for renal transplant during the study period. After excluding patients (n=5) who had transplantation from a cadaveric donor, malignancy, combined (pancreas or liver) transplantation, graft failure related to surgical cuses, 30 patients were included in the final study analysis. Age of patients was 40.30 ± 12.86 years (mean $\pm$ SD, age range: 19-70). There were 20 (66.7%) male and 10 (33.3%) female patients. 12 patients received hemodialysis (HD), 5 patients received peritoneal dialysis (PD) treatment before transplantation. The preemptive kidney transplantation was carried out for 13 patients.

Table 2 summarizes the serum creatinine, phosphorus, calcium, PTH, 25(OH)D, 1,25(OH)₂D₃, ALP, PPi, OPG, BMP-2, Fetuin A levels and eGFR values in patients before and after transplantation. 1,25(OH)₂D₃ and 25(OH)D levels showed a significant increase due to the improvement of kidney function after transplantation ($p \leq 0.0001$, $p = 0.0003$ respectively) (Table 2). Serum creatinine, phosphorus and ALP levels significantly decreased after transplantation, while calcium levels increased. Serum PTH levels were significantly lower after transplantation, but still above the reference ranges. We did not find any significant difference BMP-2 levels before and after transplantation. On the other hand, significant differences were observed for PPi, OPG and Fetuin A levels before and after transplantation. The percentage of recipients with vitamin D deficiency (<15 ng/mL) was 87 % before transplantation, which exhibited a downward trend to 73 % six months after transplantation. Furthermore, vitamin D insufficiency (15-30 ng/mL) was detected in 13 % before transplantation and in 27 % after 6 months.

Table 1. Demographic features of all patients.
Tablo 1. Tüm hastaların demografik özellikleri.

	All patients
Recipient age (year)	40.30±12.85
Donor age (year)	41.43±12.82
Gender (F/M) (%)	10/20 (66.7/33.3)
BMI (kg/m ²)	23.74± 4.76
Type of Renal Replacement Therapy	n(%)
PD (%)	5 (17)
HD (%)	12 (40)
Preemptive (%)	13 (43)
The Etiologies of End Stage Renal Disease	n(%)
Glomerulonephritis (%)	5 (16.67)
Diabetes Mellitus (DM) (%)	4 (13.33)
Hypertension (%)	3 (10)
Vesico Urethral Reflux (%)	3 (10)
Polycystic Kidney Disease (%)	3 (10)
Etiology unknown (%)	9 (30)
Other (%)	3 (10)
Total (%)	30 (100)

Results are expressed as numbers and percentages.
 PD, peritoneal dialysis; HD, hemodialysis.

Correlation analyzes were performed in order to evaluate the relation between parameters before and after transplantation. All significant correlations are depicted in Table 3.

DISCUSSION

Vascular calcifications have been revealed to be strongly associated with cardiovascular events in patients with renal transplantation. The mechanisms underlying vascular calcifications are multifactorial and incompletely understood. The aim of our study was to reveal possible interactions of vascular calcification activators and inhibitors in the early post-transplantation period. Furthermore, the relationship between vitamin D status and vascular calcification activators (BMP-2, ALP) and inhibitors (PPI, OPG and Fetuin-A) were investigated.

Vitamin D deficiency is associated with vascular calcification in patients with CKD. Wang et al. found that the frequency of vascular calcification was significantly higher in hemodialysis patients with low 25-hydroxyvitamin D levels in comparison to patients with normal levels. They also reported that 25-hydroxyvitamin D levels were negatively correlated with the calcification score (11). A long-term administration of vitamin D to patients with

CKD was found to induce vascular calcification. On the other hand, there is increasing evidence suggesting that calcitriol increases vitamin D receptor (VDR) expression in vascular smooth muscle cells. VDR also modulates cell proliferation and differentiation. Calcitriol has been also shown to induce of osteopontin (OPN) expression, which is a local inhibitor of vascular calcification, in vascular smooth muscle cells. It was also reported that calcitriol may lead to calcification by increasing the RANKL / OPG ratio (6).

In our study, both 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels were increased significantly after transplantation in line with previous studies (12). It can be expected that improvement in renal function after transplantation is associated with this increment.

In a study by Renneberg et al. OPG elevation was associated with coronary artery calcification progression 1 year after transplantation (4). However it is still uncertainty whether OPG is a marker of atherosclerosis or an active component of atherosclerotic process. Most studies have shown that cardiovascular events are inversely related to serum RANKL and positively related to serum OPG (13). Serum OPG levels decreased after transplantation in

our study ($p=0.007$). These data could support that high OPG levels may be a predictor for cardiovascular events in CKD.

Dalfino et al. reported that BMP-2 is negatively associated with renal function in a study conducted in CKD patients and also they found a moderately positive correlation between BMP-2 and vascular stiffness in CKD patients (14). In our study, glomerular filtration rate improved by renal transplantation did

not have a significant effect on BMP-2 (Table 2). On the other hand, a strong positive correlation between BMP-2 and OPG was found in our study which may suggest that BMP-2 could be a component of the calcification process in both periods of transplantation (Table 3). Further investigations with larger sample size are required to elucidate the role of serum BMP-2 levels in renal transplant patients.

Table 2. Comparison of the parameters of renal transplant recipients measured before and 6 months after transplantation.

Tablo 2. Renal transplant alıcılarının nakil öncesi ve nakil sonrası 6. ayda ölçülen parametrelerinin karşılaştırılması.

Parameters	Pre-transplant	Post-transplant	<i>p</i>
1,25(OH)₂D₃ (pg/mL)	43.70±14.15	68.48±18.35	≤0.0001
25(OH)D (ng/mL)	5.80±4.28	10.96±5.50	0.0003
Ca (mg/dL)	8.38±0.87	9.08±0.50	≤0.0001
P (mg/dL)	4.78±1.10	2.90±0.62	≤0.0001
CaxP	39.89±9.88	26.38±6.26	≤0.0001
PTH (pg/mL)	424.04±399.30	116.59±82.30	≤0.0001
Creatinine (mg/dL)	8.94±2.85	1.21±0.29	≤0.0001
eGFR (mL/min)	6.80±2.55	73.17±20.10	≤0.0001
ALP (U/L)	112.63±40.45	90.77±23.42	0.011
PPI (μM)	1.27±0.50	1.79±1.23	0.03
OPG (ng/mL)	3.10±0.85	2.30±1.31	0.007
Fetuin A (ng/mL)	792.80±119.55	897.69±155.05	0.006
BMP-2 (ng/mL)	3.158±0.76	3.239±0.61	0.333

$p<0.05$ was accepted as significant and marked as bold.
Data are given as mean±standard deviation.

Table 3. Significant correlations of parameters measured before and after renal transplantation.

Tablo 3. Renal transplantasyon öncesi ve sonrasında ölçülen parametrelerin anlamlı korelasyonları.

PRE-TRANSPLANT CORRELATIONS (r)								
	1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D	Fetuin-A	PPI	OPG	BMP-2	ALP	Creatinine
1,25(OH)₂D₃		0.317	-0.422					0.509
25(OH)D	0.317			0.390	0.317	0.397	-0.339	0.286
Fetuin-A	-0.422			-0.478	-0.500	-0.444	0.485	-0.721
PPI		0.390	-0.478		0.715	0.716	-0.781	0.701
OPG		0.317	-0.500	0.715		0.827	-0.853	0.516
BMP-2		0.397	-0.444	0.716	0.827		-0.837	0.500
ALP		-0.339	0.485	-0.781	-0.853	-0.837		0.643
Creatinine	0.509	0.286	-0.721	0.701	0.516	0.500	-0.643	
POST-TRANSPLANT CORRELATIONS (r)								
	1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D	Fetuin-A	PPI	OPG	BMP-2	ALP	Creatinine
1,25(OH)₂D₃								0.755
25(OH)D				0.603	0.513	0.465	-0.626	0.306
Fetuin-A				-0.395	-0.397	-0.335	0.548	-0.819
PPI		0.603	-0.395		0.721	0.667	-0.799	0.721
OPG		0.513	-0.397	0.721		0.865	-0.781	0.696
BMP-2		0.465	-0.335	0.667	0.865		-0.714	0.639
ALP		-0.626	0.548	-0.799	-0.781	-0.714		-0.813
Creatinine	0.755	0.306	-0.819	0.721	0.696	0.639	-0.813	

$p<0.05$ was accepted as significant.

Additionally, serum Fetuin-A reacts as a negative acute phase glycoprotein in down-regulated acute and chronic inflammatory states. In CKD patients, serum Fetuin-A levels are significantly lower than in controls and are associated with increased vascular calcification and inflammation and consequently high cardiovascular mortality (15). Few data are available regarding the effect of Fetuin-A in renal transplant recipients. Study of Mehrsai et al. showed that Fetuin-A levels increased after transplantation (16). Lorenzen et al. found that serum Fetuin A levels exhibited specific time-dependent changes after transplantation, but no significant change in patients with graft calcification (17). It can be expected that improvement in renal function after kidney transplantation is associated with increased serum levels of Fetuin A. Therefore we hypothesized that serum fetuin A concentrations increase with time after renal transplantation and our results are in line with this hypothesis ($p=0.006$). In addition, there was a strong inverse correlation with fetuin and creatinine in both periods of transplantation (Table 3).

A comparison of circulating PPI levels and vascular calcification in CKD patients revealed that plasma PPI is negatively associated with vascular calcification in CKD (18). In our study, plasma PPI levels are increased after transplantation ($p=0.03$). However, there was a significant correlation between plasma PPI and serum BMP-2 and OPG levels in both periods of transplantation (Table 3). Considering that uremic vascular calcification has multifactorial etiology, it may be thought that the effect of increase in plasma PPI levels may be a defense mechanism against increased risk of calcification.

ALP is considered a sign of bone metabolism in individuals with CKD. Tissue non-specific ALP inactivates PPI, the endogenous inhibitor of hydroxy apatite formation that causes medial calcification. In our study, there was a strong negative correlation between ALP and PPI in both periods of transplantation. These findings also support that ALP inhibits PPI. In

our study, serum ALP levels were significantly lower after transplantation, whereas PPI levels after transplantation showed a significant increase, which may indicate that the risk of calcification is reduced.

Thus to conclude, our results revealed that in renal transplant recipients, vitamin D deficiency continues independently of renal function. Despite the low levels of vitamin D, its active form was increased with the improvement of renal function. According to this study, it may be possible to think that PPI, Fetuin A and vitamin D as inhibitors; OPG and ALP as activators in the calcification process. The change in these parameters, which is seen with improvement of the graft function, may suggest that it decreases the risk of calcification after transplantation.

In addition to these results, it was observed that serum/plasma vitamin D, PPI and Fetuin-A levels increase, OPG and ALP levels decrease with the improvement of graft function. The increase in serum levels of OPG and ALP, which are thought to play a role as activators in the calcification process in CKD patients, may be beneficial in early detection of calcification.

In summary, we observed that in renal transplant recipients, the important markers of vascular calcification risk were significantly associated with the improvement of graft function except BMP-2. The present study has several limitations; for example, relatively small sample size may be insufficient to allow exploration of the potential relationships between parameters and vascular calcification risk. Further larger studies are required to evaluate time-dependent changes after renal transplantation.

CONCLUSION

Detection of vascular calcification is complex and asymptomatic in early stages of CKD. Therefore, selected biomarkers would be valuable and clinically important in non-invasive monitoring of early signs of vascular calcification owing to the significant differences observed in this study. Larger scale studies in this context are required to

support our findings and improve CKD outcomes.

Disclosure Statement

Coauthors report that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study is supported by Turkish Scientific and Technological Research Center (TUBITAK), project no. 2014S608.

REFERENCES

1. Derici U, Nahas M. Vascular Calcifications in Uremia: Old Concepts and New Insights. *Seminars in Dialysis* 2006; 19(1):60-68.
2. Ahmed S, Jafri L, Khan AH. Evaluation of CKD-EPI Pakistan equation for estimated glomerular filtration rate (eGFR): a comparison of eGFR prediction equations in Pakistani population. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 2017;27(7):414.
3. Kakani E, Elyamny M, Ayach T, El-Husseini A. Pathogenesis and management of vascular calcification in CKD and dialysis patients. *Seminars in Dialysis* 2019; 00:1-9.
4. Rennenberg RJ, Schurgers LJ, Kroon AA, Stehouwer CD. Arterial calcifications. *J Cell Mol Med* 2010; 14:2203-10.
5. Viegas C, Araújo N, Marreiros C, Simes D. The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in Chronic Kidney Disease (CKD): challenging old concepts with new facts. *Aging (Albany NY)* 2019; 11(12):4274-4299.
6. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1453-1464.
7. Drüeke T, Massy Z. Role of Vitamin D in Vascular Calcification: Bad or Good Guy? *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:1704-1707.
8. Hou Y, Liu W, Zheng C, Zheng J, Yen T, Lu K. Role of Vitamin D in Uremic Vascular Calcification. *BioMed Research International* 2017; Special Issue, Article ID 2803579.
9. Chau K, Martinez G, Elder G. Vascular Calcification in Patients Undergoing Kidney and Simultaneous Pancreas-Kidney Transplantation. *Nephrology* 2014; 19:275-281.
10. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease 2013;(3):1.
11. Wang F, Wu S, Ruan Y, Wang L. Correlation of serum 25-hydroxyvitamin D level with vascular calcification in hemodialysis patients. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(9): 15745-15751.
12. Karatoy Erdem B, Yılmaz VT, Suleymanlar G, Ozcan F, Baykal A, Akbas H. The relationship between vitamin D status and graft function in renal transplant recipients. *Int J Med Biochem* 2018;1 (1):1-5.
13. Melaku L, Mossie A. Molecular mediators and controlling mechanism of vascular calcification. *International Journal of Clinical and Experimental Physiology* 2017; 4(1): 3-14.
14. Dalfino G, Simone S, Porreca S, Cosola C, Balestra C, Manno C, et al. Bone morphogenetic protein-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 2010; 211:418-423.
15. Mann A, Makkar V, Mann S, Dhamija P, Soundarajan P. Fetuin-A and vascular calcification in Indian end-stage renal disease population. *Indian J Nephrol* 2016; 26(1):33-8.
16. Mehra A, Pourmand G, Tehrani H, Keyhan H, Rahmati RM, Ahmadi A, et al. Association of Serum Fetuin-A Levels with Allograft Outcome in Renal Transplant Recipients. *Urol J* 2015; 12(3):2182-2186.
17. Lorenzen JM, Martino F, Scheffner I, Bröcker V, Leitolf H, Haller H, et al. Fetuin, Matrix-Gla Protein and Osteopontin in Calcification of Renal Allografts. *Plos One* 2012; 7(12):e52039.
18. Azpiazu D, Gonzalo S, González-Parra E, Egido J, Villa-Bellosta R. Role of pyrophosphate in vascular calcification in chronic kidney disease. *Nefrologia* 2018; 38(3):250-257.

D Vitamini Yetersizliği Olan Adölesan Kız Çocuklarında Oksidatif Stres ve Eser Element Düzeyleri

Oxidative Stress and Trace Element Levels in Adolescent Girls with Vitamin D Deficiency

Gürkan ÇIKIM***Metin KILINÇ******Filiz ALKAN BAYLAN****

* Necip Fazıl Şehir Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

** Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Kahramanmaraş, Türkiye

Başvuru Tarihi: 17 Eylül 2020**Kabul Tarihi:** 01 Aralık 2020

ÖZET

Amaç: Adölesan dönemde fiziksel, cinsel, biyolojik, psikolojik ve sosyal değişimler olmaktadır. D Vitamini, vücudun kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) dengesini düzenleyerek kemik gelişimini sağlayan, immün sistem oluşumuna katkıda bulunan, kanser gelişimini engelleyen antiinflamatuvar bir hormondur. Serbest radikaller; DNA, protein, lipidler gibi yapılara zarar veren moleküllerdir. En önemli göstergelerinden birisi de Çinko ve bakır, metaloenzimlerin yapısında bulunan elementlerdir. Çinkonun, oksidatif stresten koruyucu rolü, bakır'ın ise hidroksil (OH) iyonu oluşturduğu bilinmektedir. Biz bu çalışmamızda D vitamini yetersizliği olan adölesanlarda, çinko ve bakır elementlerinin yanı sıra oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeylerinde değişim olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, D vitamini yetersizliği olan 30 (Grup I) ve D vitamini düzeyleri normal olan 30 adölesan da (Grup II) yapılmıştır. Çalışmada plazma çinko, bakır, magnezyum, MDA, hemoglobin seviyeleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Bakır düzeylerinde; D vitamini eksikliği olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı $p < 0.05$, MDA düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan $p > 0.05$ yükseklik saptanmıştır. Çinko düzeylerinde, D vitamini eksikliği olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı $p < 0.05$ düşüklük bulunmuştur. Diğer parametrelerde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Yapılan analize göre D vit düzeyleri ile çinko arasında orta düzeyde pozitif yönde, bakır arasında ise orta düzeyde negatif yönde korelasyon saptanmıştır.

Sonuç: Yaptığımız bu çalışmada D vitamini yetersizliği ile birlikte, oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeylerinin ve bakırın arttığını, çinko düzeylerinin ise azaldığını saptadık. Sağlıklı bir yaşam için D vitamini yetersizliği saptanan adölesanlarda diyetlerinin düzenlenmesinde çinko ve bakırda göz önüne alınmasını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: D vitamini, MDA, hemoglobin, çinko, bakır.

Metin KILINÇ : 0000-0002-1623-0201
Filiz ALKAN BAYLAN : 0000-0003-3117-7768

Yazışma adresi: Gürkan Çıkım
Necip Fazıl Şehir Hastanesi, Biyokimya
Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye
e-mail: drgurkanc@gmail.com

ABSTRACT

Aim: Physical, sexual, biological, psychological and social changes occur in the adolescent period. Vitamin D is an anti-inflammatory hormone that regulates the body's calcium (Ca) and phosphorus (P) balance, provides bone development, contributes to the formation of the immune system and prevents cancer development. Free radicals; They are molecules that damage structures such as DNA, proteins and lipids. One of the most important indicators of zinc and copper are elements in the structure of metalloenzymes. It is known that zinc has a protective role against oxidative stress and copper forms hydroxyl (OH) ion. In this study, we aimed to investigate whether there is change in MDA levels, which is an indicator of oxidative stress, as well as zinc and copper elements in adolescents with vitamin D deficiency.

Materials and Methods: This study was conducted on 30 adolescents with vitamin D deficiency (Group I) and 30 adolescents with normal vitamin D levels (Group II). Plasma zinc, copper, magnesium, MDA, hemoglobin levels were evaluated in the study.

Results: In copper levels; In the group with vitamin D deficiency (Group I), a statistically significant $p < 0.05$, and a statistically insignificant $p > 0.05$ increase in MDA levels were found. A statistically significant $p < 0.05$ decrease in zinc levels was found in the vitamin D deficient group (Group I). There was no change in other parameters. According to the analysis, a moderate positive correlation was found between D vit levels and zinc, and a moderate negative correlation between copper.

Conclusion: In this study, we found that along with vitamin D insufficiency, MDA levels and copper, which are indicators of oxidative stress, increased and zinc levels decreased. We think that zinc and copper should be taken into consideration in the regulation of diets of adolescents with vitamin D deficiency for a healthy life.

Keywords: Vitamin D, MDA, hemoglobin, zinc, copper.

GİRİŞ

Adölesan dönemi, Dünya sağlık örgütünde göre 10-19 yaş olarak tanımlanmakta ve bu dönemde, fiziksel, cinsel, biyolojik, psikolojik ve sosyal değişimler olmaktadır (1). Adölesanlar, dünya nüfusunun yaklaşık % 30'unu, Türkiye'de ise yaklaşık olarak % 20-25'ini oluşturmaktadır (2). D vitamini, vücudun kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) dengesini düzenleyerek kemik gelişimini sağlayan, immün sistem oluşumuna katkıda bulunan, kanser gelişimini engelleyen, apoptoz ve antienflamatuvar özellikleri olan steroid yapılı bir hormondur (3-5). İnsanlarda D vitamini düzeyleri yaş, cinsiyet, etnik köken ve mevsim gibi çeşitli parametrelere göre değişmektedir (6). D vitaminin yetersizlik ve eksiklik düzeyleri çalışmalarda farklılık göstermekle birlikte Endocrine Society tarafından 2016 yılında yayınlanan raporda 25-OH D düzeyine göre < 12 ng/mL ise D vitamini eksikliği, 12-20 ng/mL D vitamini yetersizliği, > 20 ng/mL ise normal D vitamini düzeyi olarak tanımlamıştır (7). D vitamini yetersizliği ve eksikliği tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygındır. Ülkemizdeki

çocuklarda D vitamini yetersizliği oranının mevsimsel değişiminde göz önüne alınarak yapılan çeşitli çalışmalarda % 25,5 - % 93 arasında olduğu tespit edilmiştir (8-10). Amerika ve Meksika'da yapılan çalışmalarda bu oranın %28-%58, İtalya ve diğer Avrupa ülkelerinde %42-%49, Afrika'da %12-%96 civarında olduğu gösterilmiştir (11-13). D vitamininin temel olarak deride, ultraviyole B (UVB) ışınları ile 7-dehidrokolesterolden sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D₃) ve diyetle ergosterol olarak alınan yine UVB ışınları ile etkisi ile deride oluşan ergokalsiferol (D₂) formları vardır (14,15). Daha sonra her iki D vitamini formu, D vitamin bağlayıcı proteinler aracılığıyla karaciğere gelmektedir. Karaciğerde 25 hidroksilasyona uğrayarak 25 OH Vitamin D formuna dönüşür. Bu molekül sonrasında böbreğe gelir ve 1 alfa hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmek suretiyle aktif form olan 1,25 dihidroksivitamin D (kalsitriol)'e dönüşür. Kalsitriol etkilerini nükleer transkripsiyon faktörü olan vitamin D reseptörü (VDR) ile gerçekleştirmektedir (16). D vitamini eksikliği çocukluk çağında rikets, erişkinlerde osteomalazi oluşturmaktadır.

Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda D vitamini eksikliğinin Haşimato, kanser, otoimmün hastalıklar, kalp hastalıkları, reaktif artritler, diyabet gibi hastalıkların gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (17-20). Eser elementler organizmada bir çok reaksiyonda kofaktör olarak bulunmaktadır. Çinko ve bakır önemli reaksiyonlarda rol alan eser elementlerdir. Çinko, DNA polimeraz, RNA polimeraz, süperoksit dismutaz, karbonik anhidraz, alkalin fosfataz, karboksipeptidaz, ve alkol dehidrogenaz gibi metaloenzimlerin yapısında bulunan element olup, oksidatif stresten koruyucu rolü gösterilmiştir (21). Bakır, SOD, sitokrom oksidaz, lizil oksidaz, trozinaz gibi enzimlerin yapısında bulunmakta olup, metabolik reaksiyonları düzenlemekte ve oksidan sistemin baskın olduğu durumlarda artmaktadır (22). Serbest radikaller, DNA, protein, lipidler gibi yapılara zarar veren, yaptığı oksidatif hasara bağlı olarak dokuları, organları etkileyerek işlev kayıpları oluşturan moleküllerdir. Hücre membranlarında oluşturulan lipid peroksidasyonunun en iyi göstergelerinden birisi de malondialdehid (MDA) düzey ölçümleridir (23).

Biz bu çalışmamızda D vitamini yetersizliği olan kız adölesanlarda metabolizma için önemli fonksiyonlara sahip olan çinko, bakır elementlerinin yanı sıra oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeylerinde değişim olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi Kadın Doğum ve Çocuk ek binasında, çocuk polikliniğine kas ağrısı nedeniyle başvuran herhangi bir tedavi almayan, sigara kullanmayan, kronik hastalığı olmayan, 11-17 yaş grubunda olan adölesan dönemdeki kız çocuklarında yapılmıştır. Bu çalışmadaki D vitamini düzeyleri, Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre 25-OH D düzeyi <12 ng/mL ise D vitamini eksikliği, 12-20 ng/mL D vitamini yetersizliği, >20 ng/mL ise normal D vitamini baz alınmış, D vitamini yetersizliği olan (12-20 ng/mL) 30 adölesan (**Grup I**) ve normal D vitamini olan

(>20 ng/mL) 30 adölesan (**Grup II**) olmak üzere 60 kişide yapılmıştır. Çalışmada plazma çinko, bakır, MDA, hemoglobin seviyeleri değerlendirilmiştir. Hastalardan ve kontrol grubundan 12 saatlik açlığı takiben venöz kan örnekleri alınmıştır. Hemoglobin için K₂ EDTA içeren tüpler kullanılmıştır. Örneklerin analizinde aşağıda belirtilen yöntemler kullanılmıştır.

Malondialdehid (MDA) Ölçüm Yöntemi:

Lipid peroksidasyonu sonucu malondialdehit sekonder ürünü oluşur. Ölçümü aerobik şartlarda pH 3.4'te MDA'nın 95 °C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile inkubasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de absorbans ölçümü esasına dayanmaktadır.

Serumda Çinko ve Bakır Yöntemi:

Çinko düzey tayini, serum örnekleri % 5'lik gliserol ile 1/4 dilusyon gerçekleştirildikten sonra Perkin Elmer Analyst 800 model atomik absorpsiyon spektrometre cihazında, alev spektrofotometri yöntemiyle belirlendi. Sonuçlar µg/dl olarak hesaplanmıştır. Bakır düzey tayini, serum örneklerinde % 10'luk gliserol ile 1/2 dilusyon gerçekleştirildikten sonra Perkin Elmer Analyst 800 model atomik absorpsiyon spektrometre cihazında, alev spektrofotometri yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar µg/dl olarak hesaplanmıştır.

Hemoglobin: Hemoglobin düzeyleri, Sysmex XN-1000 (Corporation, Chuo-ku, Kobe, Japan) cihazı ile florasan akış sitometrisi yöntemi ile ölçülmüştür.

Magnezyum: Roche Hitachi Cobas C501 otoanalizör cihazında (Roche Diagnostics, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Kaiseraugst, Switzerland) kalorimetrik olarak ölçülmüştür.

25 OH D vitamini: Cobas e 600 otoanalizör cihazında (Roche Diagnostics, F.Hoffmann-La Roche Ltd., Kaiseraugst, Switzerland) electrochemiluminescence immunoassay yöntemiyle ölçülmüştür.

İstatistik Analiz

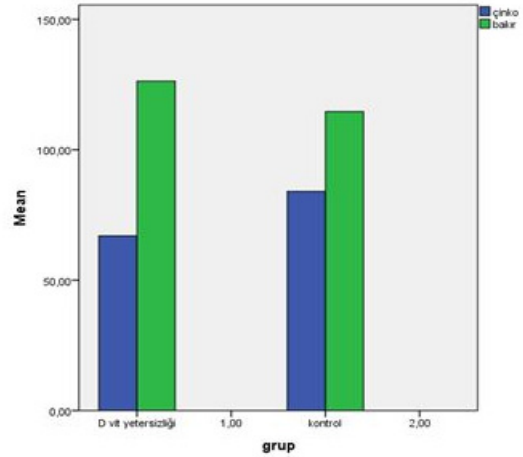
Veriler, Windows için SPSS 20.0 programı (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Sürekli ve süreksiz verilerin

normal dağılımı Kolmogorov ve Smirnov testi ile, varyansların homojenliği ise Levene testi ile analiz edildi. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. D vit yetersizliği ve kontrol grupları arasında parametrelerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Korelasyon için Spearman'ın rho yöntemi kullanıldı. D vitamini ile Çinko ve Bakır seviyeleri arasındaki ilişki scatter plot dağılım grafiği ile gösterildi.

BULGULAR

D vitamini düzeyleri (ng/ml), Grup I: 15.35 (12-18.5), Grup II: 23.75 (20.2-36.2), Hemoglobin düzeyleri (g/dl): Grup I: 13.9 (8.4-16.8), Grup II: 13.8 (11.4-16.2), Magnezyum düzeyleri (mg/dl): Grup I: 2.04 (1.80-2.67), Grup II: 2.02 (1.75-2.40), MDA (nmol/L) düzeyleri Grup I: 4.75 (4-8.7), Grup II: 4.35 (1.2-8.0), Çinko (Zn) düzeyleri (µg/dl), Grup I: 63.9 (36.2-124.7), Grup II: 84.9 (52.6-112.6), Cu (bakır) düzeyleri (µg/dl), Grup I: 126.9 (74.6-198.9), Grup II: 115.2 (73.9-156.2) saptanmıştır. Bakır düzeylerinde; D vitamini eksikliği olan grupta (Grup I) istatis-

tiksel olarak anlamlı $p < 0.05$, MDA düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan $p > 0.05$ yükseklik saptanmıştır. Çinko düzeylerinde, D vitamini eksikliği olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı $p < 0.05$ düşüklük bulunmuştur. Diğer parametrelerde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Yapılan analize göre D vit düzeyleri ile çinko arasında orta düzeyde pozitif yönde, bakır arasında ise orta düzeyde negatif yönde korelasyon saptanmıştır (Tablo 1), (Tablo 2).



Şekil 1: Gruplar arası Çinko Bakır Düzeyleri
Figure 1: Zinc Copper Levels between Groups

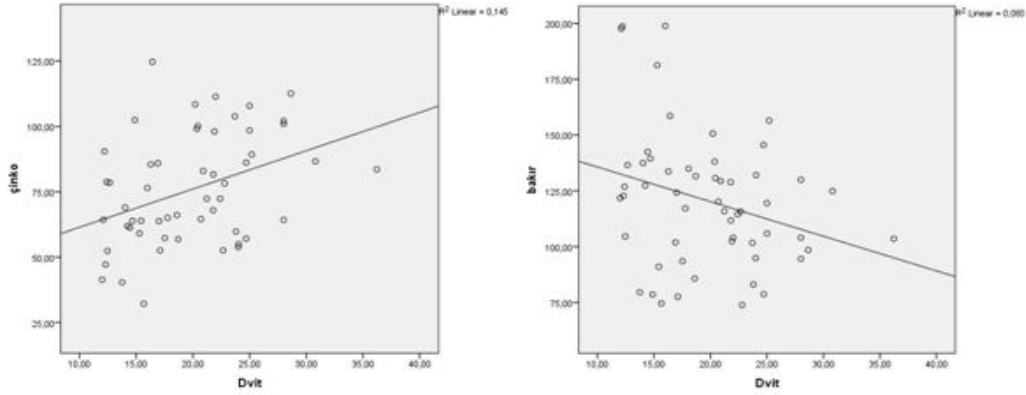
Tablo 1. Çalışma gruplarının demografik ve biyokimyasal sonuçları
Table 1. Demographic and biochemical results of the study groups

	D vit yetersizliği (n= 30)	Kontrol (n= 30)	P değeri
D vit (ng/ml)	15.35 (12-18.5)	23.75 (20.2-36.2)	0,000*
Mg (mg/dl)	2.04 (1.80-2.67)	2.02 (1.75-2.40)	0,533
Hb (g/dl)	13.9 (8.4-16.8)	13.8 (11.4-16.2)	0,799
Yaş (yıl)	15 (11-17)	14 (11-17)	0,156
Çinko (µg/dl)	63.9 (36.2-124.7)	84.9 (52.6-112.6)	0,005*
Bakır (µg/dl)	126.9 (74.6-198.9)	115.2 (73.9-156.2)	0,232
MDA (nmol/ml)	47.5 (4-87)	43.5 (1.2-80)	0,161

* P değeri Mann-Whitney U Testine dayanmaktadır.

Tablo 2. D vitamini ile Diğer Parametreler Arasındaki Korelasyon
Table 2. Correlation Between Vitamin D and Other Parameters

Parameters	r	p
Mg	-0.078	0.568
Hb	0.161	0.236
Yaş	-0.202	0.136
Çinko	0.386	0.004*
Bakır	-0.271	0.046*
MDA	-0.227	0.094



Şekil 2: Serum D vitamin düzeyleri; Çinko ile pozitif yönde, Bakır ile negatif yönde korele bulundu
Figure 2: Serum vitamin D levels; It was positively correlated with zinc and negatively correlated with copper

TARTIŞMA

Günümüzde D vitamini'nin sadece kalsiyum ve fosfor metabolizması yönünden değil daha çeşitli fonksiyonlarının varlığı açısından üzerinde durulması gerektiği düşünülmelidir. Adölesanlarda büyüme hızlı olduğundan, kemik büyümesi açısından daha fazla kalsiyum ve dolayısıyla daha fazla D vitamini ihtiyacı olduğu bilinmektedir. Güneş açısından yeterli zenginliğe sahip olan ülkemizde bunun sağlıklı besinlerle dengelenmesi daha sağlıklı nesillerin yetiştirilmesi açısından da önem taşımaktadır. Ancak bunun yanı sıra bu konuda toplumun da yeterli bilinç düzeyine erişmesi gerekmektedir. D vitamini eksikliği ve yetersizliği çok sık görülmekte olup, yetersizlik oranları, eksiklik oranlarına göre daha fazla bulunmuştur (8,24). D vitamini düzeylerini belirlemede, yarı ömrü daha uzun olan ayrıca endojen sentezi ve diyetle alınan D vitamini yansıtan 25 OH D vitamini formu kullanılmaktadır (25). D Vitamini, vücudun kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) dengesini düzenleyerek kemik gelişimini sağladığı gösterilmiştir (3-5). D vitaminin, immün sistemin içerisinde olan makrofajların, natural killer hücrelerinin fagositoz, monositlerin antimikrobiyal aktivitesini artırdığı, ayrıca IL-4, IL-5, gibi antiinflamatuvar sitokinleri artırıp, IL-2, IL-3 gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezini azalttığı dolayısı ile güçlü bir immün sistemin oluşmasında önemli olduğu gösterilmiştir (26-28). Kronik uzun süreli inflamasyonlar, serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olarak proteinlerde ve DNA'da hasara yol açarak kanser oluşumuna neden olduğu

belirtilmiştir. D vitamininin proinflamatuvar sitokinlerin sentezini azaltarak, kanser gelişimi üzerine koruyucu etkilerinin varlığından bahsedilmiştir (29). MDA, oksidatif hasarın en önemli göstergelerinden birisi olup, DNA, protein, lipidler gibi moleküllere zarar vererek, kanser, ateroskleroz gelişimi gibi olaylara neden olmaktadır (23). Çalışmamızda MDA düzeyleri, D vitamini yetersizliği olan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulundu. Dolayısı ile bu kişilerde oksidan sistemin baskın olduğu, böylece hücre, doku ve organ fonksiyonlarının etkileneceğini düşünmekteyiz. Çinko, proteinleri dayanıklı hale getiren, karbonhidrat, protein, lipit, nükleik asit gibi sentezlerde önemli rolleri olan, antioksidan sistemde yer alan enzim ve moleküllerin bileşeni olan eser elementtir (22). Çinkonun, fagosit fonksiyonunda, yeterli immünglobülin sentezinde önemli olduğu, buna bağlı olarak immün sistemin gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (30). D vitamini'nin, çinko emilimini artırdığı gösterilmiştir (31). Fazla miktarda alınan bakır, fosfat ve oksalatın çinko emilimini azalttığı gösterilmiştir (32). Biz çalışmamızda çinko düzeylerini, D vitamini yetersizliği olan grupta istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük ve aralarında pozitif korelasyon, bulunduğunu tespit ettik. D vitamini yetersizliğinin çinko düşüklüğüne neden olması, çinkonun barsaktan emiliminin azalmasına bağlı olabileceğini söylemek mümkün görünmektedir. Ayrıca hem D vitamini, hem de çinko yetersizliğinin yeterli antioksidan üretimine katkı sağlayamamasından kay-

naklı, doku ve organların daha fazla oksidan strese maruz kalabileceği, bunun sonucunda immün sistem gelişimi, DNA sentezi gibi önemli fonksiyonlarda bozulmalara neden olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda bakır düzeyleri, D vitamini yetersizliği olan grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksek ve negatif korelasyon bulunmuştur. Bakır, SOD, sitokrom oksidaz, lizil oksidaz, trozinaz gibi enzimlerin yapısında bulunmakta ve metabolik reaksiyonları düzenlemektedir (21). Redoks geçişli metal olan bakırın hidroksil radikali oluşumunu artırarak DNA'ya hasar verdiği ve fazla miktarda bakırın immün sistem depresyonu yaptığı saptanmıştır (33,34). Solunum yolu hastalıklarında, özellikle astımda bakır/çinko oranının arttığı gösterilmiştir (35). Biz fazla miktardaki bakırın hidroksil radikalini artırdığını, metal toksisitesine çok duyarlı olan böbrek renal tübüllerini ve sonrasında parankimi etkilediğini böylece bakırın, oksidan stres yanında, böbrek fonksiyonlarını bozarak, hem D vitaminin, hemde çinkonun emilimini azalttığını düşünmekteyiz. Bakırın kanda karaciğerde sentezlenen bir akut faz proteini olan seruloplazmin tarafından taşındığı bilinmektedir (36). D vitamini yetersizliğinin ve çinko eksikliğinin oksidatif stresi artırdığı göz önüne alındığında, seruloplazmin sentezinin oksidatif stresten etkilendiği ve azaldığı bu durumun ise bakır artışına neden olduğunu düşünmekteyiz. Magnezyum D vitaminin aktivasyonundaki hidroksilaz enzimlerinin

kofaktörüdür (37). Ayrıca magnezyum DNA'yı oksidatif hasara karşı korumakta ve apoptozu düzenlemektedir (38). Yaptığımız çalışmada gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Vitamin D ve eritropoez arasında çeşitli çalışmalar yapılmış ancak bu konu üzerinde uzlaşılmış görüş birliği bulunmamaktadır. D vitamininin, eritropoetin reseptör yada hepsidin sentezini artırdığını gösteren çalışmalar vardır (39,40). Çalışmamızda gruplar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak, adolesanlar hızlı büyüme döneminde olduğundan birçok vitamin ve mineral açısından risk grubundadırlar. Yaptığımız bu çalışmada D vitamini yetersizliği ile birlikte, oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeylerinin ve bakırın arttığını, çinko düzeylerinin ise azaldığını tespit ettik. D vitamini yetersizliği saptanan adolesanlarda çinko, bakır ve MDA düzeylerinin belirlenmesi, bu kişilerin eğer güneş ışınlarından yeterince D vitamini alamıyorlarsa diyetlerine D vitamini ile birlikte çinko ilave edilmesi ve bakır içeren gıdalardan kaçınılması, ayrıca antioksidan olan A,E,C vitaminleri ve selenyum gibi minerallerin eklenmesinin sağlıklı nesillerin yetişmesinde gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışmanın daha ileride yapılacak ayrıntılı çalışmalara kaynak oluşturmasını ümit etmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. McIntyre P. Pregnant Adolescents Delivering on Global Promises of Hope. Geneva, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2006. p.4- 7.
2. Baltacı G, Düzgün İ. Adolesan ve Egzersiz. Sağlık Bakanlığı Yayınları. Birinci Basım; 2008. s: 7.
3. Herrmann M, Farrell CL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of Vitamin D Status - A Changing Landscape. Clin Chem Lab Med 2017;55(1):3-26.
4. Sun J. Dietary Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Microbiome. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2018;21(6):471-4.
5. de La Puente-Yagüe M, Cuadrado-Cenzual MA, Ciudad-Cabañas MJ, Hernández-Cabria M, Collado-Yurrita L. Vitamin D: And Its Role in Breast Cancer. Kaohsiung J Med Sci 2018;34(8):423-7.
6. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2012;243:32-40.
7. C Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional Rickets. J Clin Endocrinol Metab 2016;101:394-415.
8. Akman AO, Tümer L, Hasanoglu A, İlhan M, Caycı B. The frequency of vitamin D insufficiency in healthy children between 1 and 16 years of age in Turkey. Pediatr Int 2011;53:968-73.
9. Karaguzel G, Dilber B, Çan G, Ökten A, Değer O, Holick MF. Seasonal vitamin D status of healthy school children and predictors of low vitamin D status. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2014;58:654-60.

10. Kocamaz H. Çocukluk çağı gastrointestinal sistem hastalıklarında D vitamini düzeyleri. *Ortadoğu Tıp Derg* 2019;11(4):542-7.
11. Brito A, Cori H, Olivares M, Mujika FM, Cediel G, de Romaña D L. Less than adequate vitamin D status and intake in Latin America and the Caribbean: a problem of unknown magnitude. *Food Nutr Bull* 2013;34(1):52-64.
12. Chakhtoura M, Rahme M, Chamoun N, El-Hajj Fuleihan G. Vitamin D in the Middle East and North Africa Bone Reports. 2018;135-146.
13. Wagner CL, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children and adolescents. *Pediatrics* 2008;122:1142-52.
14. Chen TC, Persons KS, Lu Z, Mathieu JS, Holick MF. An evaluation of the biologic activity and vitamin D receptor binding affinity of the photoisomers of vitamin D3 and previtamin D. *J Nutr Biochem* 2000;11:267-72.
15. Japelt, RB, Jakobsen J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci* 2013;4:136.
16. Sang-Min J, Eun-Ae S. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 2018;50(4):20. doi: 10.1038/s12276-018-0038-9.
17. Jamka M, Ruchala M, Walkowiak J. Vitamin D and Hashimoto's disease. *Pol Med J* 2019;47(279):111-5.
18. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 2014;14:342-57.
19. Saggese G, Vierucci F, Boot AM, Czech-Kowalska J, Weber G, Camargo CA Jr, et al. Vitamin D in childhood and adolescence: an expert position statement. *Eur J Pediatr* 2015;174:565-76.
20. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1080-6.
21. Cikim G, İzgi K, Aksu E. The levels of trace elements and homocysteine in arterial hypertension. *Trace Elements and Electrolytes* 2017;34:34-9.
22. Cikim G, İzgi K, Kilinc M, Çelik A, Karaveli C, Karaveli A, et al. Trace elements and oxidant-antioxidant levels in the etiology of indirect inguinal hernia. *Trace elements and Electrolytes* 2016;33(1):8-12.
23. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology* 2000;153:83-104.
24. S. Cashman KD, Dowling KG, Skrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, De Henauw S, et al. Vitamin D deficiency in Europe: Pandemic? *Am. J. Clin. Nutr* 2016;103:1033-44.
25. Holick, M.F. Vitamin D status: Measurement, interpretation, and clinical application. *Ann. Epidemiol* 2009;19:73-8.
26. Özkan B, Döneray H. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg* 2011;54:99-119.
27. Bikle D. Nonclassic actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:26-34.
28. Bikle D, Oda Y, Xie Z. Calcium and 1,25(OH)2D: interacting drivers of epidermal differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:355-360.
29. Giammanco M, Di Majo D, La Guardia M, Aiello S, Crescimannno M, Flandina C, et al. Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharm. Biol* 2015; 53(10):1399-434.
30. Pasowska R. Role of selenium and zinc in the pathogenesis of food allergy in infants and young children *Arch Med Sci* 2012;8:1083-8.
31. Schwallenberg GK, Genuis SJ. Vitamin D, Essential Minerals, and Toxic Elements: Exploring Interactions between Nutrients and Toxicants in Clinical Medicine. Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal 2015;2015:1-8.
32. Özdemir Ö, Tabanlı G. Çinko Eksikliğinin Alerjik Hastalıklardaki Rolü. *Sakarya Med J* 2016;6(4):267-74.
33. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189:147-63.
34. Maggini, S.; Beveridge, S.; Sorbara, J.P.; Senatore, G. Feeding the immune system: The role of micronutrients in restoring resistance to infections. *CAB Rev* 2008;3:1-21.
35. Kadrobova J, Mad'aric A, Podivinsky F, Gazdik F, Ginter F. Plasma zinc, copper and copper/zinc ratio in intrinsic asthma. *J Trace Elem Med Biol* 1996; 10:50-3.
36. Dubick MA, Barr JL, Keen CL, Atkins JL. Ceruloplasmin and hypoferremia: Studies in burn and non-burn trauma patients. *Antioxidants* 2015; 4: 153-69.
37. Zittermann A. Magnesium deficit ? overlooked cause of low vitamin D status? *BMC Medicine* 2013;11:229. doi: 10.1186/1741-7015-11-229.
38. Petrovic, J, Stanic D, Dmitrasinovic G, Plecas-Solarovic B, Ignjatovic S, Batinic B, et al. Magnesium Supplementation Diminishes Peripheral Blood Lymphocyte DNA Oxidative Damage in Athletes and Sedentary Young Men. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:2019643.
39. Carvalho C, Isakova T, Collerone G, Olbina G, Wolf M, Westerman M, et al. Hepcidin and disordered mineral metabolism in chronic kidney disease. *Clin Nephrol* 2011;76(2):90-8.
40. Fettah A, Reis G, Erten İ, Çayır A. Çocuklarda serum D vitamini düzeyinin anemi ve demir parametreleri üzerine etkisi ve literatür derlemesi. *Medicine Science* 2016;5(3):821-5.

Elevation of NT-pro-BNP levels in high fever patients without heart failure

Kalp yetmezliği olmayan yüksek ateşli hastalarda NT-proBNP düzeylerinin yüksekliği

Hacer Koç*
Nihal Yücel**

Özlem Çakır Madenci**
Şeymanur Sağlam***

Asuman Orçun**
Nurdan Papila Topal****

* Muş State Hospital, Biochemistry Laboratory, Muş, Türkiye

** Kartal Dr Lütfi Kırdar City Hospital, Biochemistry Laboratory, İstanbul, Türkiye

*** Kartal Dr Lütfi Kırdar City Hospital, Department of Infectious Disease, İstanbul, Türkiye

**** Kartal Dr Lütfi Kırdar City Hospital, Department of Cardiology, İstanbul, Türkiye

Başvuru Tarihi: 25 Eylül 2020

Kabul Tarihi: 01 Aralık 2020

ABSTRACT

Objective: We aimed to investigate the NT-proBNP levels in high fever patients without heart failure, to contribute to the proper request and interpretation of the test.

Methods: Patients group included 31 patients who admitted with a body temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ and showed no signs of heart failure on their echocardiograms. Patients were internalized in the Infectious Diseases Clinic. The control group included 31 healthy subjects. NT-pro-BNP, Procalcitonin (Cobas e 601 Roche Diagnostics, Germany), Complete Blood Count (Beckman Coulter LH 780, USA) and CRP (Siemens BN II Nephelometer, Germany) levels were evaluated.

Results: Median (2.5-97.5 % percentiles) body temperature values of the patients and controls were 38.4 (38.0 - 39.8) and 36.1 (36-36.6) $^{\circ}\text{C}$ respectively ($p < 0.0001$). Median (2.5-97.5 % percentiles) NT-proBNP levels of the patients and control groups were; 240 (48.3- 2637) and 34.8 (5.35-86) ng/L respectively ($p < 0.0001$). NT-proBNP levels correlated significantly with body temperature, CRP, and PCT ($r=0.761$, 0.726 and 0.727 respectively, all p 's < 0.0001). We observed recovery at 8 patients (at least 48 hours without fever), and median (2.5-97.5 % percentiles) NT-proBNP levels at time of fever and without fever were 378.3 (80.2- 1642) and 183 (9- 419.8) ng/L, respectively ($p=0.007$). In multiple regression analyses; body temperature, leucocyte count and PCT were found predictive for NT-proBNP levels. ($R^2=0,456$, $F=11.987$, $P<0,001$)

Conclusion: Despite to the normal cardiac functions, elevated NT- proBNP levels are observed in patients with fever. This situation should be considered in the interpretation of high NT- proBNP levels.

Keywords: CRP, Fever, NT-proBNP, Procalcitonin, Heart failure

Hacer Koc	0000-0001-6422-0596
Özlem Çakır Madenci	0000-0002-5155-3591
Asuman Orçun	0000-0002-5155-3591
Nihal Yücel	0000-0001-8755-7765
Şeymanur Sağlam	0000-0001-8917-6624
Nurdan Papila Topal	0000-0001-9745-6845)

Yazışma adresi: Özlem Çakır Madenci
Kartal Dr Lütfi Kırdar City Hospital,
Biochemistry Laboratory, İstanbul
e-mail: ocmadenci@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Kalp yetmezliği olmayan yüksek ateşli hastalarda NT-proBNP düzeylerini değerlendirip testin doğru istem ve yorumuna katkı sağlamayı amaçladık.

Yöntem: Çalışma grubu hastaneye $\geq 38^\circ\text{C}$ ateş nedeniyle başvuran ve ekokardiyografide kalp yetmezliği saptanmayan 31 hastadan oluşmaktadır. Hastalar enfeksiyon hastalıkları kliniğine tedavi ve ileri araştırma amaçlı yatırıldı. Kontrol grubu 31 sağlıklıdan oluşmaktadır. NT-proBNP ve PCT düzeyleri, Cobas e 601 (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya), tam kan sayımı Beckman Coulter LH 780 (Miami-Florida, ABD), CRP ise Siemens BN II Nephelometre (Siemens, Almanya) cihazlarında çalışıldı.

Bulgular: Hasta ve kontrol grubunun vücut ısı medyan (2.5-97.5 % persentil) değerleri sırasıyla 38.4 (38.0 - 39.8) ve 36.1 (36-36.6) $^\circ\text{C}$ bulundu ($p < 0.0001$). Medyan (2.5-97.5 % persentil) NT-proBNP düzeyleri hasta ve kontrol grubunda sırasıyla 240(48.3- 2637) ve 34.8(5.35-86) ng/L ($p < 0.0001$) bulundu. NT-proBNP düzeyleri ile vücut ısı, CRP ve PCT arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptandı (sırasıyla $r=0.761$, 0.726 ve 0.727 , p 'ler < 0.0001). Sekiz hastada iyilişme (en az 48 saat ateşsiz dönem) gözlemlendi ve ateşli dönem ve ateşsiz dönem medyan (2.5-97.5 % persentil) NT-proBNP düzeyleri sırasıyla 378.3 (80.2- 1642) ve 183 (9- 419.8) ng/L bulundu ($p=0.007$). Çoklu regresyon analizinde vücut ısı, lökosit sayısı ve PCT NT-proBNP düzeyleri üzerinde etkili bulundu. ($R^2=0,456$, $F=11.987$, $P<0,001$)

Sonuç: Normal kardiyak fonksiyona rağmen yüksek ateşli hastalarda artmış NT-proBNP düzeyleri gözlemlendi. Bu durum yüksek NT-proBNP düzeylerini değerlendirirken göz önüne alınmalıdır.

Anahtar Sözcükler: CRP, Ateş, NT-proBNP, Prokalsitonin, Kalp yetmezliği

INTRODUCTION

Natriuretic peptides (NP's) play a key role in the maintenance of cardiovascular homeostasis as regulatory hormones against volume and pressure overload (1). Brain natriuretic peptide (BNP) is the most widely used NP in clinical practice; it is measured either as a biologically active form of 32 amino acids, BNP1-32 or inactive amino terminal part of 76 amino acids, NT-proBNP. BNP plasma levels are low in healthy individuals but it is drastically increased in congestive heart failure (CHF). In CHF, both BNP and NT-proBNP are directly synthesized in response to the myocardial wall stress caused by the volume and pressure overload (2, 3, 4). The biological function of BNP is to reduce the preload and afterload of the heart via natriuresis, diuresis, and vasodilatation. The increased plasma NP levels in heart failure (HF) patients are found directly proportional to the severity of the CHF according to the New York Heart Association classification (4). Both are useful in the differential diagnosis of cardiac dyspnea from other origins of dyspnea (5). NP measurement as an initial diagnostic tool is especially beneficial in the absence of echocardiography (ECHO); the increased values indicate further examination and the

normal values exclude the necessity of ECHO. The probability of CHF development in patients with normal plasma NP levels is very low (6). BNP and NT-proBNP are prognostic predictors in acute heart failure(4) and hypertension (7). The serial measurements of NPs help monitor CHF therapy since there are well-documented correlations between NP's levels and simultaneous hemodynamic and left ventricular function indicators (8).

Factors such as age and sex affect BNP and NT-proBNP levels; NP's levels rise with age (9) and are higher in women in every age group (10). On the other hand, lower NP levels are detected in obese individuals (1). Although BNP/NT-proBNP are widely used in the diagnosis and exclusion of CHF, their plasma levels are also increased in other diseases. These diseases may be of cardiac origins such as myocardial, cardiac valve diseases and atrial fibrillation or non-cardiac origins such as primary pulmonary diseases, anemia, stroke, subarachnoidal hemorrhage, hyperthyroidism, renal failure and septic shock (4,11,12,13,14).According to the animal and tissue culture experiments, there is significant evidence that the production and secretion of NPs are activated by endotoxins and inflammatory mediators (15).

The synthesis of NP's has stimulated by various growth factors and cytokines including interleukin-1®, TNF- α , leukemia inhibitor factor (16, 17, 18). It is also shown that IL-6 induces ANP and BNP gene expression in rat ventricular myocytes (19). NP's are also shown to be expressed in specific immune tissues and cells such as thymus, spleen, lymph nodes, tonsils; BNP plays a role in inflammation (20, 21). Based on this knowledge on the association of NP's with the inflammatory process, BNP levels were investigated in inflammatory and infectious diseases, sepsis, or critical illness (22, 23, 24) and high BNP levels were observed in infected patients without severe sepsis or septic shock.(25).

In this study; we aimed to investigate the NT-proBNP levels in high fever patients without heart failure, to contribute to the proper request and interpretation of the test.

METHODS

Study design and subjects

A total of 38 patients (males; 47.3 %, females; 52.7 %) attending to the emergency department (ED) of the hospital with fever ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) between October 2017-January 2018 were evaluated in this prospective observational study. All the patients were conscious, oriented, non-pregnant, and normotensive with no cardiac disease history. Body temperatures were measured at the tympanic membrane by infrared technology with Covidien Genius2 (Mansfield, USA) thermometer (Accuracy $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, given by the manufacturer) by trained nurses at the time of admission to ED. Blood culture, urine culture, complete blood cell count, C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), and NT-proBNP analyses were performed without delay from the patients whose body temperatures $\geq 38^{\circ}\text{C}$. Urinalysis, complementary diagnostic serological and microbiological tests, and additional cultures were performed if required. To exclude comorbid CHF and cardiac valve disease, ECHO was performed in the first 24 hours by the same cardiology specialist, and 7 patients (4 females, 3 males) were excluded because of cardiac pathologies such as diastolic dysfunction, valve disease, infective endocarditis or pulmonary hypertension.

Thus; 31 patients (48.3% males, 51.7% females) with normal ECHO signs who were internalized in infectious Diseases Clinic for further evaluation and therapy were included in the study. Median (2.5-97.5 percentiles) values for age was 44 (19-62.7) years. The control group consisted of 31 healthy hospital staff volunteers (45.2% males, 54.8 % females) and median (2.5-97.5 percentiles) values for age was 41.7 (19-61) years.

Sampling

Antecubital vein area was wiped with 70% alcohol and 2% chlorhexidine and one set of blood culture specimens (1 aerobic, 1 anaerobe) were taken in BD BACTEC (Becton Dickinson, New Jersey, USA; lot no: 7297961) culture bottles. Blood was collected in BD (Beckton Dickinson, New Jersey, USA; lot no: 7275502) vacutainer tubes with pure gel for NT-proBNP, PCT, and CRP tests, and in BD (Beckton Dickinson, New Jersey, USA; lot no: 7142798) vacutainer tube with dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid for complete blood count. The second set of blood cultures were taken from the other antecubital vein after 5-30 minutes. Blood samples were centrifuged at 1500 g for 10 min and studied without delay. The patient was informed about the urine culture and requested to wash the hands and wipe the genital area from front to back with a soapy gauze then take mid-flow urine into the sterile urine container Firatmed (Ankara, Turkey; lot: 1703).

Methods

NT-proBNP (lot no 22774806) and PCT (lot no 27885702) was measured by Cobas e 601 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with the electrochemiluminescence method. CRP was measured with the nephelometric method by Siemens BN II Nephelometer (Siemens, Germany). with Siemens Cardio Phase hsCRP kit (Marburg, Germany; lot no: 167561D). Complete blood cell count was measured by Beckman Coulter LH 780 analyzer (Miami-Florida, USA).

Statistical Analysis

The distribution of data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test, and since the data were abnormally distributed, results

were expressed as median (2.5–97.5 percentiles). The non-parametric data were compared using the Mann-Whitney U test for independent samples and the Wilcoxon test for paired samples. The correlation of NT-proBNP levels with body temperature, CRP, PCT and leucocyte count was measured by Spearman correlation. MedCalc Statistical Software (version 12, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) was used. To investigate the impact of body temperature, CRP, and PCT on patients' NT-proBNP levels, multiple regression analysis was performed using SPSS program (Statistical Package for Social Science, version 25; Chicago, IL). The level of significance was set at $p < 0.05$.

Informed consent of the patients was obtained and the study was approved by the ethical committee of our institution. Decision number: 2017/514/114/5

RESULTS

A total of 62 participants (53.2% female) with a median age of 42.8 years were included in the study. The summary statistics of the patient and the control group was shown in Table 1. Comparisons of NT-proBNP levels for the patients and control groups were shown by Box and Whisker graphs as median, 25-75% percentiles, lower-upper limit, and extreme values (Figure 1). The diagnosis and characteristics of the patients among age, gender, body temperature, and NT-proBNP levels were summarized in Table 2.

NT-proBNP levels correlated significantly with body temperature, CRP, and PCT (p 's < 0.0001 , $r = 0.761$, 0.726 and 0.727 respectively) but there was no significant correlation between NT-proBNP and leukocyte count. In multiple regression analyses with NT-proBNP as dependent variable and body temperature, CRP, leucocyte count and PCT as independent variables; body temperature, leucocyte count and PCT were predictive variables for NT-proBNP ($R^2 = 0.456$, $F = 11.987$, $P < 0.001$ (Table 3)). The patient group was divided into

subgroups as culture-positive and culture-negative and although culture-positive patients had higher NT-proBNP levels; there was no significant difference between the two groups. ($P = 0.058$) (Figure 2). During hospitalization body temperatures of 8 patients decreased to the normal levels thus second blood samples were taken to compare NT-proBNP levels with the time of fever and without fever. There was a significant difference between NT-proBNP levels of two periods ($P = 0.0078$). NT-proBNP levels and change % at the time of fever and without fever were shown in Table 4.

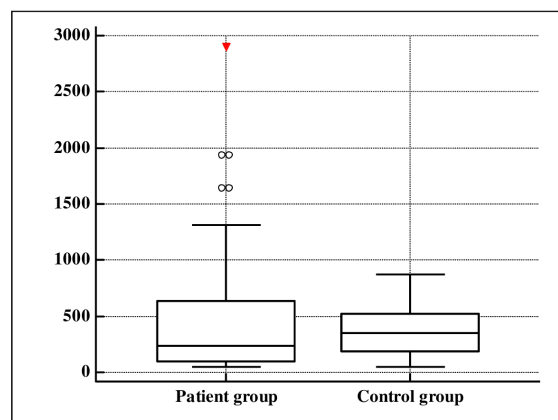


Figure 1. Box and Whisker plot of NT-proBNP levels in patient and control groups. (The values of the control group are multiplied by 10.)

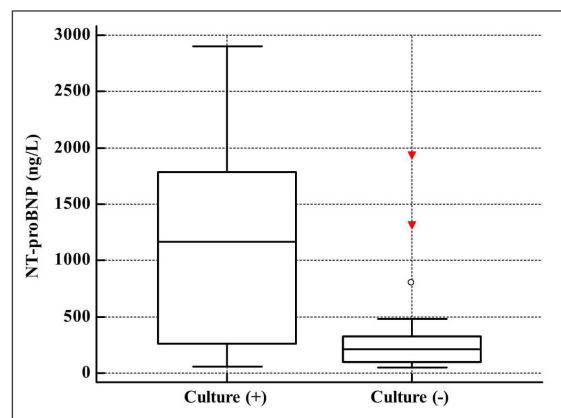


Figure 2. Box and Whisker plot of NT-proBNP levels in culture positive and culture negative patients

Table 1. Summary statistics of the patient and control groups.

Parameter	Control Group Median (2.5-97.5% Percentile)	Patient Group Median (2.5-97.5% Percentile)	P
Age (year)	44 (19-63)	41.7 (19-61)	0,640
Gender(F/M)	17/14	16/15	0,801
Body temperature (°C)	36.1(36-36.6)	38.4 (38-39.8)	*0.0001
CRP (mg/ L)	2.8(1.25-3.17)	163(12.3-331)	*0.0001
PCT (µg/L)	0.03(0.01-0.08)	0.30 (0.03-18.5)	*0.0001
NT-proBNP (ng/L)	34.8 (5.35-86)	240 (48.3-2637)	*0.0001

*p<0.05

Table 2. Summary statistics of the patient group

Diagnosis	Age(Years)	Gender	Body Temperature(°C)	NT-proBNP (ng/L)	Culture
Soft tissue infection	49	Male	38	55.5	Negative
Febrile neutropenia	55	Male	38.9	693	Tissue:Aspergillus Flavus
Urinary tract infection /epididimorşit	60	Male	38.4	322	Negative
Spondylodiscitis	56	Female	38.3	116	Negative
Febrile neutropenia	46	Female	39	95.9	Negative
Fever of unknown origin	34	Female	38.2	186	Negative
Soft tissue infection	60	Male	38	240	Negative
Pneumonia/urinarytract infection	22	Male	38	1936	Negative
Urinary tract infection	52	Male	38	55.7	Negative
Menenjit	44	Male	38.7	209	Negative
Febrile neutropenia/Bacteraemia/ urinary tract infection	53	Female	39	1641	Blood+ Urine Escherichia Coli
Urinary tract infection	24	Male	38	309	Negative
Brucella	54	Male	39	434	Blood:Brucella
B Bacteraemia/ urinary tract infection	42	Female	38.3	1935	Blood+ Urine Escherichia Coli
Acute retroviral syndrome	26	Male	38.8	75	Negative
Febrile neutropenia/ Tiflitis	34	Male	38	188	Negative
Fever of unknown origin	26	Female	38	478	Negative
Fever of unknown origin	52	Male	38	801	Negative
Upper respiratory tract infection + urinary tract infection	19	Male	38.5	91.4	Urine; Escherichia Coli
Complicated urinary tract infection	46	Female	38.1	211	Negative
Complicated urinary tract infection	35	Female	40.1	1315	Negative
Complicated urinary tract infection /Pneumonia	52	Female	38.2	331	Negative
Diabetic foot infection	63	Male	38.3	2904	Wound: Enterobacter cloacae
Cellulite	54	Female	38.1	80.2	Negative
Upper respiratory tract infection	33	Female	38.8	313	Negative
Febrile neutropenia	41	Male	38.2	46.2	Negative
Spondilodiskit/prosthesis infection	62	Female	38.5	188	Negative
Febrilnötropeni/oral candidiyazis	22	Female	38	196	Negative
Catheter infection	20	Female	39	1642	Blood:Staphylococcus aureus
Oralcandidiasis/lower respiratory tract infection	40	Female	38	54	Sputum:Haemophilus influenzae
Still disease	19	Female	38.7	424	Negative

Table 3. Multiple Linear Regression analyses using body temperature, CRP, PCT and leucocyte count as independent variables.

Variables	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	b	Std. Error	Beta		
(Constant)	-8725.7	2587.4		-3.372	0.001
Body Temperature	233.9	70.1	0.49	3.339	0.001
CRP	-1.21	1.02	-0.225	-1.184	0.214
Leucocyte Count	0.04	0.01	0.316	3.687	0.001
PCT	45.9	17.5	0.447	2.621	0.01

($R^2=0.457$, $F= 11.987$, ANOVA $p<0.0001$)

Table 4. NT-proBNP levels of 8 patients at time of fever and without fever.

NT-proBNP (ng/L)		(%) Change	p
With Fever	Without fever		
186	107.9	41.9	*0.0078
693.4	222	67.9	
322.4	193	40.1	
91.4	24.2	73.5	
434.3	173	60.1	
80.2	9.03	88.7	
801.3	319.1	60.1	
1642	419.8	74.4	

* $P<0.005$

DISCUSSION

In this study, we investigated the NT-proBNP levels in patients with fever and without heart failure. We determined higher NT-proBNP levels in patients with fever compared to the control group. In 8 patients whose second measurements could be performed and recovery was observed, NT-proBNP levels decreased as the body temperature turned to the normal.

It has been shown that inflammatory cytokines play a role in the pathogenesis of HF. They also affect the natriuretic peptide levels in non-cardiac failure patients. Therefore they have been largely investigated in sepsis or septic shock patients. During response to infection/ inflammation, endothelium-derived substances such as adrenomedullin and endothelin are released. They are both important in vascular tone regulation. Adrenomedullin causes vasodilation and endothelin is the potent vasoconstrictor. Vila et al. showed an increase in NT-proBNP levels in response to the bacterial endotoxin-induced inflammation in 10 males who received lipopolysaccharide (LPS). There was a correlation between NT-proBNP levels and heart rate, body temperature, CRP and IL1

levels after endotoxin (22). Lipopolysaccharides and pro-inflammatory cytokines stimulated the expression of BNP mRNA and protein secretion via p38 MAP kinase activation depending on dose in a study conducted in cultured rat myocytes (26). In humans; a series of neuroendocrine and immune changes interact with each other during response to the bacterial endotoxins (27) and mediators of inflammation like IL-1, IL-6, and TNF are assumed as stimulants of BNP secretion (28). Goritsas et al. investigated BNP levels as a prognostic marker in community-acquired infections. They observed that NT-proBNP levels were significantly higher than the control group and the highest levels were observed in lower respiratory tract infection patients. They also found that NT-proBNP was a prognostic marker of the infection (23). Similar to our findings; in a study by Castillo et al, a significant decrease was observed in NT-proBNP levels of 9 patients with septic shock after recovery (24). Piechota et al. found a significant correlation between NT-proBNP, CRP, and PCT levels in 20 patients with sepsis. The correlation was more significant with NT-proBNP and CRP than NT-proBNP and PCT. NT-proBNP levels

were significantly lower in the survivor group than non-survivors (29). Similarly, Rudiger et al. showed a significant positive correlation with NT-proBNP, CRP, and leukocyte count in 12 critically ill patients and concluded that NT-proBNP and BNP levels were influenced by the systemic inflammatory response (30). We showed significant correlation between NT-proBNP levels and body temperature, CRP and PCT but we couldn't show correlation between NT-proBNP levels and leukocyte count. The discrepancy between studies could arise from the diversity of patient characteristics; this study was performed in critically ill patients with septic shock while our study group consisted of patients with fever but without sepsis and heart failure and in generally stable status. Further researches with large populations are needed to show the relation between NT-proBNP levels and parameters showing systemic inflammatory response. The variety of the diseases inducing fever and inclusion or exclusion of non-infective febrile patients might also cause the difference. In a study by Varpula et al.; a correlation was observed between positive blood culture and NT-proBNP levels in 254 severe sepsis and septic shock patients, and positive blood culture was shown as the predictor on NT-proBNP levels in linear regression analysis (31). In our study, although culture-positive patients had higher NT-proBNP levels; there was no significant difference between the two groups. In our study; body temperature,

leucocyte count and PCT were found as the predictive variables for NT-proBNP levels.

In our control group; NT-proBNP levels showed great variability. Thus it would be more accurate to evaluate NT-proBNP increase with comparison to individual basal levels and percent differences might correlate better with the pathophysiology of the illness and so with other biochemical parameters. The lack of basal and/or secondary NT-proBNP levels of all patients was one of the limitations of our study. The other limitation was the heterogeneity of the disease for the patients' group. Besides we didn't have a sufficient number of patients to form homogenous subgroups.

We concluded that; despite to the normal cardiac functions, elevated NT-proBNP levels are observed in patients with fever. This situation should be considered in the interpretation of high NT-proBNP levels.

Ethical considerations: The patient gave informed consent and the study was approved by the Ethics Review Committee of Kartal Dr Lutfi Kırdar Research and Training Hospital 2017/514/114/5.

Conflict of interest: Authors declare that there is no conflict of interest.

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

KAYNAKLAR

1. Maisel AS, Duran JM, Wettersten N. Natriuretic Peptides in Heart Failure: Atrial and B-type Natriuretic Peptides. *Heart Fail Clin.* 2018 ;14:13-25. doi: 10.1016/j.hfc.2017.08.002
2. Yoo BS. Clinical Significance of B-type Natriuretic Peptide in Heart Failure. *J Lifestyle Med.* 2014; 4:34-8. doi: 10.15280/jlm.2014.4.1.34
3. Chowdhury P, Kehl D, Choudhary R, Maisel A. The use of biomarkers in the patient with heart failure. *Curr Cardiol Rep.* 2013;15:372. doi:10.1007/s11886-013-0372-4
4. Pandit K, Mukhopadhyay P, Ghosh S, Chowdhury S. Natriuretic peptides: Diagnostic and therapeutic use. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011;15:345-353. doi:10.4103/2230-8210.8697
5. McKelvie RS, Moe GW, Ezekowitz JA, et al. The 2012 Canadian Cardiovascular Society heart failure management guidelines update: focus on acute and chronic heart failure. *Can J Cardiol* 2013; 29:168
6. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [published correction appears in *Eur Heart J.* 2016 Dec 30]. *Eur Heart J.* 2016;37:2129-2200. doi: 10.1093/eurheartj/ehw128
7. Hildebrandt P, Boesen M, Olsen M, Wachtell K, Groenning B. N-terminal pro brain natriuretic peptide in arterial hypertension--a marker for left ventricular dimensions and prognosis. *Eur J Heart Fail.* 2004;6: 313-317. doi:10.1016/j.ejheart. 2004.01.001

8. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:161-167. doi:10.1056/NEJMoa020233
9. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am J Cardiol*. 2002;90:254-258. doi:10.1016/s0002-9149(02)02464-5
10. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:976-982. doi:10.1016/s0735-1097(02)02059-4
11. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:2357-2368. doi:10.1016/j.jacc.2007.09.021
12. Chua G, Kang-Hoe L. Marked elevations in N-terminal brain natriuretic peptide levels in septic shock. *Crit Care*. 2004;8: 248-250. doi:10.1186/cc2889
13. Januzzi JL, Morss A, Tung R, et al. Natriuretic peptide testing for the evaluation of critically ill patients with shock in the intensive care unit: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2006;10:37. doi:10.1186/cc4839
14. Rudiger A, Gasser S, Fischler M, Hornemann T, von Eckardstein A, Maggiorini M. Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure. *Crit Care Med*. 2006;34:2140-2144. doi:10.1097/01.CCM.0000229144.97624.90
15. Harada E, Nakagawa O, Yoshimura M, et al. Effect of interleukin-1 beta on cardiac hypertrophy and production of natriuretic peptides in rat cardiocyte culture. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1997-2006. doi:10.1006/jmcc.1999.1030
16. Kuwahara K, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J*. 2010;57:555-565. doi:10.1507/endocrj.k10e-150
17. Ma KK, Banas K, de Bold AJ. Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Regul Pept*. 2005;128:169-176. doi:10.1016/j.regpep.2004.12.025
18. Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:505-513. doi:10.1016/j.jmcc.2004.01.001
19. Tanaka T, Kanda T, Takahashi T, Saegusa S, Moriya J, Kurabayashi M. Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes. *J Int Med Res*. 2004;32:57-61. doi:10.1177/147323000403200109
20. Vollmar AM, Schmidt KN, Schulz R. Natriuretic peptide receptors on rat thymocytes: inhibition of proliferation by atrial natriuretic peptide. *Endocrinology*. 1996;137:1706-1713. doi:10.1210/endo.137.5.8612505
21. Vollmar AM, Schulz R. Expression and differential regulation of natriuretic peptides in mouse macrophages. *J Clin Invest*. 1995;95:2442-2450. doi:10.1172/JCI117944
22. Vila G, Resl M, Stelzeneder D, et al. Plasma NT-proBNP increases in response to LPS administration in healthy men. *J Appl Physiol* (1985). 2008; 105:1741-1745. doi:10.1152/jappphysiol.90442.2008
23. Goritsas C, Fasoulaki M, Paissios NP, Giakoumaki E, Alamanos Y, Nikolaou NI. Brain natriuretic peptide plasma levels as a marker of prognosis in patients with community-acquired infection. *Eur J Emerg Med*. 2010;17:293-295. doi:10.1097/MEJ.0b013e328332354b
24. Castillo JR, Zagler A, Carrillo-Jimenez R, Hennekens CH. Brain natriuretic peptide: a potential marker for mortality in septic shock. *Int J Infect Dis*. 2004;8:271-274. doi:10.1016/j.ijid.2003.12.007
25. Nikolaou NI, Goritsas C, Dede M, et al. Brain natriuretic peptide increases in septic patients without severe sepsis or shock. *Eur J Intern Med*. 2007;18:535-541. doi:10.1016/j.ejim.2007.01.006
26. Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:505-513. doi:10.1016/j.jmcc.2004.01.001
27. Webster JL, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:125-163. doi:10.1146/annurev.immunol.20.082401.104914
28. Ruskoaho H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev*. 2003;24:341-356. doi:10.1210/er.2003-0006
29. Piechota M, Banach M, Irzmaski R, et al. N-terminal brain natriuretic propeptide levels correlate with procalcitonin and C-reactive protein levels in septic patients. *Cell Mol Biol Lett*. 2007;12:162-175. doi:10.2478/s11658-006-0062-y
30. Rudiger A, Fischler M, Harpes P, et al. In critically ill patients, B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP levels correlate with C-reactive protein values and leukocyte counts. *Int J Cardiol*. 2008;126:28-31. doi:10.1016/j.ijcard.2007.03.108
31. Varpula M, Pulkki K, Karlsson S, Ruokonen E, Pettilä V; FINNSEPSIS Study Group. Predictive value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2007;35: 1277-1283. doi:10.1097/01.CCM.0000261893.72811

Romatoid Artrit Hastalık Aktivitesinin Bir Göstergesi Olarak İskemi Modifiye Albümin

Ischemia-modified albumin as a Predictor of the Disease Activity in Rheumatoid Arthritis

Ayfer Çolak* Filiz Meryem Sertpoyraz** Anıl Baysol*
Elif Merve Girgin* Ali Taylan***

* SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya, İzmir, Türkiye

** SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, İzmir, Türkiye

*** SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Romatoloji, İzmir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 13 Ekim 2020

Kabul Tarihi: 06 Aralık 2020

ÖZET

Amaç: Romatoid artrit (RA), sinovyal enflamasyon, kıkırdak hasarı ve kemik erozyonu ile karakterize kronik, progresif, otoimmün bir hastalıktır. İskemi modifiye albümin (İMA), ateroskleroz ile ilişkili miyokard iskemisini değerlendirmek için kullanılabilecek potansiyel bir belirteçtir. Miyokard enfarktüsü ve inme gibi kardiyovasküler olaylar romatizmal hastalıklarda sık görülen hastalıklardır. Romatoid artritli hastalarda hastalık aktivitesi ile iskemi modifiye albümin düzeyi ve iskemi modifiye albümin/albümin oranı (İMAO) arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

Materyal ve Metod: Bu çalışmaya 72 romatoid artrit hastası ve 72 sağlıklı kontrol alındı. Hastalık aktivitesi, hastalık aktivite skoruyla (DAS-28) değerlendirildi. Serum iskemi modifiye albümin düzeyi, albümin kobalt bağlanma testi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Bulgular: Romatoid artrit grubunda ve sağlıklı kontrollerde ortalama iskemi modifiye albümin düzeyleri sırasıyla 0.46 ± 0.16 ABSU ve 0.39 ± 0.10 ABSU idi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.002$). Romatoid artrit grubunda, hastalık aktivite skoru ile serum iskemi modifiye albümin düzeyi ($r = 0.419$, $p = 0.001$), serum iskemi modifiye albümin /albümin oranı ($r = 0.594$, $p < 0.001$) ve serum C-reaktif protein (CRP) düzeyi ($r = 0.648$, $p < 0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki bulundu.

Sonuç: Romatoid artrit 'li hastalarda DAS-28 ile iskemi modifiye albümin düzeyi arasındaki pozitif yönde ilişki, iskemi modifiye albümin'in hastalık aktivitesi için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hastalık aktivite skoru, İskemi modifiye albümin, Romatoid artrit

Ayfer Çolak : 0000-0003-4910-0128

Yazışma adresi: Ayfer Çolak
SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, Biyokimya, İzmir
E-mail: ayfercolak@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive, autoimmune disease characterized by synovial inflammation, cartilage damage and bone erosion. Ischemia modified albumin (IMA) is a potential marker that can be used to assess atherosclerosis-related myocardial ischemia. Cardiovascular events such as myocardial infarction and stroke are common diseases in rheumatic diseases. We aimed to evaluate the relationship between disease activity and ischemia modified albumin level and ischemia modified albumin / albumin ratio (IMAO) in patients with rheumatoid arthritis.

Material and Methods: This study included 72 rheumatoid arthritis patients and 72 healthy controls. Disease activity was evaluated with the disease activity score (DAS28). Serum ischemia-modified albumin concentration was measured spectrophotometrically using the albumin cobalt binding test.

Results: The mean ischemia-modified albumin concentrations in rheumatoid arthritis group and healthy controls were 0.46 ± 0.16 ABSU and 0.39 ± 0.10 ABSU, respectively, and the difference was statistically significant ($P = 0.002$). Serum ischemia-modified albumin levels were found to be positively correlated with Disease Activity Score of 28 joints (DAS28), serum ischemia modified albumin / albumin ratio and serum C-reactive protein (CRP) level ($r = 0.419$, $r = 0.594$, $r = 0.648$, respectively).

Conclusion: Higher levels of ischemia-modified albumin in patients with rheumatoid arthritis or in those with active disease suggest that it may be associated with pathogenesis and activity of the disease.

Key words: Disease activity score, Ischemia modified albumin, Rheumatoid arthritis

GİRİŞ

Romatoid artrit (RA), sinovyal enflamasyon, kıkırdak hasarı ve kemik erozyonu ile karakterize kronik, progresif, otoimmün bir hastalıktır (1). Dünya çapında yetişkinlerde tahmini prevalansı % 0,8-1 olan ve daha sık kadınları etkileyen RA, fonksiyonel sınırlamalara, çalışma gücüne ve düşük yaşam kalitesine neden olur (2). RA etiyolojisi kesin bilinmemekle birlikte enfeksiyon, genetik, çevresel ve endokrin faktörlerin rol aldığı düşünülmektedir. RA'da en çok sinovyal ve kıkırdak hücreleri etkilendiği için erken belirtileri eklem ağrısı ve şişliktir. RA'ın tanısı kadar, erken remisyona ulaşmak ve sakatlığı önlemek veya azaltmak için hızlı ve doğru yönlendirme önemlidir (3). RA riski taşıyan hastaları veya hastalığın erken aşamasını saptamak, gelişimini önlemek ve tedaviye başlamak için biyobelirteçler den yararlanılır. Bu biyobelirteçlerden romatoid faktör (RF) duyarlı fakat özgül olmayan bir ölçüttür ve RA de % 50-80 arttığı saptanmıştır. Serumda siklik sitrulin peptid'e karşı oluşmuş antikorların (anti-CCP), romatoid artrit için daha yüksek oranda spesifik olduğu gösterilmiştir(4).

Laboratuvar bulgularında en sık kullanılan inflamasyon göstergesi eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerindeki artış; hastalığa özgü olmasa da hastalığın aktif olduğunu düşündürür (5). Hastalık aktivitesinin takibinde; klinik, laboratuvar ve radyolojik değerlendirmeleri kapsayan bir indeks olan DAS 28 (hastalık aktivite skoru) hastalık aktivite skoruna bakılır. DAS 28, hassas eklem sayısı, şiş eklem sayısı, ESH ve hastanın genel durumunu ile ilişkilidir(6).

Albüminin amino terminal ucu, kobalt ve nikel gibi metalleri bağlama kapasitesine sahiptir. Çeşitli hastalıklarla ilişkili iskemi, hipoksi, artan serbest radikaller ve asidoz, albuminin moleküler yapısında değişikliklere neden olur ve bu metal iyon bağlama kapasitesini azaltır. Albüminin bu yeni izoformuna iskemik modifiye albümin (İMA) adı verilir. Serum İMA düzeyleri ve İMA / albümin oranının (İMAO) miyokardiyal iskemi, akut inme, kas iskemisi ve bağırsak iskemisi gibi çeşitli hastalıklarda arttığı gösterilmiştir (7,8). Romatizmal hastalıklarda, miyokard enfarktüsü ve inme gibi kardiyovasküler olaylar sık görülür. Literatürde RA

de artmış serum İMA konsantrasyonlarını ve İMAO'ı bildiren çalışmalar bulunmakla birlikte hastalık aktivitesi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda RA'lı hastalarda hastalık aktivitesi ile İMA düzeyi ve İMAO arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fizik Tedavi Polikliniğine başvuran hastalardan 72 RA hastası ve 72 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Çalışma için SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurulundan izin alındı. Hasta ve kontrol grubunun dışlama kriteri olarak akut enfeksiyon, diyabet, kanser ve kronik hastalıklar belirlendi. Hastalık aktivitesi, hastalık aktivite skoruyla (DAS-28) değerlendirildi ve buna göre hastalar 3 alt gruba ayrıldı. DAS 28 aktivitesinin 5.1'den fazla olması yüksek düzey hastalık aktivitesini, 5.1- 3.2 arası orta düzey hastalık aktivitesini, 2.6-3.2 arasında düşük düzey hastalık aktivitesini göstermektedir.

Serum İMA seviyeleri, Bar-Or ve arkadaşlarının geliştirdiği kolorimetrik bir yöntem olan albümin kobalt bağlama testi ile ölçüldü (9). 200 µL hasta serumu, 50 µL 0.1% kobalt klorid ile karıştırılıp 5 dakika süreyle inkübe edilerek, kobaltın albümine bağlanması sağlandı. İnkübasyondan sonra 50 µL dithiothreitol (DTT) (Sigma, 1.5 mg/ml H₂O) eklendi ve DTT'nin albümine bağlanmamış kobalt ile renkli bir kompleks oluşturması sağlandı. Oluşan renkli kompleks 470 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar absorbance units (ABSU) olarak verildi. İMA düzeyleri, serum albümin düzeylerine bölünerek İMAO düzeyleri hesaplandı. İMAO düzeyleri ABSU/g (absolüt ünite/gram) şeklinde gösterildi.

Bireylerden 8 saat açlık sonrasında biyokimyasal tetkikler için kan alındı. Hastaların venöz kanları, SST (5.0 ml) Becton Dickinson Vacutainer SST II Advance (lot no: 5159077; BD Diagnostics, Plymouth, UK) tüpüne alındı ve 5-6 kez alt-üst edilip pıhtılaşması için oda sıcaklığında 30 dk beklendi. Oda ısısında 1600 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Hemolitik, ikterik ve lipemik örnekler çalışmadan çıkarıldı.

Biyokimyasal testler aynı gün çalışıldı. İMA için, serumdan alikotlanan örnekler -80°C'de en fazla 6 ay süreyle muhafaza edildi. Çalışmadan önce çözölmüş numuneler, önce birkaç kez ters çevrilerek oda sıcaklığına getirildi. Serum CRP, albumin, kolesterol, trigliserid, LDL-K, HDL-K düzeyi, Beckman Coulter AU 5800 (Olympus Diagnostics, GmbH, Hamburg, Germany) otoanalizörü kullanılarak ölçüldü.

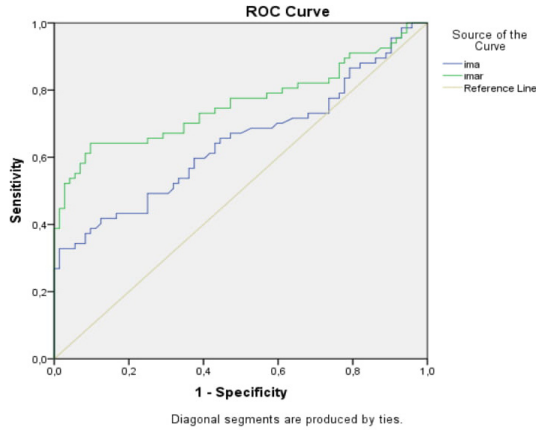
İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) analiz programı kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov testi ile değişkenlerin normal dağılımı değerlendirildi. Normal dağılım gösteren kontrol ve hasta grubunun değerleri ortalama + SD şeklinde gösterildi ve independent student-t testiyle gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Değişkenler arasındaki korelasyona spearman korelasyon testiyle bakıldı. RA hasta alt gruplarında normal dağılım özelliği gösteren verilerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ve post hoc Bonferroni testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyenler Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı. İMA ve İMAO parametrelerinin tanısal değerlerinin analizi için ROC (receiver operator characteristics curve) analizi yapıldı. P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

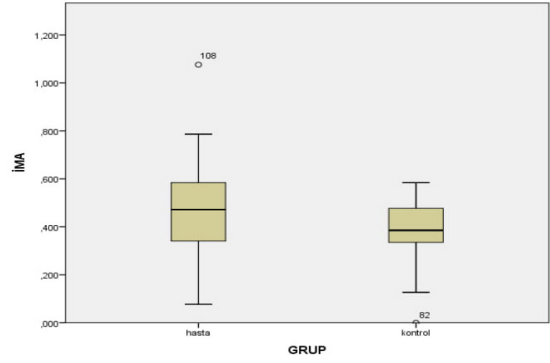
BULGULAR

Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir. RA grubunda ve sağlıklı kontrollerde ortalama İMA düzeyleri sırasıyla 0.46 ± 0.16 ABSU ve 0.39 ± 0.10 ABSU idi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.02$). Aynı şekilde RA grubunda İMA / albümin oranı (İMAO) 0.14 ± 0.05 kontrol grubunda 0.09 ± 0.02 idi ve aralarındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.01$). DAS 28 aktivitesi üç ayrı grupta (düşük, orta, yüksek) incelendi. Hastaların 13'i düşük düzey, 41'i orta düzey, 18'i yüksek düzey hastalık aktivitesine sahipti. Hastalık aktivite skoru DAS28 ile serum İMA düzeyi ($r = 0.419$, $p = 0.001$), serum İMAO ($r=0.594$,

$p < 0.001$) ve serum C-reaktif protein (CRP) düzeyi ($r = 0.648$, $p < 0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki bulundu. RA hasta sub grupları arasında, serum İMA, İMAO, CRP ve albümin değerlerinde anlamlı fark gözlemlendi (Tablo 3). İMA ve İMAO değerlerinin hastalık tanılma değeri için yapılan ROC (receiver operator characteristics curve) analizi sonuçlarına göre İMA tanılma değeri %65.5 iken (eğri altında kalan alan: 0.655), İMAO tanılma değeri %75.9 olarak (eğri altında kalan alan: 0.759) bulundu. Serum İMA düzeyinin sensivitesi %31.9 ve spesivitesi %98.6, serum İMAO düzeyinin sensivitesi %64.2 ve spesivitesi %90.3 olarak bulundu.

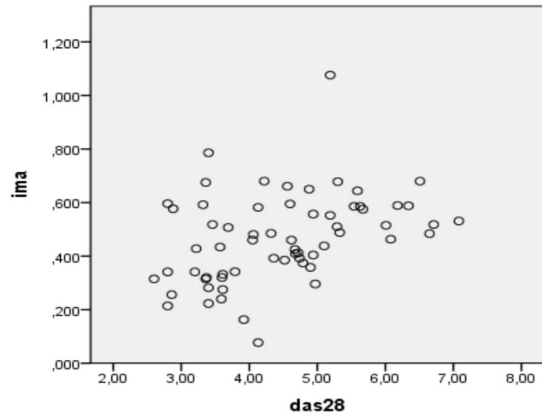


Şekil 1. ROC analizi sonuçları
Figür 1. ROC analysis result



Şekil 2. Kontrol grubu ve RA hastalarında İMA düzeylerinin karşılaştırılması

Figür 2. Comparison of İMA levels in the control group and RA patients



Şekil 3. RA grubunda serum İMA seviyeleri ile DAS28 skoru arasındaki korelasyon

Figür 3. Correlation between serum İMA levels and DAS28 score in RA group

Tablo 1. Hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal testlerinin karşılaştırması
Table 1. Comparison of biochemical tests of patient and control group

	KONTROL (n=72)	HASTA (n=72)	P
Yaş (yıl)	49.8 ± 11.5	53.5 ± 13.2	0.08
Cinsiyet (K/E)	56/14	60/14	
Kolesterol (mg/dL)	216 ± 42	209 ± 42	0.35
Trigliserit (mg/dL)	146 ± 70	145 ± 70	0.91
HDL-Kolesterol(mg/dL)	57 ± 52	45 ± 12	0.08
LDL-Kolesterol (mg/dL)	135 ± 37	134 ± 35	0.84
Albümin (g/dL)	45 ± 0.6	3.5 ± 0.7	<0.01
CRP (mg/dL)	1.7 ± 1.3	2.4 ± 3.4	0.13
İMA (ABSU)	0.39 ± 0.10	0.46 ± 0.16	0.02
İMAO (ABSU/g)	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.05	<0.01

CRP: C- reaktif protein, İMA: İskemi modifiye albümin, İMAO: İskemi modifiye albümin / albümin oranı

TARTIŞMA

RA hastalık patogenezi oluşturan inflamatuvar yanıtta hücrel ve humoral immünitinin birlikte yer aldığı gösterilmiştir. Genetik ve çevresel faktörler dahil olmak üzere çeşitli faktörler arasındaki etkileşimlerin, uygun olmayan bir immünomodülasyona yol açtığı ve sinovyal yapıların hasar görmesiyle sonuçlanan inflamatuvar bir sürece yol açtığı düşünülmektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) bu süreçte önemli rol oynadığı belirtilmiştir(10). Sistemik bir hastalıkla birlikte artan oksidatif stres, iltihap gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir faktördür. İskemi modifiye albümin (İMA), oksidatif stresin sistemik bir belirteci olarak son zamanlarda kabul görmüştür. İMA, albüminin ağır geçiş metallerini bağlama kapasitesindeki değişikliklerin bir sonucu olarak üretilir ve aterosklerotik kalp hastalığı ile ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır(8). İskemik hastalıklar için farklı İMA kesme değerleri bildirilmesine rağmen, 0.400 absorbans biriminden (ABSU) yüksek serum seviyeleri genellikle iskemi belirtisi olarak kabul edilir(11). Çalışmamızda; RA li hastalarda serum İMA düzeyi bu sınırın üzerinde bulundu ve kontrol grubuna kıyasla daha yüksek İMA seviyelerine sahipti. RA hastalarında İMA düzeyinin değerlendirildiği çalışmalarda, bizimkine benzer şekilde RA hastalarında İMA düzeyleri yüksek ve kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmuştur (8,12). Kronik karaciğer hastalarında, albümin düzeyinin düşmesine bağlı olarak İMA ölçümü ile birlikte, daha değerli bir veri olabileceği düşünüldükçe bazı çalışmalarda İMA / albümin oranı da hesaplanmıştır (13). Bizim çalışmamızda da RA hastalarında serum İMA / albümin oranını yüksek bulunmuş olup kontrol grubuyla arasındaki fark anlamlı çıkmıştır.

RA hastalarında, Hastalık aktivite skoru DAS28 ile serum İMA, İMAO ve serum C-reaktif protein (CRP) düzeyi arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde, bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir ilişki bulundu. RA hastalarında hemogram parametrelerinden nötrofil lenfosit oranı (NLO), trombosit lenfosit (PLO) oranlarının

değerlendirildiği bir çalışmada DAS 28 aktivite skoru artışı ile NLO ve PLO arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır(6). Yine benzer bir çalışmada RA hasta grubunda serum CRP, ESH seviyeleri, NLO ve PLO anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(5).

RA hastalarında, İMA ve İMAO değerlerinin tanısal değerini incelediğimizde, serum İMA / albümin oranının serum İMA seviyesine göre daha yüksek sensivite ve spesiviteye sahip olduğunu saptadık. Böylece serum İMA düzeyinin değerlendirildiği çalışmalarda, ayrıca serum İMA / albümin oranının belirlenmesinin önemli olduğunu gösterdi.

RA hastalarının alt gruplarını değerlendirdiğimizde serum İMA, İMAO ve CRP seviyelerinin düşük seviyeli gruptan yüksek seviyeye doğru gittikçe arttığını, albümin seviyesinin ise azaldığını saptadık. Her üç parametrede de gruplar arasında anlamlı fark vardı. Hastalık aktivite durumunun değerlendirildiği bir çalışmada da CRP seviyeleri bizimkine benzer şekilde artış göstermiştir(6).

RA hastalarında serum leptin düzeylerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, yüksek hastalık aktivitesi grubundaki düzey, düşük hastalık aktivitesi grubundan ve sağlıklı kontrollerden anlamlı derecede yüksek bulunmuş, yüksek ile orta hastalık aktivite grubu karşılaştırıldığında serum leptin düzeyinde anlamlı bir fark gösterilmiştir. RA grubunda serum leptin seviyesi ile hastalık aktivite skoru (DAS28) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki gözlenmiştir(1).

Rutin klinik uygulamada RA hastalık takibinde kullanılan inflamatuvar parametreler CRP ve ESH gibi hastalığa özgül olmayan inflamatuvar belirteçlerdir (5). Çalışmamızda serum CRP düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadı. Bu farkın olmamasını, kontrol grubunu oluştururken serum CRP düzeyini etkileyen faktörleri yeterince dışlamamış olabileceğimize bağladık. Çünkü RA hastalarında serum CRP düzeyi, DAS28 ile pozitif yönde koreleydi. Çalışmamızın kısıtlılıklarından bir başkası da, oksidatif stres belirteci olarak sadece

İMA ve İMAO, enflamasyon belirteci olarak ise sadece CRP değerlerini kullanmamızdır.

RA hastalarında, serum İMA ve İMAO düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunması ve hastalık aktivitesi ile pozitif yönde ilişkili

olmaları göz önüne alındığında, enflamatuvar reaksiyonlarında serum İMA ve İMAO düzeyi önemli olabilir ve hastalık şiddeti ile ilişkilidir, prognostik öneme sahip olabilir.

KAYNAKLAR

1. Dervişević A, Resić H, Sokolović Š, Babić N, Avdagić N, Začiragić A, et al. Leptin is associated with disease activity but not with anthropometric indices in rheumatoid arthritis patients. *Arch Med Sci* 2018 Aug;14(5):1080-1086.
2. Atzeni F, Talotta R, Masala I.F, Bongiovanni S, Boccassini L and Sarzi-Puttini P. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis; *Isr Med Assoc J* 2017 Aug; 19(8): 512-516.
3. Allen A, Carville S, McKenna F, Guideline Development Group; Diagnosis and management of rheumatoid arthritis in adults: summary of updated NICE guidance, *BMJ* 2018 Aug 3;362:k3015. doi: 10.1136/bmj.k3015.
4. Schellekens GA, Visser H, De Jong BAW, Van Den Hoogen FHJ, Hazes JMV, Breedveld FC et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 43, No. 1, January 2000. p. 155-163
5. Kilic E, Rezvani A, Toprak A.E, Erman H, Ayhan S.K, Poyraz E et al. Romatoid Artrit Nötrofil/ Lenfosit ve Platelet/ Lenfosit Oranlarının Değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi* 2016;43(2):241-247.
6. Doğan AG, Boyacıoğlu MZ, Doğan M. Romatoid artrit nötrofil lenfosit ve platelet lenfosit oranlarının hastalık aktivite indeksine göre değerlendirilmesi. *J Health Sci Med* 2020;3(3):312-316.
7. Yavuz F, Bıyık M, Asil M, Dertli R, Demir A, Polat H, et al. Serum ischemic modified albumin (IMA) concentration and IMA/albumin ratio in patients with hepatitis B-related chronic liver diseases. *Turk J Med Sci* (2017)47:947-953.
8. Uslu AU, Kucuk A, Balta S, Öztürk C, Arslan S, Tekin L et al. The relation between ischemia modified albumin levels and carotid intima media thickness in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2019 Jan; 22(1):32-37.
9. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med* 2000;19:311-5.
10. CeliaMaría Quiñonez-Flores, Susana Aideé González-Chávez, Danyella Del Río Nájera, and César Pacheco-Tena, Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2016;2016: 6097417. doi: 10.1155/2016/6097417
11. Kılıç MÖ, Gündoğan CE, Balamir I, Tez M. Ischemia-modified albumin as a predictor of the severity of acute appendicitis. *Am J Emerg Med.* 2017 Jan; 35(1):92-95.
12. Leitemperguer MR, Tatsch E, Kober H, Moresco RN. Assessment of Ischemia-Modified Albumin Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin Lab.* 2014; 60(6):1065-70.
13. Cakir M, Karahan SC, Mentese A, Sağ E, Çobanoğlu U, Polat PB et al. Ischemia-modified albumin levels in children with chronic liver disease. *Gut Liver* 2012;6:92-7.

KLL vakalarında akım sitometri analizi ile κ ve λ hafif zincir ekspresyonlarının değerlendirilmesi

Evaluation of κ and λ light chain expressions by flow cytometry analysis in cases of CLL

Çiğdem Özdemir*

Filiz Yavaşoğlu**

Tülay Köken***

* Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji AD., Afyonkarahisar, Türkiye

** Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD, Afyonkarahisar, Türkiye

*** Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Afyonkarahisar, Türkiye

Başvuru Tarihi: 19 Temmuz 2020

Kabul Tarihi: 01 Aralık 2020

ÖZET

Amaç: B lenfositlerinin klonalitesinin akım sitometri analizi ile doğrulanması Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) tanısında önemli bir yere sahiptir. Bu retrospektif çalışmada KLL hücrelerinin monoklonalitesinin göstergesi olarak hangi yüzey hafif zincir paterni gösterdikleri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: 33 KLL hastasının (12 kadın/ 21 erkek) periferik venöz kanına ait akım sitometri sonuçları geriye dönük incelenmiştir. KLL immunfenotipleme panelinde yer alan antikorların uygulanması ve lysing prosedüründen sonra elde edilen örneklerin okuma sonuçları değerlendirildi. CD19 ve CD5'i birlikte eksprese eden hücreler KLL hücreleri, olarak kabul edildi ve bu hücrelerin monoklonalitesini değerlendirmek için kappa ve lambda hafif zincir ekspresyonları değerlendirildi.

Bulgular: Tüm vakalar değerlendirildiğinde kappa monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %30.3 iken lambda monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %51.5 olduğu görüldü. %18.2 vakada da her iki hafif zincir ekspresyonunun da olmadığı görüldü.

Sonuç: Çalışmaya alınan hastalarımızda KLL hücrelerinde en sık lambda hafif zincir restriksiyonu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kronik Lenfositik Lösemi; Akım Sitometri; kappa/lambda

Tülay Köken: 0000-0001-5510-9415
Çiğdem Özdemir: 0000-0003-2129-3044
Filiz Yavaşoğlu: 0000-0003-1935-9235

2011-KAEK-2 kodlu etik kurulun 2020/292 sayılı kararı

Yazışma adresi: Tülay Köken
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Afyonkarahisar,
Türkiye
e-mail: tkoken1967@yahoo.com

ABSTRACT

Objective: Confirmation of the clonality of B lymphocytes by flow cytometry analysis has an important role in the diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). In this retrospective study, we investigated which surface light chain pattern they showed as indicative of the monoclonality of CLL cells.

Material and Methods: Flow cytometry results of 33 CLL patients (12 women / 21 men) were examined retrospectively. The reading results of the samples obtained after the application of the antibodies in the CLL immunophenotyping panel and the lysing procedure were evaluated. Cells that co-express CD19 and CD5 were considered CLL cells, and kappa and lambda light chain expressions were evaluated to the monoclonality of these cells.

Results: When all cases were evaluated, the percentage of cases showing kappa monoclonality was 30.3%, while the percentage of cases showing lambda monoclonality was 51.5%. It was observed that both light chain expressions were absent in 18.2% of cases.

Conclusion: In our patients, lambda light chain restriction was observed most frequently in CLL cells.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia; Flow Cytometry; kappa/lambda

GİRİŞ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) kemik iliğinde bulunan tek bir hücrenin DNA'sında sonradan meydana gelen değişiklik nedeniyle, morfolojik olarak olgun görünümlü küçük monoklonal B lenfositlerinin ilerleyici birikimi ile karakterize lenfoproliferatif bir hastalıktır.

KLL tanısı için, National Comprehensive Cancer Network (NCCN), International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) ve European Society of Medical Oncology (ESMO) ortak yayınladıkları rehberde periferik kanda B lenfosit sayısının $\geq 5 \times 10^9$ /L olması ve dolaşımdaki B lenfositlerinin klonalitesinin akım sitometri analizi ile doğrulanması gerektiği konusunda hemfikirdir (1, 2, 3). NCCN, akım sitometri analizi ile immüno fenotipleme için, kappa /lambda, CD19, CD20, CD5, CD23 ve CD10 hücre yüzeyi markırlarının kullanılmasını önermektedir. Neoplastik B hücrelerinin CD19, CD5, CD23 eksprese ederken CD20 ve monoklonal yüzey immüno globulinin (slg) zayıf eksprese etmesi immüno fenotiplemede tanı ölçütü olarak gösterilmektedir. KLL tanısında moleküler anormallikler gösterilmekle beraber, hiçbir KLL için spesifik olmadığından immüno fenotipleme KLL tanısında önemli bir rol oynamaktadır.

Neoplastik B hücrelerinde hafif zincir ekspresyonlarının akım sitometri analizi ile gösterilmesi klonaliteyi doğrulamanın bir yoludur (4). İmmüno globulinlerin kappa ve lambda olmak üzere iki tip hafif zinciri vardır. Normal bir B hücresi ya kappa ya da lambda hafif zincirinden sadece birini eksprese eder. Sağlıklı kişilerde B lenfosit popülasyonları yaklaşık olarak 2:1 oranında kappa:lambda hafif zincirleri ekspresyonunu gösterirken (5), 3: 1 ve 0.3: 1 aralığının dışında bir oran genellikle monoklonal (3.0 ila 0.3) olarak kabul edilir (6). Araştırmalar malign hücrelerin, genetik bir transformasyon ve tek bir hücrenin proliferasyonundan kaynaklandığı hipotezini uzun zamandır desteklemektedir. Bu nedenle, tek bir hücre hattından proliferen olan malign B hücreleri bir klon olarak tanımlanır. Bu klonal artış da "monoklonal hafif zincir restriksiyonu" olarak adlandırılır. Monoklonal hafif zincir restriksiyonu neoplastik B hücrelerinin bir göstergesi olarak kabul edilmekle birlikte her iki hafif zinciri ayrı ayrı eksprese eden B hücre popülasyonu içeren KLL vakaları (biklonal) (7,8) ile her iki hafif zinciri birlikte eksprese eden B hücre popülasyonu içeren KLL vakaları (dual) da gösterilmiştir (9).

Bu çalışmada KLL tanısı alan vakalarımızın lenfositlerinde hangi yüzey hafif zincir paterni gösterdikleri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji kliniğinde, klinik, morfolojik ve immunfenotipik bulgular ile tanı almış yaş ortalaması 64 (en küçük 44, en büyük 78) olan 33 KLL hastasının (12 kadın/ 21 erkek) periferik venöz kanına ait akım sitometri sonuçları geriye dönük incelenmiştir (2011-KAEK-2 kodlu etik kurulun 2020/292 sayılı kararı ile onay alınmıştır).

Akım Sitometri Analizi

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınan periferik venöz kan örnekleri 24 saat içerisinde işleme alınan hastaların sonuçları çalışmaya alınmıştır. KLL immunfenotipleme panelinde yer alan (CD19, CD20, CD5, CD23, CD38, CD10, CD2, CD200, CD7, CD79a, CD34, CD117, CD43, FMC7, CD14, CD33, MPO, kappa ve lambda hafif zincir) antikorların uygulanması ve lysing prosedüründen sonra elde edilen örneklerin okuma sonuçları değerlendirildi. Okumalar Beckman Coulter, (Miami, USA) firmasına ait Navios Ex model cihazında, yine aynı firmaya ait antikorlar kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak CD45-Side Scatter (SSC) grafiği üzerinde lenfositler işaretlendi. Bu popülasyonda CD19 ve CD5'i birlikte ekspres eden hücreler KLL hücreleri, olarak değerlendirildi.

B hücrelerinin monoklonalitesini değerlendirmek için kappa ve lambda hafif zincir ekspresyonları değerlendirildi. Kappa: lambda oranı 3:1 ve 0.3:1 aralığının dışında olanlar monoklonal olarak kabul edildi (6).

İstatistik

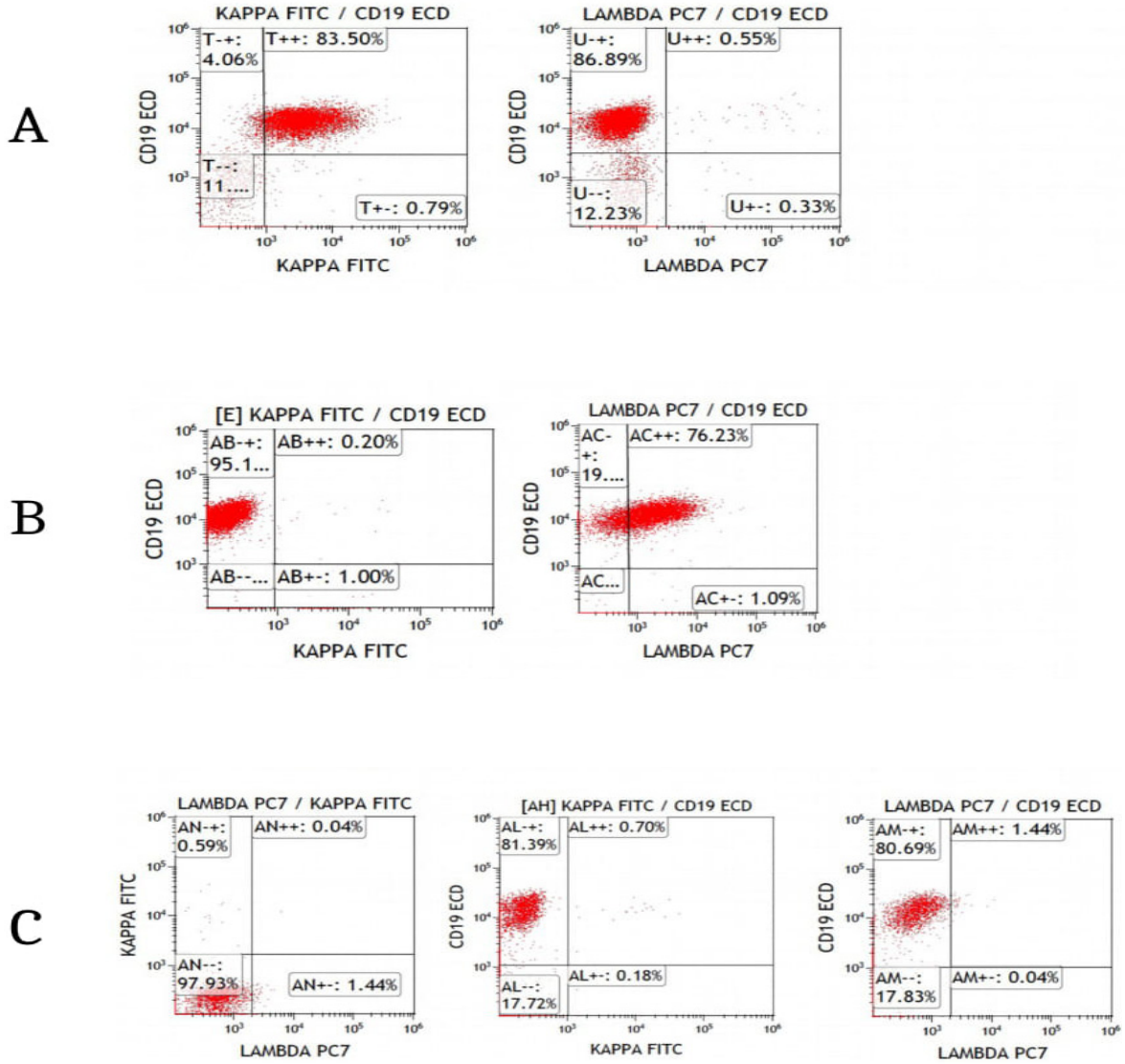
Hücre yüzeyinde kappa ve lambda hafif zincir ekspres eden KLL hücrelerinin yüzdeleri akım sitometri cihazının verilerinden elde edilmiştir.

BULGULAR

Akım sitometri ile belirlenen yüzey hafif zincir ekspresyonları üç farklı patern ortaya koydular. İlk patern sadece kappa hafif zincir ekspres ederken (n:10) (Şekil 1A), ikinci patern sadece lambda hafif zinciri (n:17) (Şekil-1B), üçüncü patern de hafif zincir ekspres etmediği görüldü (n:6) (Şekil-1C). Tüm vakalar değerlendirildiğinde kappa monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %30.3 iken lambda monoklonalitesi gösteren vaka yüzdesi %51.5 olduğu görüldü. %18.2 vakada da her iki hafif zincir ekspresyonunun da olmadığı görüldü (Tablo 1). Şekil 2'de Hafif zincir ekspres eden KLL hücrelerinin yüzdeleri verilmiştir. KLL hücrelerinin lambda klonite gösteren vakalarda kappa klonite gösteren vakalardan daha fazla hafif zincir ekspres ettiği görülmüştür.

Tablo 1. KLL hastalarının hafif zincir ekspresyon paternleri
Table 1. Light chain expression patterns of CLL patients

	Kappa Klonal	Lambda Klonal	Kappa/Lambda
Hasta Sayısı	10	17	6
(Kadın/Erkek)	(4/6)	(6/11)	(2/4)
Hasta %	%30,3	%51.5	%18.2
% (Kadın/Erkek)	(12.1 / 18.2)	(18.2 / 33.3)	(6.1 / 12.1)



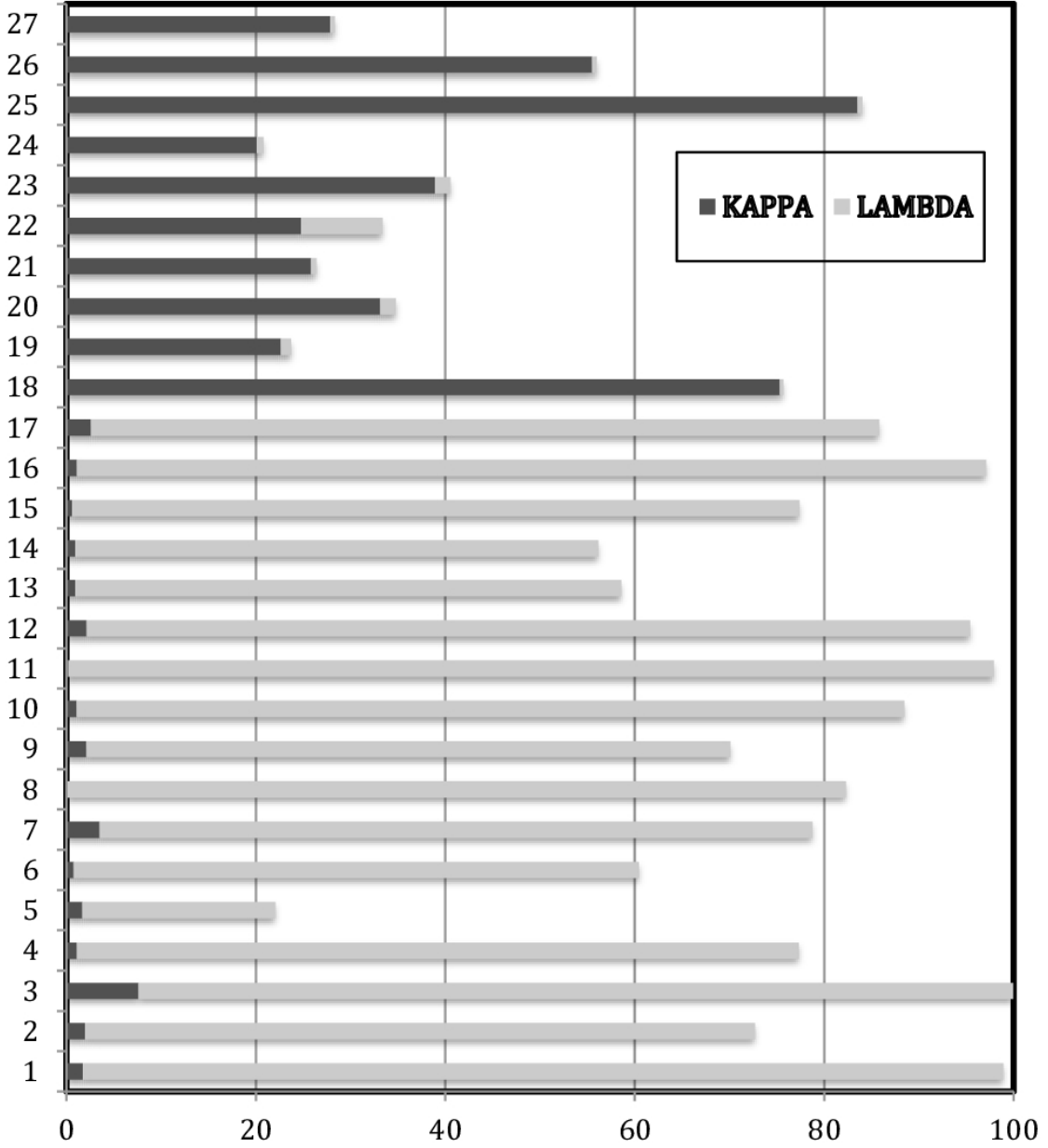
Şekil 1: KLL hücrelerinde hafif zincir ekspresyon paternleri;

Figure 1: Light chain expression patterns in CLL cells;

(A) Kappa klonite gösteren patern / (A) Pattern showing Kappa clone

(B) Lambda klonite gösteren patern / (B) Pattern showing lambda clone

(C) Hafif zincir eksprese etmeyen patern. / (C) Pattern not expressing light chains.



Şekil 2. Kappa ve Lambda klonite gösteren KLL hücrelerinin hafif zincir ekspres etme yüzdeleri.
Figure 2. Light chain expression percentages of CLL cells showing Kappa and Lambda clonites.

TARTIŞMA

Olgun B hücreleri, adaptif immün sistem gereğince kappa ve lambda hafif zincirden birini içeren immünglobulin eksprese ederek klonal çeşitlilik gösterirler. Normal veya reaktif B hücrelerinin aksine, KLL hücreleri klonaldır, sadece tek bir immünglobulin türünü eksprese eder ve bu nedenle kappa

veya lambda hafif zinciri için monotipiktir. KLL hücreleri nadir de olsa biklonal ya da dual hafif zincir ekspresyonu gösterebilirler. Bu bulgular KLL tanısında önemli bir yere sahiptir.

Bu retrospektif çalışmada KLL vakalarında lambda restriksiyonuna (%51.5) kappa restriksiyonundan (%30.3) daha sık oranda

rastlanmıştır. Alves ve arkadaşları Brezilya'da 80 KLL hastada yaptıkları immunfenotipleme çalışmasında kappa hafif zincir restriksiyonun lambdadan daha sık rastlandığını (%57.9) göstermişlerdir (10). Pavia ve arkadaşları ise 43 KLL hastasının tümünde kappa/lambda oranını 10:1'den daha yüksek bulmuşlar ve %86'sının kappa hafif zincir, % 14'ünün de lambda hafif zincire sahip bir monoklonal B hücresi proliferasyonu olduğunu göstermişlerdir (11). Kappa hafif zincir restriksiyonunun daha fazla görüldüğü diğer bir çalışmada da tüm hastaların %54.5'inin kappa, %45.5'inin de lambda monoklonaliteye sahip olduğu gösterilmiştir (12). Literatürdeki bu verilerden farklı olarak hastalarımızda lambda hafif zincir restriksiyonunun daha fazla görülmesinin pek çok sebebi olabileceği gibi en önemli nedeni farklı ülke insanlarında yapılmış olmasıdır.

Çalışmamızda her iki hafif zinciri de eksprese etmeyen 6 vaka (%18.2) görülmüştür. Genellikle yüzey immünoglobulinlerini eksprese etmeyen plazma hücre tümörleri ve prekürsör B hücresi akut lenfoblastik lösemisinin (ALL) aksine, B hücre malignitelerinde yüzey hafif zincirlerinin ekspresyonu eksikliği sık rastlanmayan bir durum olduğunu gösteren çalışmalar yanında (11-12) farklı olarak bizimle benzer sonuçlar gösteren çalışmalarda da rastlanmaktadır. Bhola ve arkadaşları 42 KLL vakasında yaptıkları çalışmalarında 5 vakanın (%11.9) KLL hücrelerinde her iki hafif zincirin de eksprese etmediğini göstermişlerdir (13). Martini ve arkadaşları da 271 B hücreli non-Hodgkin lenfoma vakası üzerinde yaptıkları çalışmada yüzey

hafif zincir eksprese etmeyen 33 hasta olduğunu ortaya koymuşlardır (14).

KLL vakalarında görülen bir diğer patern KLL hücrelerinin biklonal karakterde olmasıdır. Bu patern oldukça nadir olup insidansı %0.7 ila %3.4 arasında değişmektedir (15-16). Hastalarımız arasında biklonal paterne rastlamadık. Hasta sayımızın az olması ve insidansın düşük olmasının buna neden olabilir. İnsidansın %3.4 olarak belirlendiği çalışmalardan birinin 5523 KLL vakasında (16) bir diğerinde de 353 KLL vakasında yapıldığı görülmektedir (17).

B hücre popülasyonunda hafif zincir restriksiyonunun gösterilmesi genellikle monoklonalitenin bir kanıtı olup malignitenin de bir göstergesi olarak kabul edilmekle beraber son dönemde yapılan çalışmalar her iki hafif zinciri birlikte eksprese eden (dual) B hücrelerin de malignite işareti olduğunu ortaya koymuştur (18). Literatürde dual hafif zincir eksprese eden KLL vakaları yer almakla beraber (9,19,20) insidans gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmadaki KLL hastaları arasında bu nadir görülen dual hafif zincir ekspresyonu görülmemiştir.

Akım sitometri analizinde monotipik bir B hücresi popülasyonunun saptanması her durumda bir B hücresi neoplazm göstergesi değildir. Klonal B hücreleri reaktif durumlarda ve monoklonal B hücreli lenfositozda da tespit edilebilir. Bu neden ile her ne kadar akım sitometri verileri KLL tanısında oldukça yardımcı olsa da daima morfoloji ve klinik özellikler ile birlikte yorumlanması gerekir.

KAYNAKLAR

1. Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D. Et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 4.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. JNCCN 2020;18(2):185-217.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood 2008;111(12):5446-56.
3. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2015;26(Suppl 5):v78-84.
4. Leers MP, Theunissen PH, Ramaekers FC, Schutte B, Nap M. Clonality assessment of lymphoproliferative disorders by multiparameter flow cytometry of paraffin-embedded tissue: an additional diagnostic tool in surgical pathology. Hum Pathol 2000; 31(4): 422-7.

5. Levy R, Warnke R, Dorfman RF, Haimovich J. The Monoclonality of Human B cell Lymphomas. *Journal of Experimental Medicine* 1977;145:1014.
6. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325-332.
7. Hsi ED, Hoeltge G, Tubbs RR. Biclonal Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:798-804.
8. Ghodke KA, Patkar NV, Subramanian PG, Gujral S, Kadam PA, Tembhare PR. Biclonal chronic lymphocytic leukemia: A study of two cases and review of literature. *Indian J Pathol Microbiol*. 2017;60(1): 84-6.
9. Dongsheng Xu. Dual Surface Immunoglobulin Light-Chain Expression in B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:853-856.
10. Alves G. VA, Silva L. KF, Albuquerque D. GB, Nascimento FF, Freitas RV, Silva D. GKC, Barbosa M.R, Cavalcanti G. B. Use of Flow Cytometry to Evaluate the Immunophenotypic Profile of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia from Rio Grande Do Norte State, Brazil. *Blood* 2017;130 (Sppl 1): 5325.
11. Paiva A.S, Jardim A.S, Soares V.L, Paiva HD. OP, Bahia FT, Sales V. SF et al. Diagnostic Value of Kappa/Lambda Ratios Determined By Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood and Bone Marrow Specimens in B-Cell Chronic Proliferative Disease. *Blood* 2018;132(Sppl 1): 5431.
12. Abdel-Ghafar AA, El Din El Telbany MA, Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. *Hematol Rep* 2012;4(1):e3.
13. Bhola RK, Das PK, Pradhan S, Chakraborty K, Mohapatra D, Samal P. et al. Multiplexing 8 colors with 12 antibodies in a single lymphoid screening tube by flow cytometry for evaluating suspected chronic lymphoproliferative disorders (CLPD). *J Hematopathol* 2020;13: 13-24.
14. de Martini RM, Turner RR, Boone DC, Lukes RJ, Parker JW. Lymphocyte immunophenotyping of B-cell lymphomas: a flow cytometric analysis of neoplastic and non-neoplastic cells in 271 cases. *Clin Immunol Immunopathol* 1988;49:365-379.
15. González-Campos J, Ríos-Herranz E, De Blas-Orlando JM, Martín-Noya A, Parody-Ruiz-Berdejo R, Rodríguez-Fernández JM. Chronic lymphocytic leukemia with two cellular populations: A biphenotypic or biclonal disease. *Ann Hematol* 1997;74:243-6.
16. Kern W, Bacher U, Schnittger S, Dicker F, Alpermann T, Haferlach T, et al. Flow cytometric identification of 76 patients with biclonal disease among 5523 patients with chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) and its genetic characterization. *Br J Haematol* 2014;164:565-9.
17. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A. et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003;102(8):2994-3002.
18. Peltomäki P, Bianchi NO, Knuutila S, Teerenhovi L, Elonen E, Leskinen R, de la Chapelle A. Immunoglobulin kappa and lambda light chain dual genotype rearrangement in a patient with kappa-secreting B-CLL. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24(7):1233-8.
19. Schipper H, Orr KB, Bow EJ. Coexistence of double gammopathy (IgM κ and IgM λ) in the serum of a single individual with chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1983;69:23-31.
20. Del Senno L, Gandini D, Gambari R, Lanza F, Tomasi P, Castoldi G. Monoclonal origin of B cells producing κ , λ and $\kappa : \lambda$ immunoglobulin light chains in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1987;11:1093-1098.

Diyabetik Hastalarda Hemogloblin Subfraksiyonları ve Total Hemogloblinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Hemoglobin Subfractions and Total Hemoglobin in Diabetic Patients

Kadriye Akpınar Esin Avcı Süleyman Demir

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Denizli, Türkiye

Başvuru Tarihi: 07 Kasım 2020

Kabul Tarihi: 05 Aralık 2020

ÖZET

Amaç: Diyabetik hastaların tanı ve takibinde kullanılan HbA1c ile bu ölçüm esnasında bakılan HbA0, HbF, HbA1 subfraksiyonlarını birlikte değerlendirmek ve hastaların total hemoglobin (THb) düzeylerini göz önünde tutarak HbA1c'nin klinik yararlılığı tartışmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu geriye dönük çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Hastanesi laboratuvar bilgi sistemi kayıtlarında bulunan ve hastanemize başvuran 338 kişi alındı. HbA1c iyon-değiştirici HPLC yöntemiyle TosohG8 cihazında, THb Mindray BC6800 hematoloji analizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştü. Kişiler HbA1c veya THb düzeylerine göre gruplara ayrıldı. İstatistiksel analizde SPSS 22.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Çalışmadaki 338 hastanın HbA1c ortalaması 7.2 ± 1.68 , THb ortalaması 13.4 ± 1.8 g/dL idi. Normal grupta (n=29) prediyabete (n=108) göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.004), LHbA1c (p=0.0001) için anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) için anlamlı yüksek farklar bulundu. Normal gruptakilerde diyabetiklere (n=201) göre ve prediyabetiklerde de diyabetiklere göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.0001), LHbA1c (p=0.0001), SHbA1c/THb (p=0.0001) düzeyleri anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) ise anlamlı yüksekti. Hastalar THb'ye göre değerlendirildiğinde; anemik grupta (n=31), normale (n=286) göre HbA1a (p=0.002), LHbA1c (p=0.002), SHbA1c/THb (p=0.0001); hiperhemoglobinemiklere (n=21) göre de HbA1a (p=0.034) ve SHbA1c/THb (p=0.0001) anlamlı yüksek bulundu. Normal ile hiperhemoglobinemikler karşılaştırıldığında; HbA0 (p=0.021) normal grupta, LHbA1c (p=0.004) ve SHbA1c (p=0.014) hiperhemoglobinemik grupta anlamlı yüksekti. THb ile SHbA1c arasında zayıf pozitif; SHbA1c ile LHbA1c ve HbA0 arasında güçlü pozitif korelasyonlar mevcuttu. THb düzeyine göre ayrılan tüm gruplar arasında anlamlı farkın olmadığı HbA1b ve HbF ile SHbA1c arasında zayıf pozitif korelasyonlar mevcuttu.

Sonuç: Diyabet hastalarında SHbA1c ile diğer Hb subfraksiyonlarını ve THb'yi birlikte değerlendirmek, hastaların glisemi durumlarını yorumlamak açısından daha doğru olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Glike hemoglobin A, hemoglobin A1c proteini, anemi.

Kadriye Akpınar 0000-0002-6951-8866
Esin Avcı 0000-0002-9173-0142
Süleyman Demir 0000-0003-4156-4040

Yazışma adresi: Kadriye Akpınar
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya
e-mail: dr.akpinar.kadriye@gmail.com

ABSTRACT

Aim: We aimed to evaluate HbA1c with HbA0, HbF, HbA1 subfractions and to discuss the clinical usefulness of HbA1c by considering the total hemoglobin (THb) levels of the patients.

Materials and Methods: This retrospektif study included 338 individuals recorded in the laboratory information system of Pamukkale University Hospital. HbA1c analysis was performed on TosohG8 device by ion-exchanger HPLC method. THb was measured by the colorimetric method on the Mindray BC6800 hematology analyzer. Subjects were divided into subgroups according to HbA1c or THb levels. SPSS 22.0 program was used for statistical analysis.

Results: The means of all patients were $7.2 \pm 1.68\%$ for HbA1c, and 13.4 ± 1.8 g/dL for THb. Compared to normals (n=29) with prediabetics (n=108), HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.004), LHbA1c (p=0.0001) were lower; HbA0 (p=0.0001) was higher. Compared to normals with diabetics (n=201) or prediabetics with diabetics HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.0001), LHbA1c (p=0.0001), SHbA1c/THb (p=0.0001) were higher; HbA0 (p=0.0001) was lower in diabetics. When the patients were evaluated according to THb; compared to normals (n=286) HbA1a (p=0.002), LHbA1c (p=0.002), SHbA1c/THb (p=0.0001); compared to hyperhemoglobinemics (n=21) HbA1a (p=0.034) and SHbA1c/THb (p=0.0001) were significantly higher in the anemic group (n=31). Compared to normal group with hyperhemoglobinemics; HbA0 (p=0.021) was higher; LHbA1c (p=0.004) and SHbA1c (p=0.014) were lower. There were strong positive correlations in SHbA1c with LHbA1c and HbA0 and weak positive correlations in HbA1b and HbF with SHbA1c.

Conclusion: Interpreting the patients' glycemia status, it could be more accurate to evaluate SHbA1c with the other Hb subfractions and THb in diabetes.

Keywords: Glycated hemoglobin A, hemoglobin A1c protein, anemia.

GİRİŞ

Monosakkaridlerin veya glukoz kalıntılarının proteinlerdeki serbest amino ($-\text{NH}_2$) grubu ile kendiliğinden (nonenzimatik) reaksiyona girmesine glikasyon denir¹. Nonenzimatik glikasyon ile in vitro ve in vivo değişime uğradığı ilk olarak gösterilen protein, hemoglobin (Hb)'dir. Erişkin insan eritrositinin başlıca Hb'i iki alfa (α) ve iki beta (β) zincirinden oluşan, dolaşımda yaklaşık %90 bulunan HbA (HbA0)'dır². HbA0'dan nonenzimatik glikasyon ile oluşan HbA1 komponentleri, kolon kromatografisi ile izole edilmiş ve elusyon sırasına göre HbA1a (HbA1a1 ve HbA1a2), HbA1b, HbA1c, HbA1d ve HbA1e olarak adlandırılmıştır³.

HbA1c en yaygın bulunan glike hemoglobindir ve ölçüm gününden en az 8-10 hafta öncesinde başlamış olan hiperglisemiye yansır⁴. HbA1c diyabet tanısı ve tedavisi, diyabet hastalarının bakım kalitesini değerlendirmek ve diyabet komplikasyonlarının gelişmesi ve ilerlemesinde oluşan riskleri öngörmek için kullanılır^{5,6}.

HbA1c ölçümü, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller elektroforez gibi separative yöntemler, aynı zamanda immünolojik ve enzimatik yöntemler dahil olmak üzere farklı analitik prensipler kullanılarak gerçekleştirilebilir⁷. HbA1c glisemik kontrolün bir önceki bir sonuca göre iyileşip iyileşmediğini ve hastanın HbA1c hedefine ne kadar yakın olduğunu gösterir. Bu nedenle, en uygun klinik kullanım için, analitik performansın belirlenmesinde referansa göre bias ve belirsizlik (imprecision) dikkate alınmalıdır. HPLC 'National Glyhemoglobin Standardization Program/ Diabetes Control and Complications Trial' (NGSP/DCCT)'ye göre referans metot olarak kabul edilir. HbA1c'nin HPLC yöntemi ile ölçümünde analitik belirsizlik $\leq 2.9\%$, bias $\leq 2.2\%$ ve toplam hata $\leq 6.9\%$ olmalıdır^{8,9}.

Günümüzde HbA1c ölçümü için sık kullanılan yöntemlerden biri olan iyon değiştirici kromatografi (IEC) ile, labil HbA1c (LHbA1c), stabil HbA1c (SHbA1c), fetal Hb (HbF), HbA1a, HbA1b ve HbA0 analizleri yapılmaktadır¹⁰. Minör hemoglobinler, translasyon

sonrası modifikasyonlarla elde edilir. β zincirin amino ucuna glukoz (HbA1c), fruktoz 1,6-difosfat (HbA1a1), glukoz 6-fosfat (HbA1a2) ya da pirüvik asit (HbA1b) bağlanabilir^{11,12}. Minör hemoglobinlerin çoğunu oluşturan HbA1c labil ve stabil alt fraksiyonlarına ayrılır. Labil hemoglobin A1c (LA1c veya pre-glikohemoglobin olarak da bilinir) hemoglobinin glikasyonunun erken aşamasında oluşan geri dönüşümlü bir schiff bazıdır. Unstabil fraksiyonun konsantrasyonu, plazma glukoz seviyesindeki akut değişiklik ile değişir. Bu yüzden diyabet hastaların değerlendirilmesinde stabil HbA1c kullanılır¹³. Literatürde Hb subfraksiyonları için referans aralık henüz mevcut olmayıp, sadece stabil HbA1c değerleri için; %5.7-6.4 (39-46 mmol/mol) prediyabet, $\geq$ %6.5 (48 mmol/mol) diyabet olarak değerlendirilmektedir⁵.

HbA1c değerleri hipergliseminin değerlendirilmesinde güvenilir olmasına rağmen, analizinde hemoglobinopatiler, anemi, antioksidan (C ve E vitamini) kullanımı gibi potansiyel interferanslar ile ilgili laboratuvarlar dikkatli olmalıdır^{7, 14, 15, 16}. Sağlıklı bireylerde dolaşımda yaklaşık %2 bulunan ve iki α iki β zincirinden oluşan HbF'nin yüksek olması da HbA1c için interferansa sebep olabilir ve bu durum asemptomatik HbF yüksekliği olan kişilerde sorun teşkil edebilir¹⁷.

Bu çalışmanın amacı diyabetik hastaların tanı ve takibinde HbA1c ile bu ölçüm esnasında bakılan HbA0, HbF, HbA1 subfraksiyonlarını birlikte değerlendirmek ve hastaların total hemoglobinin düzeylerini göz önünde tutarak HbA1c analizinin klinik yararlılığı tartışmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Hastanesine Mart-Haziran 2019 tarihleri arasında diyabet şüphesiyle başvuran hastaların Pamukkale Üniversitesi hastanesi Biyokimya Laboratuvarına ait laboratuvar bilgi verileri geriye

dönük olarak tarandı. K₂EDTA tüplerinde verdikleri tam kan örneklerinden HbA1c analizi ve tam kan tetkiki yapılmış 338 kişi çalışmaya dahil edildi. Hastaların HbA1c analizi, iyon-değiştirici HPLC yöntemiyle IFCC sertifikalı Tosoh HLC-723G8 otomatik glikohemoglobin cihazında (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japonya) gerçekleştirilmişti. Tam kanda THb düzeyi hematoloji analizöründe (Mindray BC6800 Shenzhen, Çin) kolorimetrik yöntemle ölçülmüştü.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 27.10.2020 tarih ve 20 sayılı etik kurul onayı alındı. Helsinki deklarasyonuna bağlı kalındı.

Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Tosoh G8 HPLC Analiz Cihazı, stabil HbA1c'nin doğrudan belirlenmesini sağlar. Tosoh G8, HbA1c'nin stabil kısmını numune bulunan toplam hemoglobinin miktarının yüzdesi olarak hızlı ve doğru bir şekilde ölçmek için gözeneksiz bir kolon ve mikrobilgisayar teknolojisi kullanır. Analizör, tam kan örneğini hemoliz ve yıkama solüsyonu ile seyreltir ve daha sonra işlemden geçirilmiş numuneyi TSKgel Glyco HSi varyant kolonu üzerine enjekte eder. Ayırma (seperasyon) işlemi, elüsyonunda kolon reçine yüzeyi üzerindeki katyon değişim grubu ile hemoglobinin bileşenleri arasındaki iyonik etkileşimlerdeki farklılıklar kullanılarak sağlanır. Hemoglobinin fraksiyonları (A1a, A1b, F, LA1c, SA1c, A0 ve H-V0, H-V1, H-V2) daha sonra spesifik tuz ve pH konsantrasyonlarına sahip Elution Buffers HSi Varyant 1, 2 ve 3 kullanılarak aşamalı bir elüsyon yapılarak kolondan çıkarılır. HbD, HbS ve Hb C pikleri mevcutsa, HbA0 pikini takip eden hemoglobin varyant piklerinde (sırasıyla H-V0, H-V1, H-V2) saptanabilir. Ayrılan hemoglobinin bileşenleri, absorbanstaki değişikliklerin 415nm'de ölçüldüğü LED fotometre akış hücresinden geçer. G8 yazılımı ham verileri entegre eder ve azaltır ve ardından her bir

hemoglobin fraksiyonunun bağıl yüzdeleri hesaplar. Bu, her pik fraksiyonu için tutulma süresine (retention time) karşı absorbanstaki değişiklikleri temsil eder. Bir analiz sadece 1.6 dakika sürer¹⁸. Bu çalışmada yapılan bazı Hb kromatografisi örnekleri Şekil 1'de gösterilmektedir.

İstatiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versiyon 22, Chicago, IL, ABD) paket programıyla analiz edildi. Hastalar HbA1c düzeyine göre normal, prediyabet ve diyabet olarak ve THb düzeylerine göre (Mindray BC6800 hematoloji analizörü referans aralık tanımlaması dikkate alınarak) 11-16 g/dL arasında normal; <11 g/dL anemik, >16 g/dL hiperhemoglobinemik olarak üç gruba ayrıldıktan sonra değerlendirilip, sonuçlar bu alt gruplar arasında karşılaştırmalar şeklinde verildi. Sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile incelendi. Korelasyon analizinde r (korelasyon kat sayısı) değeri 0.000-0.49 aralığı zayıf ilişki, 0.50-0.69 aralığı orta ilişki, ≥ 0.70 olanlar güçlü ilişki olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

Çalışmaya katılan 338 kişini hemoglobin ortalama konsantrasyonu 13.4 ± 1.8 (min: 8, maks: 17.2) g/dL, HbA1c ortalaması 7.2 ± 1.68 (min:4 maks:16) idi. Hb kromatografisindeki sonuçlar ortanca, 1. ve 3. çeyreklikler olarak verildiğinde ise; HbA0 için %90.7 (89.1-91.6), HbA1a için %0.5 (0.5-0.6), HbA1b için %0.7 (0.6-0.9), HbF %0.6 (0.5-0.8), LHbA1c %2.2 (2-2.5),

SHbA1c %6.7 (6.1-7.7) idi. Hastaların SHbA1c düzeyine göre gruplandırıldığındaki THb düzeyleri ve kromatografi analiz sonuçları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Gruplar arasında Hb subfraksiyonları karşılaştırıldığında normal grupta prediyabet gruba göre HbA1a ($p=0.0001$), HbA1b ($p=0.004$), LHbA1c ($p=0.0001$) için istatistiksel olarak anlamlı düşük; HbA0 ($p=0.0001$) için anlamlı yüksek fark bulundu. Normal grupta diyabetik gruba göre HbA1a ($p=0.0001$), HbA1b ($p=0.0001$), LHbA1c ($p=0.0001$) ve SHbA1c/THb ($p=0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı düşük; HbA0 ($p=0.0001$) için anlamlı yüksek fark bulundu. Prediyabet ile diyabet grupları karşılaştırıldığında ise prediyabetik grupta diyabetiklere göre HbA1a ($p=0.0001$), HbA1b ($p=0.0001$), LHbA1c ($p=0.0001$) ve SHbA1c/THb ($p=0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı düşük; HbA0 ($p=0.0001$) açısından anlamlı yüksek fark bulundu. Tüm gruplar arasında THb ve HbF açısından anlamlı fark bulunmadı.

Hastaların THb düzeylerine göre gruplara ayrıldıktan sonraki Hb kromatografi sonuçları ise Tablo 2'de gösterilmektedir.

Gruplar arasında Hb subfraksiyonları karşılaştırıldığında anemik grupta normal gruba göre HbA1a ($p=0.002$), LHbA1c ($p=0.002$) ve SHbA1c/THb ($p=0.0001$); hiperhemoglobinemiklere göre HbA1a ($p=0.034$) ve SHbA1c/THb ($p=0.0001$) açısından istatistiksel olarak anlamlı yüksek fark bulundu. Normal ile hiperhemoglobinemik hastalar karşılaştırıldığında ise HbA0 ($p=0.021$) normal grupta; LHbA1c ($p=0.004$) ve SHbA1c ($p=0.014$) hiperhemoglobinemik grupta anlamlı yüksek bulundu. Tüm gruplar arasında HbA1b ve HbF açısından anlamlı fark yoktu.

THb'nin Hb subfraksiyonlarıyla olan ilişkisi Tablo 3'te özetlenmiştir.

THb düzeyi ile diyabet tanısında kullanılan SHbA1c arasında pozitif yönde zayıf korelasyon mevcutken, LHbA1c ve HbA0 ile anlamlı korelasyon yoktu. SHbA1c ile LHbA1c ve HbA0 arasında pozitif yönde güçlü

korelasyon mevcuttu. THb düzeyine göre pozitif yönde zayıf korelasyon mevcuttu ayrılan tüm gruplar arasında anlamlı farkın (Bknz Tablo 3.). olmadığı HbA1b ve HbF ile SHbA1c arasında

Tablo 1. SHbA1c düzeyine göre gruplanan hastaların THb ve Hb subfraksiyon düzeyleri

Grup	SHbA1c	LHbA1c	HbA1a	HbA1b	HbF	HbA0	THb	SHbA1c/ THb
Normal (n=29)	5.4 (5.2-5.5)	1.8 (1.6-1.9)	0.4 (0.4-0.5)	0.6 (0.5-0.7)	0.6 (0.4-0.7)	92.6 (92.3-92.8)	13.1±1.9 (8.5-16.6)	0.42 (0.37-0.44)
Prediyabet (n=108)	6.1 (5.9-6.2)	2 (1.9-2.1)	0.5 (0.4-0.5)	0.7 (0.6-0.8)	0.6 (0.5-0.7)	91.6 (91.3-91.9)	13.4±1.6 (9.4-17.2)	0.45 (0.42-0.49)
Dişabet (n=201)	7.5 (6.9-7.8)	2.4 (2.1-2.7)	0.5 (0.5-0.6)	0.8 (0.6-1)	0.6 (0.5-0.8)	89.6 (88.1-90.6)	13.4±1.8 (8-17.2)	0.57 (0.51-0.66)

**Sonn   lar normal dağılım gösteren parametrelerde ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum, normal dağılım göstermeyen parametrelerde ise ortanca ve 1.- 3. Çeyreklik olarak gösterilmiştir.*

Tablo 2. THb düzeyine göre gruplanan hastaların Hb subfraksiyon düzeyleri

Grup	THb	HbA1a	HbA1b	HbF	LHbA1c	SHbA1c	HbA0	SHbA1c/ THb
Anemi (n=31)	10.1 (9.5-10.6)	0.6 (0.5-0.6)	0.7 (0.6-0.8)	0.6 (0.5-0.9)	2.4 (2.1-2.9)	6.9 (6-7.7)	90.1 (88.7-90.9)	0.71 (0.62-0.83)
Normal (n=286)	13.5 (12.6-14.4)	0.5 (0.5-0.6)	0.7 (0.6-0.9)	0.6 (0.5-0.8)	2.1 (1.9-2.4)	6.7 (6.1-7.6)	90.8 (89.4-91.7)	0.50 (0.44-0.57)
HiperHb (n=21)	16.6±0.4 (16.1-17.2)	0.5 (0.4-0.6)	0.8 (0.7-0.9)	0.6±0.3 (0.3-1.5)	2.7±0.7 (1.7-4.5)	8.2±2.2 (5.3-13.8)	89 (87.4-91.2)	0.49±0.13 (0.32-0.83)

**Sonn   lar normal dağılım gösteren parametrelerde ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum, normal dağılım göstermeyen parametrelerde ise ortanca ve 1.- 3. Çeyreklik olarak gösterilmiştir.*

Tablo 3. THb ile Hb subfraksiyonları arasındaki ilişki

		THb	HbA1a	HbA1b	HbF	LHbA1c	SHbA1c	HbA0
THb	r		-0.221**	0.153**	-0.113*	0.073	0.109*	-0.037
	p		0.0001	0.005	0.039	0.181	0.045	0.499
HbA1a	r			0.176**	0.501**	0.387**	0.404**	-0.538**
	p			0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
HbA1b	r				-0.210**	0.251**	0.286**	-0.308**
	p				0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
HbF	r					0.295**	0.234**	-0.412**
	p					0.0001	0.0001	0.0001
LHbA1c	r						0.783**	-0.847**
	p						0.0001	0.0001
SHbA1c	r							-0.932**
	p							0.0001

**p<0.05 olup anlamlı fark vardır.*

***r korelasyon katsayısını ve kırmızı: ilişki yok, mavi: 0.000-0.49 zayıf ilişki, sarı:0.50-0.69 orta ilişki, yeşil: ≥0.70 güçlü ilişkiyi ifade eder.*

TARTIŞMA

HbA1c klinik biyokimya laboratuvarlarında diyabet tanı ve takibinde kullanılan tanınal testlerden biri olup, HPLC ile analiz edildiğinde HbA1a, HbA1b, HbF, LHbA1c, SHbA1c, HbA0 subfraksiyonları ile birlikte rapor edilir ancak sadece SHbA1c klinisyenlerin değerlendirilmesine sunulur.

Çalışmamızda prediyabet ve diyabet hastalarında LHbA1c normallere göre anlamlı yüksekti ($p=0.0001$) ve LHbA1c ile SHbA1c arasında yüksek korelasyon mevcuttu ($r=0.783$, $p=0.0001$). HbA1c sentezi sırasında oluşan ve erken glikasyon ürünü olan LHbA1c, daha ileri reaksiyon ve düzenlemelerle günler ve/veya haftalar sonra inflamasyon, oksidatif stres, tromboz, vasküler hasar gibi bozukluklara neden olan ileri glikasyon ürünlerine (advanced glycation end products-AGEs) dönüşebilir ve bu ürünler diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarının gelişiminde rol oynar¹⁹. Plazma glukozunun akut değişikliklerinden etkilenen Labil HbA1c'nin ayrı elüe edilmesi, HbA1c'nin son 3 aylık plazma glukozunu doğru yansıtması açısından önemlidir¹⁵. Tosoh G8 cihazında, yüksek LHbA1c'nin (glukozun 1000 mg/dLye kadar olan düzeylerine kadar) SHbA1c'yi interfere etmediği belirtilmiştir¹⁸. Diyabetik retinopatili hastalarda yapılan bir araştırmada, açlık kan şekeri ve HbA1c'nin yanı sıra LHbA1c'nin de hiperglisemik durumu yorumlama ve takipte faydalı olabileceği belirtilmiştir²⁰. Bizim çalışmamız da diyabetik hastalarda SHbA1c ile yüksek korelasyon gösteren ancak THb ile korelasyonu saptanmayan LHbA1c düzeylerinin hastaların hiperglisemi durumlarına daha ayrıntılı bilgi sağlayacağını destekler niteliktedir. Ancak çok yüksek glukoz değerlerinin hem labil hem de stabil HbA1c ölçümünü etkileyebileceği akılda tutulmalıdır. Diyabet ve prediyabetik gruplarda normal gruplara göre daha yüksek bulunan ve SHbA1c ile zayıf da olsa korelasyonları mevcut olan HbA1a ve Hb1b de, SHbA1c'nin yanı sıra DM hastalarının değerlendirilmesinde faydalı olabilir²¹.

Çalışmamızda normal ile anemik gruplar arasında SHbA1c açısından anlamlı fark bulunmadı. Bu durum farklı anemi türlerinin HbA1c'yi farklı yönde etkilemiş olmasından kaynaklı olabilir²². Hiperhemoglobinemik grupta ise LHbA1c ($p=0.004$) ile SHbA1c ($p=0.014$) düzeyleri normallere göre anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca THb düzeyi ile SHbA1c arasında zayıf pozitif yönde korelasyon mevcuttu ($r=0.109$, $p=0.045$). HbA1c'nin tek başına bir analit olmaması ve total hemoglobin miktarlarına göre oluşmasından dolayı hemoglobinin konsantrasyonundaki birey içi ve bireyler arası farklılıklar HbA1c sonuçlarını etkilemiş olabilir. Bu değişimi bertaraf etmek için HbA1c sonuçlarına ek olarak SHbA1c/THb oranı verilebilir. Ancak bu oranı elde etmede HbA1c ve THb için iki ayrı ölçüm yapılması gerekir. Bu da ayrı iki ölçüm belirsizliğinin işin içine girmesine sebep olacaktır. Bu yüzden her iki ölçümü de yapabilen özgülüğü iyi ve klinik olarak doğruluğu yüksek bir analitik cihazın kullanılması ideal olacaktır¹⁰.

THb düzeyine göre ayrılan tüm gruplarda Hb1b açısından anlamlı fark saptanmaması ve Hb1b'nin SHbA1c ile zayıf da olsa korele olmasından dolayı özellikle hiperhemoglobinemiklerde Hb1b'nde değerlendirilmesi, gliseminin yorumlanmasına LHbA1c gibi yardımcı test olabilir. Ayrıca yapılan bir çalışmada Hb1b'nin diyabetik nefropatili hastalarda erken dönemde yükselebileceği de belirtilmiştir²³.

Çalışmamızda hiçbir hastanın kromatografik analizlerinde yüksek HbF ve anormal varyant pikine rastlanmadı. Ancak, asemptomatik HbF veya minör hemoglobinopatisi olan hastalarda yanlış HbA1c sonuçlarının saptanabileceği unutulmamalıdır^{7,24}. Çalışmamızda SHbA1c ile LHbA1c arasında pozitif yönde güçlü korelasyonun olması bize LHbA1c/SHbA1c oranlarına bakılarak, bu oranın HbA1c bandında anormal pikin tespitinde yararı olabileceğini düşündürdü²⁵. Ayrıca HbA1c değerleri klinikle uyumsuz gelen hastalara hematolojik değerleri de göz önünde bulundurularak hemoglobin varyant

analizi yapılabilir ve sonuçlarına göre HbA1c düzeyleri yeniden yorumlanabilir.

Çalışmamızda hastaların plazma glukoz, üremi, lipid ve anemi paneli sonuçlarıyla Hb kromatografi değerlerinin karşılaştırılmaması hastalardaki metabolik durumun daha geniş yorumlanması açısından bir kısıtlılık yaratmıştır. Yine bu hastaların varyant analizleri yapılarak hemoglobinopati açısından da değerlendirilmesi, daha doğru HbA1c sonuçları elde etmek adına uygun bir yaklaşımdır. Ancak bu analizler multidisipliner olarak değerlendirme gerektirmesi ve maliyet etkin olmaması açısından çalışmamızda uygulanamamıştır. Bu bağlamda klinik

bölümlerle işbirliği yapılarak daha çok hastayla daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Özetle; yapılan çalışmalarda HbA1c ölçüm sonuçlarının pek çok faktörden etkilendiği raporlanmıştır. Bu faktörler göz önünde bulundurularak, hastaların SHbA1c ile diğer Hb subfraksiyonlarını ve total hemoglobini birlikte değerlendirmek hastaların glisemi durumlarını yorumlamak açısından daha doğru olacaktır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın veri toplama aşamasında desteği olan Uz. Dr. Fahriğür Dede'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. States U, Health N, Survey NE, et al. Diabetes Mellitus. Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics. 2012; 6th Ed.:1415-1456.
2. Harvey R. F. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry 5th Edition.; 2011.
3. Schnek AG, Schroeder WA. The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. JAm Chem Soc 1961;83:1472-8.
4. Gurdöl F. Tıbbi biyokimya. Nobel Kitabevleri. 2015:107-108.
5. Dorsey JL, Becker MH, Al. E. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. Diabetes Care. 2018;41(1):55-64.
6. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. Clin Chim Acta. 2013;418:63-71.
7. Piehler AP, Grimholt RM, Bjerner J, Buchmann MS. Interference of common haemoglobin variants with the Tosoh G7 standard mode HbA1c method. Scand J Clin Lab Invest. 2015;75(5):362-366.
8. Welsh KJ, Kirkman MS, Sacks DB. Role of glycated proteins in the diagnosis and management of diabetes: Research gaps and future directions. Diabetes Care. 2016;39(8):1299-1306.
9. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2011;34:61-99.
10. Weykamp C, John WG, Mosca A. A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A1c. J Diabetes Sci Technol. 2009;3(3):439-445.
11. Flückiger R, Mortensen HB. Glycated Haemoglobins. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1988;429:279-292.
12. Prome D, Blouquit Y, Ponthus C, Prome JC, Rosa J. Structure of the human adult hemoglobin minor fraction A(1b) by electrospray and secondary ion mass spectrometry: Pyruvic acid as amino-terminal blocking group. J Biol Chem. 1991;266(20):13050-13054.
13. Singh K, Mahajan B, Singh S, Mahdi AA. Labile hemoglobin A1c: a factor affecting the estimation of glycated hemoglobin. J Clin Exp Investig. 2018;8(4):124-126.
14. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem. 2002;48(3):436-472.
15. Cox T, Hess PP, Thompson GD, Levinson SS. Interference with glycated hemoglobin by hemoglobin F may be greater than is generally assumed. Am J Clin Pathol. 1993;99(2):137-141.
16. Weykamp C. HbA1c: A review of analytical and clinical aspects. Ann Lab Med. 2013;33(6):393-400.
17. Randie R. Little, Curt L. Rohlfing, Steven E. Hanson, Robert L. Schmidt C-NL, Richard W. Madsen and WLR. The effect of increased fetal hemoglobin on seven common HbA1c Assay methods. Clin Chem. 2012;58(5):945-947.
18. Little R. Laboratory Procedure Manual Analyte: Glycohemoglobin in Whole Blood. Univ Minnesota Columbia Columbia, Missouri. NHANES 2011-2012.
19. Advanced Glycation End Products: Building on the Concept of the "Common Soil" in Metabolic Disease. HH Ruiz, R Ramasamy, AM Schmidt. Endocrinology. 2020;161(1):bqz006.
20. Göktaş A, Karakükçü Ç, Ataş M, Demlrcan S. Labil Hemoglobin A1c ve Tip II Diyabetik Retinopati Arasındaki İlişki. Retina-Vitreus. 2012;20(2):124-128.

21. The clinical value of the different component of glycosylated hemoglobins. J Yuzhang, JI Sujing, YIN Xande, LU Weihua - Laboratory Medicine, 2008; 04.
22. Sakamoto N, Hu H, Nanri A, et al. Associations of anemia and hemoglobin with hemoglobin A1c among non-diabetic workers in Japan. 2020; 11(3): 719-725.
23. Saiedullah M, Hayat S, Kamaluddin SM, Begum S. Association of glycated minor hemoglobin fraction of A 1 with microalbuminuria and glycemic status in diabetic subjects. Diabetes Endocr J. 2012; 40(1): 14-16
24. Yatcoff RW, Tevaarwerk GJM, Clarson CL, Warnock LM. Interference of fetal hemoglobin and labile glycosylated hemoglobin with measurements of glycosylated hemoglobin. Clin Chem. 1983;29(3):543-545.
25. Falsely C, Hemoglobin L. Labile Hemoglobin A 1c Threshold Is Useful in Identifying the Hemoglobin J Variant, Which Concentrations. 2017; (November); 464-465.

The Need for a New Cut-off Value for CA 19-9 in Patients with Type II Diabetes Mellitus

Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda CA 19-9 için Yeni Bir Cut-off Değeri İhtiyacı

Inanc Karakoyun Fatma Demet Arslan

University of Health Sciences, Tepecik Training and Research Hospital, Department of Medical Biochemistry, Izmir, Turkey

Başvuru Tarihi: 04 Ekim 2020

Kabul Tarihi: 30 Aralık 2020

ABSTRACT

Aim: Pancreatic cancer (PC) is a disease with complex and poorly understood etiology. One of the common risk factors of PC is diabetes mellitus (DM). Increased carbohydrate antigen (CA) 19-9 levels can be used as a biomarker in diagnosis of PC. However, CA 19-9 levels have been reported to increase in some benign conditions as well. Increased levels of such PC-associated biomarkers due to benign conditions can lead to unnecessary interventional procedures. The aim of this study was to question the need for a new CA 19-9 cut-off value when diagnosing PC in patients with type II DM.

Material and Methods: This retrospective study evaluated a total of 449 patients. The patients were divided into two groups: the normal glucose regulation (NGR) group (n=292) and type II DM group (n=157). The mean glucose, HbA1c, CA 19-9, insulin, and homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) levels of the groups were compared. The correlation between CA 19-9 and glucose, HbA1c, insulin and HOMA-IR was evaluated.

Results: The type II DM group had significantly higher CA 19-9, glucose, HbA1c, insulin, as well as HOMA-IR levels compared to the NGR group ($P=0.001$ for CA 19-9 and $P<0.001$ in all other pairwise comparisons). There was a positive correlation between CA 19-9 and HbA1c as well as HOMA-IR ($r=0.132$, $P=0.005$; $r=0.109$, $P=0.020$, respectively).

Conclusion: A higher CA 19-9 cut-off value is needed when diagnosing malignant disease of the pancreas in patients with type II DM to prevent unnecessary invasive/noninvasive interventions.

Keywords: CA 19-9; pancreatic cancer; type II diabetes mellitus.

Inanc Karakoyun : 0000-0002-7057-171X
Fatma Demet Arslan : 0000-0003-0766-0303

Yazışma adresi: Inanc Karakoyun, MD
University of Health Sciences, Tepecik Training
and Research Hospital, Department of Medical
Biochemistry, Yenisehir, Izmir, Turkey
e-mail: inanckara70@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Pankreas kanseri (PC), karmaşık ve iyi anlaşılmayan etiyojisi olan bir hastalıktır. PC'nin yaygın risk faktörlerinden biri diabetes mellitus'tur (DM). Artmış karbonhidrat antijeni (CA) 19-9 seviyeleri PC tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, CA 19-9 seviyelerinin bazı benign durumlarda da arttığı bildirilmiştir. Benign durumlar nedeniyle PC ile ilişkili bu tür biyobelirteçlerin artan seviyeleri gereksiz girişimsel prosedürlere yol açabilir. Bu çalışmanın amacı tip II DM'li hastalarda PC tanısı koyarken yeni bir CA 19-9 eşik değerinin gerekliliğini sorgulamaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu retrospektif çalışmada toplam 449 hasta değerlendirildi. Hastalar iki gruba ayrıldı: normal glukoz regülasyonu (NGR) grubu (n = 292) ve tip II DM grubu (n = 157). Grupların ortalama glukoz, HbA1c, CA 19-9, insülin ve insülin direnci için homeostatik model değerlendirmesi (HOMA-IR) düzeyleri karşılaştırıldı. CA 19-9 ile glukoz, HbA1c, insülin ve HOMA-IR arasındaki korelasyon değerlendirildi.

Bulgular: Tip II DM grubu, NGR grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek CA19-9, glukoz, HbA1c, insülin ve de HOMA-IR seviyelerine sahipti (CA 19-9 için $P=0.001$ ve diğer tüm ikili karşılaştırmalarda $P<0.001$). CA 19-9 ile HbA1c ve HOMA-IR arasında pozitif bir korelasyon vardı (sırasıyla $r=0.132$, $P=0.005$; $r=0.109$, $P=0.020$).

Sonuç: Gereksiz invaziv/noninvaziv girişimleri önlemek için tip II DM'li hastalarda pankreasın malign hastalığı tanısını koyarken daha yüksek bir CA 19-9 cut-off değeri gereklidir.

Anahtar Kelimeler: CA 19-9; pankreas kanseri; tip II diabetes mellitus.

INTRODUCTION

Carbohydrate antigen (CA) 19-9 was first identified as a sialylated Lewis blood group antigen in early 1980s through a hybridoma of murine spleen cell and human colorectal cancer cell line that produced monoclonal antibodies (1, 2). Studies have reported increased levels of CA 19-9 in pancreatic and biliary tract tumors (3-5). The CA 19-9 increase has also been seen in other malignant tumors (ovarian, colorectal and hepatocellular carcinomas, and stomach) as well as some benign conditions associated with biliary tree (cholangitis, pancreatitis, and choledocholithiasis), pulmonary diseases, and end-stage renal failure (6-10).

Pancreatic cancer (PC) has one of the highest mortality rates, because majority of the patients are already at an advanced stage when diagnosed, and the disease has no effective medical treatment. The etiology of PC is complex and not well understood, but it has been established that diabetes mellitus (DM) increases the risk of PC incidence (11).

Elevated CA 19-9 level is one of the signs used to diagnose PC, but it should be kept in mind that CA 19-9 levels may also increase as a result of diabetes-related pancreatic

tissue damage. When diagnosing PC, relying on specific cut-off values for CA 19-9, which might have increased due to benign conditions, can lead to unnecessary interventional approaches. Our aim in this study was to question the need for a new CA 19-9 cut-off value when evaluating patients with type II DM for presence of PC.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

This retrospective study included the data of 449 patients that were treated in a tertiary hospital between January 2016 and January 2020. The patients were divided into two groups: normal glucose regulation (NGR) group (n=292) and type II DM group (n=157). In the NGR group, glucose levels were below 100 mg/dL, HbA1c levels were below 5.7%, and the patients were not diagnosed with DM (12). Patients in the type II DM group consisted of individuals who had routine follow-up with the outpatient clinics due to DM. The exclusion criteria of the study were: age <18 years, any missing data (CA 19-9, fasting serum glucose, HbA1c, fasting serum insulin), and presence of malignant disease, as well as acute or chronic pancreatitis.

Laboratory assays

Two types of tubes were used for collecting blood samples from all patients. Gel barrier containing clot-activator tubes (Becton Dickinson and Company (BD) Vacutainer® SST II Advance tube, 5 mL, 13 x 100 mm, NJ, USA) were used for CA 19-9, glucose, and insulin analyses, while tubes with K2EDTA (BD Vacutainer®, 2 mL, 13 x 75 mm, NJ, USA) were used for HbA1c analysis. The serum in SST II tubes was separated by centrifuging the tubes at 1500g for 10 minutes. Chemiluminescence immunoassay method (UniCel DxI 800, Beckman Coulter, USA) was used for detection of CA 19-9 and insulin levels in the serum. Analysis of serum glucose levels was done by an automated procedure (AU5800 autoanalyzer, Beckman Coulter Inc., USA). Boronate affinity high performance liquid chromatography method (Premier Hb9210, Trinity Biotech, USA) was used for detection of HbA1c levels.

The following formula was used for calculating homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR): fasting insulin ($\mu\text{U/mL}$) $\times$ fasting glucose (mg/dL)/405 (13).

Statistical analysis

SPSS version 25 software package (SPSS Inc., Chicago, USA) was used for statistical analyses. Shapiro–Wilk test was used to assess whether the normality of data distribution. Parametric test (independent samples t-test) was utilized to infer statistical differences between the groups for normally distributed data, while nonparametric test (Mann–Whitney U) was used for non-normally distributed data. Gender analysis was done by using the chi-square test. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation or median and interquartile range. Spearman rank correlation coefficient was used for correlation analyses of the non-normally distributed data. Results with $P < 0.05$ were accepted as statistically significant.

Ethical considerations

Local ethics committee approved our study (Resolution Number 2020/5-12, dated April 04, 2020).

RESULTS

Demographic characteristics and analyte levels of NGR and type II DM groups are presented in Table 1. The groups' gender distribution was not significantly different ($P=0.119$). Type II DM group had significantly higher age, CA 19-9, fasting serum glucose, HbA1c, fasting serum insulin, and HOMA-IR compared to NGR group ($P=0.001$ for CA 19-9 and $P<0.001$ for all pairwise comparisons) (Table 1 and Figure 1).

The results of the correlation analyses between CA 19-9 and routine biochemical analytes were presented in table 2. CA 19-9 was positively correlated with HbA1c and HOMA-IR ($r=0.132$, $P=0.005$; $r=0.109$, $P=0.020$, respectively). However, the r values presented above indicates a weak correlation (14).

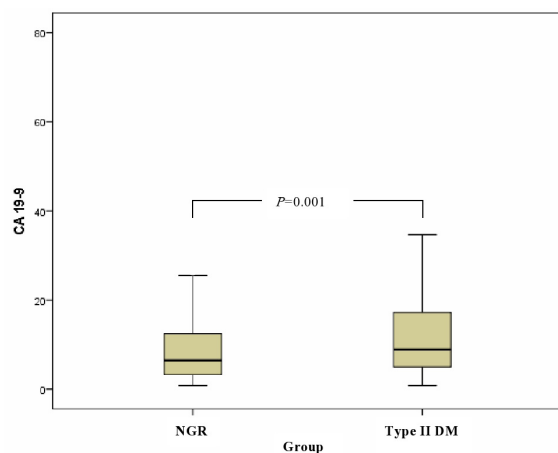


Figure 1. Comparison of CA 19-9 levels between NGR and Type II DM groups.

Abbr: NGR, normal glucose regulation; DM, diabetes mellitus.

Table 1. Demographic characteristics and analytes levels in the NGR and type II DM groups.

Parameter	NGR group (n=292)	Type II DM group (n=157)	P
Age , years mean $\pm$ SD	44.0 $\pm$ 13.5	64.0 $\pm$ 11.2	<0.001
Sex , Female, n (%)	191 (65.4)	91 (58.0)	0.119
CA 19-9 , U/mL median (IQR)	6.5 (3.3-12.5)	8.9 (5.0-17.3)	0.001
Fasting Serum Glucose , mg/dL median (IQR)	87.0 (82.0-92.0)	135.0 (121.0-160.0)	<0.001
HbA1c , % median (IQR)	5.4 (5.2-5.5)	7.1 (6.6-7.9)	<0.001
Fasting Serum Insulin , μ U/mL median (IQR)	6.8 (4.4-9.2)	9.8 (5.8-15.8)	<0.001
HOMA-IR , median (IQR)	1.4 (0.9-2.0)	3.1 (2.0-5.9)	<0.001

P value <0.05 was considered statistically significant; Statistically significant P values shown in bold.

Abbr: NGR, normal glucose regulation; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; DM, diabetes mellitus; SD, standard deviation; IQR, interquartile range (25th–75th percentile).

Table 2. The correlation of CA 19-9 with routine biochemical analytes.

Parameter	CA 19-9	
	r	P
Fasting Serum Glucose	0.092	0.051
HbA1c	0.132	0.005
Fasting Serum Insulin	0.053	0.261
HOMA-IR	0.109	0.020

P value <0.05 was considered statistically significant; Statistically significant P values shown in bold.

Abbr: HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance.

DISCUSSION

The most important finding in our study was that CA 19-9 levels of the type II DM group were significantly higher compared to those of the NGR group. Moreover, CA 19-9 was positively correlated with HbA1c and HOMA-IR.

CA 19-9's sensitivity as PC's diagnostic marker varies between 70-90%, while its specificity ranges from 68% to 91% (15). Various non-malignant disease including thyroid and ovarian disease, as well as obstructive jaundice also lead to elevated CA 19-9 levels. However, close relationship between the endocrine and exocrine functions in the pancreas makes the use of CA 19-9 in patients with DM contentious. Bayramicli et al. reported seeing higher levels of CA 19-9 in patients with type II DM compared to controls and a positive

correlation between CA 19-9 and diabetes irrespective of glucose and HbA1c levels, age, and gender (16). However, their study population was relatively small. In another study, Nakamura et al. reported that patients with poorer glucose control had higher levels of CA 19-9 (17). The caveat of their study was relatively small population size, which included 60 DM patients and 40 controls (17). Larger sample size was analyzed in our study and our finding of higher levels of CA 19-9 in type II DM group was in concordance with the previous studies. However, there are also results in the literature that do not agree with the studies mentioned above. In contrast with the results of our study, Ritts et al. reported that in patients with DM CA 19-9 levels did not exceed 40 U/mL (18).

Although it is not known how diabetes leads to the increased serum CA19-9 levels, there have been some hypotheses. One of the

most notable among these is that increase in CA19-9 is associated with cellular dysfunction. Insulin deficiency in DM can lead to insufficient exocrine functions of the pancreas and stimulate ductal cells to secrete CA19-9. From this point of view, it is stated that the spike in serum CA19-9 is positively correlated with the magnitude of cellular dysfunctions (19). Previous studies that evaluated pancreatic functions in DM showed presence of pancreatic exocrine insufficiency in a significant proportion of patients with DM. Terzin et al. reported seeing insufficient pancreatic exocrine functions in type II DM patients with poor glycemic control (20). In addition, autopsy studies and pancreatic histology studies have shown that patients with DM showed significant changes in the exocrine glands compared to non-diabetic controls (21).

Murai et al. proposed a different mechanism involving elevated levels of CA 19-9 in patients with DM. They stated that in patients with DM, the prolonged CA 19-9 half-life possibly due to decrease in CA19-9's catabolism, may result in elevated tumor marker levels. They also noted that a decrease in catabolism might be due to a surge in the glycation of CA 19-9 and/or glycation of proteins involved in the catabolism of CA 19-9 (22).

The fact that the HbA1c test, which is used to assess long-term glycemic control, is the most common diagnostic and screening tool used for type II DM management and research has led us to include it in our study (23). HbA1c is used to identify treatment goals and predict complications (24). In our study, HbA1c was evaluated as a marker of chronic glucose toxicity and was found to be higher in the type II DM group. According to Benhamou et al., patients that had the highest levels of CA 19-9 were the ones with

the worst metabolic control. In Benhamou's study, the levels of CA 19-9 were significantly higher in patients whose HbA1c >7.5% compared to those with HbA1c <7.5%. Similar to Benhamou et al., we also found that HbA1c levels were positively correlated with CA 19-9 (25).

HOMA-IR evaluation was included in our study to exclude the effects of insulin resistance in the NGR group (26). We found that the median HOMA-IR value was below 2.5 in NGR group.

PC is usually diagnosed based on physical examination, patient history, clinical tests, and imaging techniques (27). Among the clinical tests, CA 19-9 is of particularly important for PC diagnosis. However, it is important to use accurate cut-off values to avoid unnecessary invasive and non-invasive interventions. In our study, we detected higher CA 19-9 values in patients with type II DM, which revealed the necessity to determine new cut-off value for this patient group when diagnosing PC.

There are several limitations of this study. First, similar to other retrospective studies, we cannot completely rule out the impact of selection bias. Second, there was a significant difference between groups in terms of age. However, according to the reference of the manufacturer of chemiluminescence immunoassay method, the reference range of CA19-9, which is between 0-35 U/mL, does not differ based on age.

In conclusion, the present study points out the need to use a higher CA 19-9 cut-off value in differentiating malignant disease of the pancreas in patients with type II DM to prevent unnecessary invasive/noninvasive interventions.

REFERENCES

1. Wu Z, Kuntz AI, Wadleigh RG. CA 19-9 tumor marker: is it reliable? A case report in a patient with pancreatic cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2013; 11(1):50-2.
2. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 1979;5:957-71.
3. Pandiaraja J, Viswanathan S, Antony TB, Thirumuruganand S, Kumaresan DS. The role of CA19-9 in predicting tumour resectability in carcinoma head of pancreas. *J Clin Diagn Res* 2016;10(3):PC06-9.
4. Yamamoto Y, Sugiura T, Todaka A, Okamura Y, Ito T, Ashida R, et al. Surgical indication for advanced intrahepatic cholangiocarcinoma according to the optimal preoperative carbohydrate antigen 19-9 cutoff value. *World J Surg* 2018;42(10):3331-40.
5. Zhuge X, Guo C, Chen Y, Feng L, Jia R, Zhao Y, et al. The levels of tumor markers in pancreatic neuroendocrine carcinoma and their values in differentiation between pancreatic neuroendocrine carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2018;47(10):1290-5.
6. Ong SL, Sachdeva A, Garcea G, Gravante G, Metcalfe MS, Lloyd DM, et al. Elevation of carbohydrate antigen 19.9 in benign hepatobiliary conditions and its correlation with serum bilirubin concentration. *Dig Dis Sci* 2008;53(12):3213-7.
7. Sheen-Chen SM, Sun CK, Liu YW, Eng HL, Ko SF, Kuo CH. Extremely elevated CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci* 2007;52(11):3140-2.
8. Bertino G, Arditi AM, Calvagno GS, Malaguamera G, Interlandi D, Vacante M, et al. Carbohydrate 19.9 antigen serum levels in liver disease. *Biomed Res Int* 2013;2013:531640.
9. Katsanos KH, Kitsanou M, Christodoulou DK, Tsianos EV. High CA 19-9 levels in benign biliary tract diseases. Report of four cases and review of the literature. *Eur J Intern Med* 2002;13(2):132-5.
10. Pavai S, Yap SF. The clinical significance of elevated levels of serum CA 19-9. *Med J Malaysia* 2003;58(5):667-72.
11. Cui YF, Andersen DK. Diabetes and pancreatic cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2012;19: F9-F26.
12. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014;37(Suppl. 1):S81-S90.
13. Kim MK, Ahn CW, Kang S, Nam JS, Kim KR, Park JS. Relationship between the triglyceride glucose index and coronary artery calcification in Korean adults. *Cardiovasc Diabetol* 2017;16(1):108.
14. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* 2018;18(3):91-3.
15. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:266-70.
16. Uygur-Bayramicli O, Dabak R, Orbay E, Dolapcioglu C, Sargin M, Kilicoglu G et al. Type 2 diabetes mellitus and CA 19-9 levels. *World J Gastroenterol* 2007;13:5357-9.
17. Nakamura O, Aoji T, Yoshikawa. Elevated serum CA19-9 levels in poorly controlled diabetic patients. *Japanese Journal of Medicine* 1986;25(3):278-380.
18. Ritts RE, Del Villano BC, Go VL, Herberman RB, Klug TL, Zurawski VR Jr. Initial clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA 19-9 using the NCI serum bank. *Int J Cancer* 1984;33:339-45.
19. Williams JA, Goldfine ID. The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes* 1985;34(10):980-6.
20. Terzin V, Várkonyi T, Szabolcs A, Lengyel C, Takács T, Zsóri G. Prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in type 2 diabetes mellitus with poor glycemic control. *Pancreatol* 2014;14(5):356-60.
21. P. D. Hardt, N. Ewald. Exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus: a complication of diabetic neuropathy or a different type of diabetes? *Experimental Diabetes Research* 2011; 2011:761950.
22. Murai J, Soga S, Saito H, Otsuki M, Kitada T, Saisho Y, et al. Study on the mechanism causing elevation of serum CA19-9 levels in diabetic patients. *Endocr J* 2013;60(7):885-91.
23. Owora AH. Diagnostic Validity and Clinical Utility of HbA1C Tests for Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2018;14(2):196-9.
24. Edelman D, Olsen MK, Dudley TK, Harris AC, Oddone EZ. Utility of Hemoglobin A1c in Predicting Diabetes Risk. *J Gen Intern Med* 2004;19(12):1175-80.
25. Benhamou PY, Vuillez JP, Halimi S, Meffre G, Bachelot I. Influence of metabolic disturbances of diabetes mellitus on serum CA 19-9 tumor marker. *Diabetes Metab* 1991;17:39-43.
26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-19.
27. Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2006; 73(3): 485-92.

TÜRK KLİNİK BİYOKİMYA DERGİSİ

İÇERİK (REGISTRY)

Cilt 18, 2020

İÇİNDEKİLER

Cilt 18, Sayı 1, 2020

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

- ♦ **Proteine Bağlı Olmayan Folat Düzeylerinin Anne Sütünde İncelenmesi**
Evaluation of Unbound Folate Levels in Breast Milk
Fatih Yeşildal, Esin Koç, Taner Özgürtaş 1
- ♦ **25-hidroksivitamin D Düzeylerinin Popülasyona Dayalı Referans Aralıklarının Belirlenmesi**
Determination of the Population Based Reference Ranges for 25-hydroxyvitamin D
Eren Vurgun 8
- ♦ **Reddedilen Numune Oranlarının Altı Sigma Metodu Kullanılarak Değerlendirilmesi**
Evaluation of Rejected Sample Rates Using Six Sigma Method
Şeniz Korkmaz 17
- ♦ **hs Troponin I Ölçüm Belirsizliğinin Klinik Karar Sınırlarında Yorumlama Üzerine Etkisi**
Effect of hs Troponin I Measurement Uncertainty on Interpretation at Clinical Decision Limits
Nergiz Zorbozan 26
- ♦ **Numune Ret Nedenlerinin Pareto Analizi Eşliğinde Altı Sigma Düzeyinin Belirlenmesi**
Determination of Six Sigma Level with Pareto Analysis of Sample Rejection Reasons
Erdem Çokluk, Fatıma Betül Tuncer, M. Ramazan Şekeroğlu, Selin Tunalı Çokluk 33

OLGU SUNUMU / (CASE REPORT)

- ♦ **Serumdaki Jelatinöz Fibrin Kaynaklı Yanlış Yüksek Troponin Düzeyi: İki Olgu**
False High Troponin Level Originated From Gelatinous Fibrin in Serum: Two Cases
Arzu Etem Akağaç 42

DERLEME / (REVIEW ARTICLE)

- ♦ **Koagülasyon testlerinde preanalitik değişkenler**
Preanalytical variables in coagulation testing
Burcu Barutçuoğlu, Güneş Ak 46

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

- ♦ **Comparison of 30 Biochemical Analytes in 3 Different Blood Collection Tubes**
Üç Farklı Kan Alma Tüpünde 30 Biyokimyasal Analitin Karşılaştırılması
Inanc Karakoyun, Fatma Demet Arslan, Selin Onur, Yasemin Kilic Ozturk,
Hulya Parildar, Banu Isbilen Basok61
- ♦ **Mesleğe Göre Adli Toksikolojik Analizlerde Kalite Yönetim Süreci**
Quality Management Process in Forensic Toxicological Analysis according to Occupational
Nazife Doğan, Gökhan Ersoy 70
- ♦ **Osteopontin Levels in Ocular Behçet's disease: A Controlled Study**
Göz Tutulumu Olan Behçet Hastalığında Osteopontin Düzeyleri: Kontrollü Çalışma
Ayça Tuzcu, Serdal Uğurlu, Gülnur Andican, Yılmaz Özyazgan, Hasan Yazıcı 77
- ♦ **pnömatik Tüp Taşıma Sisteminin Hemoliz Üzerine Etkisi: Klinik Olarak Anlamlı mı?**
Effect of Pneumatic Tube Delivery System on Hemolysis: is it Clinically Significant?
Dilara Karacan, Özlem Gürsoy Doruk, Yavuz Doğan, Pınar Tuncel85
- ♦ **Oral Glukoz Tolerans Testi Esnasında Leptin Düzeyleri**
Leptin Levels During Oral Glucose Tolerance Test
Çiğdem Sönmez, Şenay Arıkan, Yüksel Koca, Şemnur Büyükaşık,
Yahya Büyükaşık, Turan Turhan.....92
- ♦ **HbA1c diyabetik hastaların üriner sistem enfeksiyonlarının bir belirteci midir?**
Is HbA1c a marker of urinary tract infections of diabetic patients?
Işıl ÇAKIR 101
- ♦ **Bağımlılarda Laboratuvar Verilerine Dayalı Olarak Madde Kullanım Dağılımının Retrospektif Belirlenmesi**
Retrospective Determination of Substance Use Distribution in Addicts Based on Laboratory Data
Uğur Atik, M. Burak Y. Çimen..... 107

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

♦ **Nitric Oxide and C-Reactive Protein Levels in Ischemic Stroke***İskemik İnmede Nitrik Oksit ve C-Reaktif Protein Düzeyleri*

Sibel Bilgili, Gizem Yalçın, Giray Bozkaya, Nuriye Uzuncan, Arife Erdoğan..... 115

♦ **Renal Transplantasyonda Vasküler Kalsifikasyon Belirteçlerinin Prospektif Değerlendirmesi***A Prospective Evaluation of Vascular Calcification Markers in Renal Transplantation*

Bilge Karatoy Erdem, Vural Taner Yılmaz, Gültekin Süleymanlar, Ayhan Dinckan, Halide Akbas 121

♦ **D Vitamini Yetersizliği Olan Adölesan Kız Çocuklarında Oksidatif Stres ve Eser Element Düzeyleri***Oxidative Stress and Trace Element Levels in Adolescent Girls with Vitamin D Deficiency*

Gürkan ÇIKIM, Metin KILINÇ, Filiz ALKAN BAYLAN 129

♦ **Kalp yetmezliği olmayan yüksek ateşli hastalarda NT-proBNP düzeylerinin yüksekliği***Elevation of NT-pro-BNP levels in high fever patients without heart failure*

Hacer Koç, Özlem Çakır Madenci, Asuman Orçun, Nihal Yücel, Şeymanur Sağlam, Nurdan Papila Topal 136

♦ **Romatoid Artritte Hastalık Aktivitesinin Bir Göstergesi Olarak İskemi Modifiye Albümin***Ischemia-modified albumin as a Predictor of the Disease Activity in Rheumatoid Arthritis*

Ayfer Çolak, Filiz Meryem Sertpoyraz, Anıl Baysol, Elif Merve Girgin, Ali Taylan 144

♦ **KLL vakalarında akım sitometri analizi ile κ ve λ hafif zincir ekspresyonlarının değerlendirilmesi***Evaluation of κ and λ light chain expressions by flow cytometry analysis in cases of CLL*

Çiğdem Özdemir, Filiz Yavaşoğlu, Tülay Köken 150

♦ Diyabetik Hastalarda Hemogloblin Subfraksiyonları ve Total Hemogloblinin Değerlendirilmesi <i>Evaluation of Hemoglobin Subfractions and Total Hemoglobin in Diabetic Patients</i> Kadriye Akpınar, Esin Avcı, Süleyman Demir.....	157
♦ Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda CA 19-9 için Yeni Bir Cut-off Değeri İhtiyacı <i>"The Need for a New Cut-off Value for CA 19-9 in Patients with Type II Diabetes Mellitus"</i> Inanc Karakoyun, Fatma Demet Arslan	165
İÇERİK 2020 (REGISTRY 2020)	171

YAZAR DİZİNİ

A

Ak G, 46
 Akağaç A E, 42
 Akbas H, 121
 Akpınar K, 157
 Andican G, 77
 Arıkan Ş, 92
 Arslan F D, 61
 Arslan F D, 165
 Atik U, 107
 Avcı E, 157

B

Barutçuoğlu B, 42
 Basok Isbilen B, 61
 Baylan Alkan F, 129
 Baysol A, 144
 Bilgili S, 115
 Bozkaya G, 115
 Burak M, 107
 Büyükaşık Ş, 92
 Büyükaşık Y, 92

C - Ç

Çakır I, 101
 Çıkım G, 129
 Çimen Y, 107
 Çokluk E, 33
 Çokluk S T, 33
 Çolak A, 144

D

Demir S, 157
 Dinckan A, 121
 Doğan Nazife, 70
 Doğan Y, 85
 Doruk Gürsoy Ö, 85

E

Erdem Karatoy B, 121
 Erdoğan A, 115
 Ersoy G, 70

G

Girgin E M, 144

K - M

Karacan D, 85
 Karakoyun I, 61
 Karakoyun I, 165
 Kılınç M, 129
 Koca Y, 92
 Koç E, 1
 Koç H, 136
 Korkmaz Ş, 17
 Köken T, 150
 Madenci Çakır Ö, 136

O - Ö - P

Onur S, 61
 Orçun A, 136
 Ozturk Kilic Y, 61
 Özdemir Ç, 150
 Özgürtaş T, 1
 Özyazgan Y, 77
 Parildar H, 61

S - Ş T

Sağlam Ş, 136
 Sertpoyraz F M, 144
 Sönmez Ç, 92
 Süleymanlar G, 121
 Şekeroğlu M R, 33

T

Taylan A, 144
 Topal Papila N, 136
 Tuncel P, 85
 Tuncer F B, 33
 Turhan T, 92
 Tuzcu A, 77

U - Ü - V

Uğurlu S, 77
 Uzuncan N, 115
 Vurgun E, 8

Y

Yalçın G, 115

Yavaşoğlu F, 150

Yazıcı H, 77

Yeşildal F, 1

Yılmaz V T, 121

Yücel N, 136

Z

Zorbozan N, 26

KONU DİZİNİ

Preanalitik evre, 33, 46, 61, 85

Adli toksikolojik analiz, 70

Akım Sitometri, 150

Anne sütü, 1

Bhattacharya yöntemi, 8

C-Reaktif Protein, 115, 136

Fetuin A, 121

İnterferans, 42

İnterlökinler, 77

İskemi modifiye albümin, 144

Kalite, 17, 26

Madde bağımlılığı, 107

Obezite, 92

Osteopontin, 77

Otoimmünite, 77, 144

Referans aralık, 8

Tip 2 diyabetes mellitus, 101, 165

Vitamin D, 8, 129

YAZARLARA BİLGİ

Türk Klinik Biyokimya Dergisi, Türk Klinik Biyokimya Derneği'nin süreli yayın organıdır ve yılda üç sayı olarak yayınlanır. Dergi, klinik biyokimya alanında yapılmış araştırma, derleme yazıları, olgu sunumları ve editöre mektupları yayınlamayı amaçlar.

Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizcedir. Türk Klinik Biyokimya Dergisi International Committee of Medical Journal Editors tarafından yayımlanan "Biyomedikal Dergilere Gönderilen Makalelerde Bulunması Gerekli Standartlara" uymaktadır (<http://www.icmje.org>). Gönderilen makaleler belirtilen standartları karşılamalıdır.

Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazıların başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere gönderilmemiş olması gerekir. Daha önce kongrede tebliğ edilmiş çalışmalar, bu durum belirtilmek koşulu ile kabul edilir. Yayın için gönderilmiş yazılarını, gecikme veya başka bir nedenle dergiden çekmek isteyenlerin bir yazı ile başvurmaları gerekir. Dergiye gönderilen yazılara telif hakkı ödenmez ve yazarlar yazının tüm yayın haklarının Türk Klinik Biyokimya Derneği'ne ait olduğunu kabul eder. Türk Klinik Biyokimya Dergisi makale başvurusu ve değerlendirilmesi için yazarlardan herhangi bir ücret talep etmez.

Yayın Kurulu yayın koşullarına uymayan yazıları yayınlamamak, düzeltmek üzere yazarına geri vermek, biçimce düzenlemek yetkisine sahiptir. Yayınlanmak üzere gönderilen yazılar en az iki danışman tarafından değerlendirildikten sonra yayınlanması uygun görülürse dergide basılır.

ETİK

Makale göndermeden önce, www.ease.org.uk/publications/author-guidelines adresinde farklı dillerde serbest ulaşılabilen *EASE kılavuzları* incelenmelidir. *Türk Klinik Biyokimya Dergisinde basılan makaleler etik kurallar çerçevesinde hazırlanmalıdır. Klinik araştırmalarda çalışma protokolü Helsinki Deklarasyonu kuralına uygun olarak hazırlanmalıdır* (<http://www.wma.net/en/30publications/10policy/es/b3/>). *Bütün çalışmalar için etik komite onayı alınmalıdır.*

Yazım Kuralları

Gönderilen yazıların işleme konulabilmesi için on-line gönderilmesi gerekmektedir. Elektronik posta ile gönderilen yazılar işleme alınmayacaktır. On-line makale gönderimi için www.tkbd.org adresinden dergi başlığına giriş yapılarak talimatlar izlenmelidir.

A. Araştırma yazıları sıra ile şu bölümlerden oluşmalıdır: Başlık sayfası, özet ve anahtar kelimeler, metin, teşekkür, kaynaklar, tablolar (her biri ayrı sayfada), şekiller için açıklamalar. Her bölüm yeni bir sayfada başlamalı ve sayfalar, başlık sayfasından başlayarak ard arda numaralandırılmalıdır.

1. Başlık sayfası: Yazının Türkçe ve İngilizce başlığı (harfler ve boşluklar dahil 90 karakterden fazla olmamak koşulu ile), yazarların soyadı, adı ve bağlı bulundukları kurum ve bölüm, tüm yazarların ORCID bilgisi (<https://orcid.org/> adresinden alınmalıdır) yazışmalardan sorumlu yazarın adı, soyadı ve tam iletişim adresi (iş adresi, telefon, GSM ve e-posta adresi) makalenin diğer sayfalarda da yer alacak olan kısa başlığı (harfler ve boşluklar dahil 40 karakterden fazla olmamak koşulu ile) ve eğer varsa araştırmayı destekleyen kurum ya da kuruluşun adı yer almalıdır. Yazı, kongrelerde sunulmuş ise bu sayfada belirtilmelidir.

2. Özet: Özet, araştırma yazıları için 250 kelimeyi aşmayacak şekilde Türkçe ve İngilizce olarak yazılmalıdır. Özet; Amaç, Gereç ve Yöntem, Bulgular ve Sonuç şeklindeki alt bölümleri içerecek şekilde düzenlenmelidir. Özetle, çalışmanın amacı, temel gereç ve yöntemler (olguların veya laboratuvar hayvanlarının seçimi, gözlemsel veya analitik yöntemler), ana bulgular (özgün veriler ve mümkünse istatistiksel anlamlılık) ve başlıca sonuçlar belirtilmeli; çalışmanın yenilik ve önem taşıyan yönleri vurgulanmalıdır. Özetle herhangi bir kısaltma kullanılmamalıdır. Anahtar kelimeler en az 2 adet olacak şekilde, Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. Kelimeler birbirlerinden noktalı virgül (;) ile ayrılmalıdır. İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)"e uygun olarak verilmelidir (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Türkçe anahtar kelimeler Türkiye Bilim Terimleri (TBT)'ne uygun olarak verilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com>).

3. Metin: Giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma bölümleri ardarda yazılabilir.

Giriş; çalışmanın amacı belirtilmelidir.

Gereç ve Yöntemler; gözlemsel veya deneysel olguların seçim (hastalar veya laboratuvar hayvanları) kriterleri açıklanmalı, yaş, cinsiyet belirtilmelidir. Yöntemler, kullanılan madde ve cihazlar (parentez içinde üretici adı ve adresi, şehir ve ülke adı olarak belirtilerek) ve yapılan işlemler diğer çalışmacıların tekrarlayabilme-

sine olanak sağlayacak şekilde açıklıkla anlatılmalıdır. Kullanılan tüm kimyasallar ve ilaçlar, jenerik isimleri, dozları ve veriliş yolu dahil, tanımlanmalıdır. Klinik ve deneysel çalışmalar için etik kurul görüşleri de bu bölümde belirtilmelidir. İstatistiksel yöntemler, gerektiğinde orijinal verilere ulaşan bir okuyucunun tekrarlayabilmesini sağlayacak şekilde ayrıntılı olarak tanımlanmalıdır. Bir genel bilgisayar programı kullanıldı ise belirtilmelidir.

Bulgular; metinde, grafiklerde ve tablolarda mantıklı bir sıra ile sunulmalıdır. Grafiklerde ve tablolarda yer alan tüm bulgular metinde tekrarlanmamalı, sadece önemli bulgular vurgulanmalı ve özetlenmelidir.

Tartışma; çalışmanın yeni ve önemli yönleri ve çıkarılan sonuçlar vurgulanmalıdır.

4. Teşekkür: Teşekkür bölümü, metnin sonuna eklenmeli ve bir paragrafı geçmemelidir.

5. Kaynaklar: Kaynaklar, metin içinde ilk kez belirtildikleri yere göre sıralanmalıdır. Kaynaklar, Arap rakamları (1, 2, 3,...) ile parantez içinde belirtilmelidir. Dergilerin isimlerinin kısaltılması, Index Medicus'ta belirtildiği şekilde yapılmalıdır. Yurt içinde yayınlanan Türkçe ve İngilizce dergilerin isimleri eğer varsa dergide belirtildiği şekilde kısaltılmalı veya tam olarak yazılmalıdır. Makalede bulunan yazar sayısı 6 veya daha az ise tüm yazarlar belirtilmeli, 7 veya daha fazla ise ilk 6 isim yazılıp "et al" eklenmelidir. Kongre bildirileri, kişisel deneyimler, basılmamış yayınlar, tezler ve internet adresleri kaynak olarak gösterilmemelidir. DOI tek kabul edilebilir on-line referans olmalıdır.

Kaynakların yazımı için örnekler (Noktalama işaretlerine dikkat edilmesi önemlidir):

Makale için: Yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, makale ismi, dergi ismi, yıl, cilt, sayı, sayfa no'su belirtilmelidir.

Örnek: Stephane A. Management of Congenital Cholesteatoma with Otoendoscopic Surgery: Case Report. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(2):803-7.

Kitap için: Yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, bölüm başlığı, editörün(lerin) ismi, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, şehir, yayınevi, yıl ve sayfalar belirtilmelidir.

Örnek: Yabancı dilde yayınlanan kitaplar için; Underwood LE, Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1079-138.

Türkçe kitaplar için; Tür A. Acil Hava Yolu Kontrolü ve Endotrakeal Entübasyon. Şahinoğlu AH, editör. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. 2. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri;2003. p.9-16.

Yazar ve editörün aynı olduğu kitaplar için; Yazar(lar)ın/editörün soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, bölüm başlığı, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, şehir, yayınevi, yıl ve sayfalar belirtilmelidir.

Örnek: Yabancı dilde yayınlanan kitaplar için; Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumors of the exocrine pancreas. Tumors of the Pancreas. 2 nd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1997. p.145-210.

Türkçe kitaplar için; Eken A. Kozmesötikler: Kozmetiklerle İlaçlar Arası Ürünler. Eken A, editör. Kozmesötik Etkin Maddeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2006. p.1-7.

6. Tablolar: Her tablo ayrı bir sayfaya çift aralıklı olarak yazılmalı ve metinde geçtiği sıraya göre Romen rakamları (I, II, III, IV,...) ile işaretlenmeli ve tablo kapsamının kısa tanımı başlık olarak konmalıdır. Açıklamalar başlıkta değil dip notta yer almalıdır. Başka kaynaklardan veri alınmış ise izin alınmalı, kaynak dip not olarak belirtilmelidir. Tablo başlığı Türkçe ve İngilizce olmalıdır.

7. Şekil ve resimler: Şekiller ve resimler konuyla doğrudan ilişkili olmalı ve metinde geçtiği sıraya göre Arap rakamları ile numaralandırılmalıdır. Daha önceden basılmış materyal veya olgu olarak alınan kişileri tanımlayan şekiller kullanılacaksa izin belgesi eklenmelidir. Şekil başlığı Türkçe ve İngilizce olmalıdır.

B. Derleme: Doğrudan veya davetli yazarlar tarafından hazırlanabilir. Toplam sayfa sayısı 15'i aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet (en fazla 100 kelime) yanısıra verilerin saptanması, seçilmesi, ayrılması ve sentez edilmesi için kullanılan yöntemleri tanımlayan bir bölüm yer almalıdır.

C. Olgu sunumu: Toplam sayfa sayısı üçü geçmemeli, Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet (en fazla 100 kelime) giriş, olgu sunumu, tartışma bölümlerini içermelidir.

D. Editöre Mektup: Daha önce yayınlanmış yazılara eleştiri ve katkı sağlamak amacı ile yazıldığından, özet içermemeli, kaynakları sınırlı olmalı, kısa ve öz olarak biçimlendirilmelidir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Journal of Turkish Clinical Biochemistry is the official journal of Turkish Society of Clinical Biochemistry and is published three times a year. The journal welcomes original research articles, reviews, case reports and letters to the editor which are written in the field of clinical biochemistry.

Official languages of the journal are Turkish and English.

Manuscripts that are already have been published or under consideration for publication should not be submitted. If the works has been presented in previous congresses it should be mentioned. In order to withdraw a submitted manuscript the authors must apply with a written requisition. There is no payment for copyright and if the manuscript is accepted to be published by signing the Copyright Transfer Agreement authors agree to transfer all the copyright of the manuscript to the Turkish Society of Clinical Biochemistry. Journal of Turkish Clinical Biochemistry does not levy any charge to the authors at any stage of the publication process.

Manuscripts that are already have been published or under consideration for publication should not be submitted. If the works has been presented in previous congresses it should be mentioned. In order to withdraw a submitted manuscript the authors must apply with a written requisition. There is no payment for copyright and if the manuscript is accepted to be published by signing the Copyright Transfer Agreement authors agree to transfer all the copyright of the manuscript to the Turkish Society of Clinical Biochemistry. Journal of Turkish Clinical Biochemistry does not levy any charge to the authors at any stage of the publication process.

Editorial board may reject or make a change in style or send the manuscript to be revised. Submitted manuscripts are sent to at least two reviewers for evaluation. Depending on reviewers' comments manuscripts are accepted to be published.

ETHICS

Before submission, the EASE Guidelines for Authors and Translators, freely available in many languages at "www.ease.org.uk/publications/author-guidelines" must be followed. Articles published in the Turkish Journal of Clinical Biochemistry should be prepared according to ethical rules. The protocols of clinical studies must be in accordance with the principles of "Helsinki Declaration" (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). For all the studies ethical committee approval should be taken.

MANUSCRIPT PREPARATION

All manuscripts should be submitted online at Turkish Society of Clinical Biochemistry web page (www.tkbd.org). No other form of submission is accepted.

A. Research articles: Must include title page, abstract, key words, main text, acknowledgement, references, tables and figures. Pages should be numbered starting with the title page.

1. Title Page: It should include the following information:

- full title of submission (both in Turkish and English), which should include only generic, not trade, names when describing a test, assay, etc.;
- running head of fewer than 65 characters (including spaces)
- list of all authors (first name, middle name and last name, in that order);
- names of each author's institution, an indication of each author's affiliation and ORCID number of each author (<https://orcid.org/>);
- name, address, telephone and e-mail address of the corresponding author;
- keywords (both in Turkish and English);
- any previous presentation of the manuscript;
- list of abbreviations, in order cited; and
- Research funding, financial support, or other disclosure/conflict of interest information

2. Abstract: Structured abstracts both in Turkish and English should be formatted to include separate headings of: Aim, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Structured abstracts are subject to a limit of 250 words. The purpose of the study, materials and methods (design of the study, subjects/patients, analytical methods), main findings (statistical methods, if possible), and significance of the findings should be given. New and important observations or aspects of the study should be emphasized. No abbreviations should be used in this section.

Minimum 2 maximum 6 keywords should be provided both in Turkish and English. Keywords must be separated by a semi colon (;). For English keywords authors have to use terms from the Medical Subjects Headings list from Index Medicus <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>. For Turkish keywords, authors have to use terms from Türkiye Bilim Terimleri www.bilimterimleri.com

3. Main text: The body of the paper should include; Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion.

Introduction; The nature and purpose of the work must be stated clearly.

Materials and Methods; Clinical (patients/subjects), technical or experimental (animals etc.) procedures and sampling should be concisely explained. Age, gender and inclusion criteria should be included. For method descriptions full corporate names of manufacturers of materials should be utilized.

Ethical approval of the study should be mentioned here. Description of the statistical methods must enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results.

Results; Findings should be presented in a certain flow in the main text, tables and figures. Repeat of table/figure data should be avoided in the text.

Discussion; New and important observations or aspects of the study should be emphasized.

4. Acknowledgement: Acknowledgments are limited to one separate paragraph heading labeled "Acknowledgments" and should follow the main text of the manuscript.

5. References: Citations in the text should be identified by numbers in parenthesis with Arabic numerals (1,2,3...). The list of the references at the end of the paper should be given according to their first appearance in the text, listing all authors and using journal abbreviations as listed in Index Medicus. For articles with equal to or more than seven authors, list the first six authors followed by "et al." For fewer, list all authors.

Citations of abstract books, personal communications, unpublished manuscripts in preparation or under review and web pages should not appear in the reference list. For articles from electronic publications DOI number is accepted.

**All the references should be written according to the below examples:
(Punctuation is important):**

Articles from Journals:

Stephane A. Management of Congenital Cholesteatoma with Otoendoscopic Surgery: Case Report. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010; 30(2):803-7.

Books:

Underwood LE, Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1079-138.

Tür A. Acil Hava Yolu Kontrolü ve Endotrakeal Entübasyon. Şahinoğlu AH, editör. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. 2. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri;2003. p.9-16.

Books which the author and editor is the same person:

Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumors of the exocrine pancreas. Tumors of the Pancreas. 2 nd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1997. p.145-210.

Eken A. Kozmesötikler: Kozmetiklerle İlaçlar Arası Ürünler. Eken A, editör. Kozmesötik Etken Maddeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2006. p.1-7.

6. Tables: Tables should be numbered according to their first appearance in the text with Roman numerals (I, II, III, IV,...). Each table should appear on an individual page. Table headings should uniquely display the data and not repetition of information available either in the text and must be both in Turkish and English. Place explanatory matters (including permissions for use of others' data) in footnotes.

7. Figures and illustrations: They should be those which display the data and not repetition of information available either in the text or as a table. They should be numbered according to their first appearance in the text with Arabic numerals. If there is use of previously published material or cases describing patients, a copy of signed "**Informed consent form**" should be included during the submission. Figure headings should be both in Turkish and English.

B. Reviews: The journal is open to direct reviews from authors and "invited reviews". The total number should not exceed 15 pages. The title and abstract (maximum 100 words) should be both in Turkish and English. Reviews are intended to provide comprehensive coverage of a topic, including background clinical or analytical information, the relevance and importance of the subject matter, and potential future directions.

C. Case reports: The total number should not exceed 3pages. The title and abstract (maximum 100 words) should be both in Turkish and English. They should be structured as introduction, presentation of the case and discussion.

D. Letter to the Editor: Letters are submitted directly from authors in response or contribution to published articles only. It should not include an abstract. It should be concise and should have a limited number of references.

8. The declaration of the conflict of interest should mention at the end of manuscript.

