

eISSN: 2667-8292

Turk Vet J, Vol : 2 (1), 2020



Turk Vet J

---

TURKISH  
VETERINARY  
JOURNAL

---

Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University

### **Aims and Scope**

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), aims to publish articles (original research article, short communication, letters to editor, review article, and case report) on Veterinary basic sciences, clinic or preclinical sciences, zootechnics, animal nutrition, food hygiene and technology both in Turkish or English. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J) is an international, double peer reviewing scientific journal that publishes by Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine. Manuscript will be published should not be published before in elsewhere and should be based on the research (except review articles). Turk Vet J is published three in a year and an open access scientific journal. Special issues may be published by the decision of the journal administration. The journal accepts English or Turkish manuscripts. Turk Vet J doesn't ask fee for the processing the article.

### **Amaç ve Kapsam**

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Türkçe veya İngilizce olarak, temel bilimler, klinik ve klinik öncesi bilimler, zootekni, hayvan besleme ile gıda hijyeni ve teknoloji alanlarında makaleleri (araştırma makalesi, kısa bildiri, editöre mektup, derleme ve vaka takdimi türlerinde) yayımlamayı amaçlar. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi tarafından yayımlanan, uluslararası, çift hakemli bilimsel bir dergidir. Dergiye, ulusal ya da uluslararası ilgi ve uygulama içiren ve yeni bilgiler barındıran makaleler sunulabilir. Yayımlanacak makalelerin, daha önceden yayımlanmamış ve araştırma sonuçlarına dayalı olması gerekmektedir (derleme makaleleri hariç). Turk Vet J açık erişim sağlamak üzere yılda üç defa online olarak yayınlanır. Dergi yönetiminin kararları doğrultusunda özel ya da ek sayılar yayımlanabilir. Turk Vet J Türkçe ve İngilizce yayınları kabul eder. Turk Vet J makale işlem ücreti (değerlendirme ücreti veya basım ücreti) ve makalelere erişim için herhangi bir ücret talep etmez.

### **Owner / Sahibi**

Prof. Dr. Kürşat ALTAY

### **Editors / Editörler**

Prof. Dr. Alparslan COŞKUN (Editor in Chief / Baş Editör)

Dr. Öğ. Üyesi Hakan İŞİDAN (Managing Editor / Sorumlu Yazı İşleri Müdürü)

Dr. Öğ. Üyesi Alper KOÇYİĞİT (Editor / Editör)

### **Editorial Board / Editörler Kurulu**

Dr. Öğr. Üyesi Gökçe ÖZDEMİR

Dr. Öğr. Üyesi Hakan MURAT

Doç. Dr. Mustafa KOÇKAYA

Dr. Öğr. Üyesi Recep KALIN

Dr. Öğr. Üyesi Seyda ŞAHİN

+90 346 219 1812

<http://dergipark.gov.tr/turkvetj>, [turkvetj@cumhuriyet.edu.tr](mailto:turkvetj@cumhuriyet.edu.tr)

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 58140, Sivas; Türkiye

eISSN: 2667-8292

**CONTENTS / İÇİNDEKİLER**  
Turk Vet J 2(1)

**Research Article / Araştırma Makalesi**

---

**Treatment of Tibial Fractures with the Use of Interlocking Nail and Acrylic External Fixator Combination in Dogs** **1-6**

*Köpeklerde Karşılaşılan Tibia Kırıklarının Interlocking Pin ve Akriik Eksternal Fiksator Kombinasyonu ile Sağaltımı*

Ilker SEN

---

**Anticancerogenic Effects of Silymarin on Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma in Wistar Rats** **7-16**

*Wistar Ratlarında Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Hepatoselüler Karsinom Modelinde Silymarinin Antikanserojenik Etkileri*

Emin Karakurt\*, Serpil Dag

---

**Review / Derleme**

---

**Kene Felci (Etiyoloji, Epidemiyoloji, Patofizyoloji, Klinik Tablo, Teşhis, Tedavi ve Korunma)** **17-23**

*Tick Paralysis (Etiology, Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Picture, Diagnosis, Treatment and Prevention)*

Kürşat ALTAY\*, Ömer Faruk ŞAHİN

---

**Açık Yara Tedavilerine Son Yaklaşımlar**

*New Approaches to Open Wound Management*

**24-28**

Duygu SEZER\*, Mustafa AKTAŞ

---

**Benzimidazollerin Antineoplastik Madde Olarak Etkinliği**

**29-35**

*The Effectiveness of Benzimidazoles as Antineoplastic Material*

Mahmut ŞAHİN

---

**Case Report / Vaka Takdimi**

---

**A Case of Lung Adenocarcinoma Determined by Perianesthetic Death in a Cat**

**36-38**

*Bir Kedide Perianestezik Ölüm ile Saptanan Akciğer Adenokarsinomu Olgusu*

Ahmet AYDOGAN\*, Huseyin Topcuoğlu, Mehmet Haligur, Uğur Cayanoglu

---



## Treatment of Tibial Fractures with the Use of Interlocking Nail and Acrylic External Fixator Combination in Dogs

Ilker SEN

Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Sivas, Turkey

SEN I 0000-0001-8288-4871

\*Corresponding Author's E-Mail: ilkersenn@yandex.com

### Abstract

In this study, a combination of interlocking nailing and uniplanar bilateral acrylic external fixators has been used in the treatment of dogs with diaphyseal tibial fractures. Via this method, it is both aimed to prevent possible implant failures due to the potential of high stress accumulation in the distal and proximal parts because of the design of interlocking pins and also is aimed to reduce the risk of functional recovery losses due to instability caused by torsional and bending forces because of weight bearing in the postoperative period. The study material involves 6 dogs. Each case was treated using 6 mm interlocking pins of various lengths and 2-2.5 mm half and full Steinmann pins. Radiographs were taken on the postoperative 10th, 30th, 45th days and clinical follow-up period was ended on 45th day. However, postoperative follow-up period of case no 5 has continued until day 58 due to infection. As an alternative to intramedullary nailing, interlocking pins has resulted in success when combined with external fixators. Interlocking pin and acrylic external fixation combination technique can be considered as an alternative method as it prevents instability that can be caused by using only interlocking nailing, and as it provides a rapid healing.

Received 12 October 2019  
Received in revised form 3 March 2020  
Accepted 18 June 2020

**Anahtar kelimeler:**  
Acrylic external fixator, interlocking nailing, tibia, osteosynthesis

**Cite this article:** Sen I (2020) Treatment of Tibial Fractures with the Use of Interlocking Nail and Acrylic External Fixator Combination in Dogs. Turk Vet J, 2(1):1-6.

### Köpeklerde Karşılaşılan Tibia Kırıklarının Interlocking Pin ve Akrilik Eksternal Fiksator Kombinasyonu ile Sağaltımı

#### Özet

Bu çalışmada, köpeklerde meydana gelen diyafizer tibia kırıklarının sağaltımında interlocking pin ve uniplanar bilateral akrilik eksternal fiksatorlerin kombinasyonu kullanılarak, interlocking pinlerin dizaynından dolayı, pinin distal ve proksimalinde yüksek stres biriktirme potansiyelinden dolayı oluşması muhtemel implant hatalarının önüne geçmek ve postoperatif erken dönemde ilgili ekstremiteye ağırlık verilmesiyle oluşan torsiyonel ve bükülme kuvvetlerinin yol açtığı instabiliteye bağlı olarak fonksiyonel iyileşme kayıplarının oluşma riskini azaltmak amaçlandı. Çalışma materyalini, travma sonrası, ilgili arka ekstremitelerini kullanamama şikayetiyle getirilen, yapılan klinik ve radyolojik muayeneler sonrasında tibiasında kırık tespit edilen 6 köpek oluşturdu. Sağaltım için farklı uzunluklarda 6 mm çapında interlocking pinler, 2 ve 2,5 mm çapında yarım ve tam pin olarak Steinmann pinleri, akrilik ve içine enjekte edilip akriliğe şekil verebilmesi için 9 mm endotracheal tüpler kullanıldı. Postoperatif 10., 30., ve 45. günlerde radyografler alındı, klinik takip süreci 45. günde sona erdirildi. Ancak olgu no 5'in postoperatif takip süresi, gelişen enfeksiyondan dolayı, 58. güne kadar devam etti. İntramedullar pin uygulamalarına alternatif oluşturan interlocking pin ile sağaltım tekniği, eksternal fiksatorlerle kombine edilerek kullanıldığında başarılı sonuçlar vermiştir. Interlocking pin ve akrilik eksternal fiksator kombinasyonu ile sağaltım tekniği, interlocking pin ile sağaltım tekniğinin tek başına kullanılmasından dolayı oluşabilecek instabilitenin önüne geçilmesi ve iyileşmenin hızlı bir şekilde sağlanması açısından alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülebilir.

**Anahtar kelimeler:** Akrilik eksternal fiksator, interlocking çivileme, tibia, osteosentez.

### Introduction

Tibial fractures are frequently observed within dogs. These fractures have a rate of 20% among long bone fracture cases that are noticed in dogs. Approximately 73% of all tibial fractures are in the form of diaphyseal fractures (Van der Elst et al., 1999). Biological osteosynthesis methods are applied quite often in tibial fractures. The aim of biological osteosynthesis, particularly in segmental fractures of long bones, is to maintain mechanical

stability and a balanced preservation of the surrounding soft tissues. External fixator and interlocking nails can also be used in biological osteosynthesis applications (Goett et al., 2007; Piórek et al., 2012).

Interlocking nailing is an internal fixation method which is used especially in diaphyseal fractures of long bones. In this method, pin is placed to the medullary canal and fixed to the bone with screws

passing through proximal and distal holes which are placed on the pin (McLaughlin, 1999; Duhautois, 2003).

Interlocking pin stabilization technique has been used for rectification of angulations which are caused by the fractures of the bone in rotational and longitudinal direction in the treatment of comminuted and long spiral fractures and bone loss. It can be said that, when this technique is compared with conventional nonlocked intramedullary nailing methods, it reduced the risks of infection, non-union and malunion risks. In addition, it is also superior considering short hospitalization and rehabilitation periods (Bhat et al., 2006).

Interlocking pins are in various lengths and diameters. Their both ends have holes which the screws pass through. Ideally, the cortex of the affected bone should support two screws that will be applied both proximally and distally. The distance of the screws and fracture line should be at least 2 cm to prevent excessive force applied on the pin. The weakest feature of interlocking pins are the screw holes (Fossum, 2013).

Although interlocking nailing technique has the same indications as other intramedullary nailing techniques, it has a potential to accumulate high stress in proximal and distal parts due to the design of interlocking pins (Bhat et al., 2006).

Screw holes on the pin reduce the resistance of the pin. If screw holes are placed close to the fracture line, the possibility of fracture of the bone and the implant will emerge. If the screws are applied to the fracture line closer than 2 cm, stress will be observed (Stiffler, 2004).

In this technique which is used in fracture treatment, the pin can be broken if the diameter of the pin is not proper or if the screw holes on the pin are placed on the fracture line. Implant failures are frequently seen in proximal part of the distal pin holes. The most common complications related to the implant are, pin failure close to screw holes, misplacement of the screws or loose pin implementations (McLaughlin, 1999).

Interlocking nails can be implanted via minimal invasive surgical techniques; thus, it minimally damages the vascularization of operative area. In fact, it is reported that interlocking nailing has been considerably successful and has had low complication rates in many clinical studies. Although this technique is highly preferred by many surgeons because of its biological advantages, in some studies it has also been reported that it has both clinical and experimental limitations (Goett et al., 2007; Piórek et al., 2012).

Metal screws which are also used in interlocking nailing have minimal negative effects on the recovery process of fractures. However, it is possible to mention the disadvantages of such implants, such as bone atrophy, inflammatory or carcinogenic effects due to corrosion (Van der Elst et al., 1999; Bergsma et al., 1993; Bos et al., 1991).

In recent years, via in vivo model studies on sheep with tibial fractures where interlocking nails are compared to external fixators, some significant loss during recovery process has been noticed because of instability caused by torsional and bending forces among interlocking nailing groups (Goett et al., 2007; Piórek et al., 2012).

Since weight bearing during early postoperative period allows to increase stability in the fracture line, it brings some beneficial effects on healing. The combination of Interlocking nail and external fixator provides weight bearing (Piórek et al., 2012).

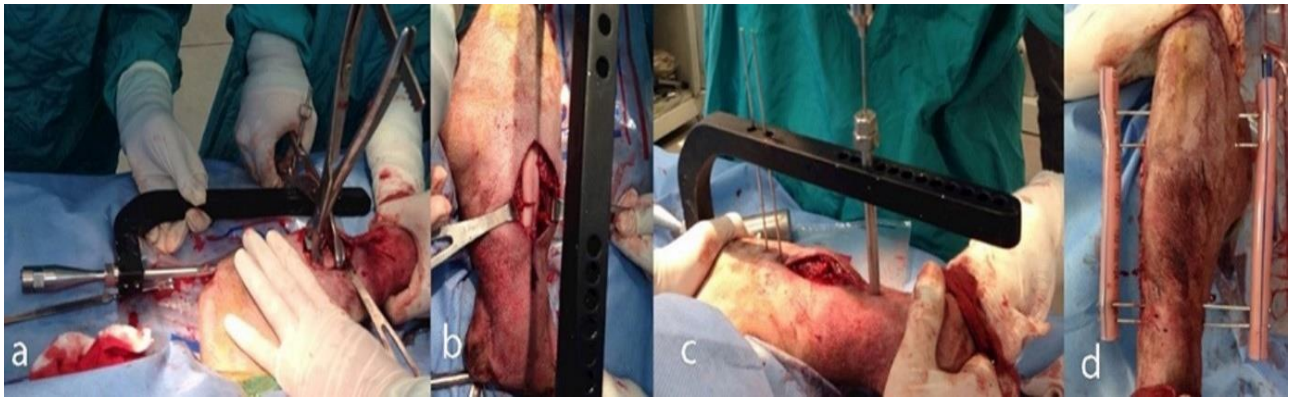
In this study, using a combination of interlocking pins and acrylic external fixators for the treatment of diaphyseal tibial fractures has served two purposes. The first purpose is to reduce complications such as stress fractures around at the level of screw holes in the operated bones. The second purpose is to reduce the risk of functional recovery losses caused by torsional and bending forces because of early weight bearing in postoperative period.

## **Material and Method**

The study material involves 6 dogs which were admitted to the clinic with posttraumatic complaints of inability to use related hind limb with tibial fracture diagnosed via clinical and radiological examinations. While the reason of lesion in the 3 of 6 cases was a traffic accident, the reason could not be defined in the other in 3 cases. After clinical and radiological examinations, diaphyseal tibial fracture has been detected in all cases included in the study. Each case has been treated with 6 mm interlocking nails of various lengths, 2-2.5 mm half and full Steinmann pins, acrylic and 9 mm endotracheal tubes for preserving and shaping the acrylic.

### ***Surgical procedure***

Interlocking nailing has been practiced routinely, but instead of stabilizing the pin to the bone with screws through proximal and distal holes, half and full Steinmann pins were fixed to the bone by passing through the holes. The ends of the pins were then passed through steril 9 mm endotracheal tubes. Soft tissues were routinely closed, and then fluid acrylic was injected into empty endotracheal tubes and was expected to be solidified (Fig 1).



**Figure 1.** a and b. Standardt fixation of interlocking nail to tibia, c. application of Steinmann pin to the proximal and distal screw holes of the interlocking nail, d. combination of full Steinmann pins with acrylic.

### Assessment

In order to define lameness degrees, each patient was scored from 0 to 4 on the 10th, 30th, 45th days of the follow-up period. The scale for the assessment of lameness is given in Table 1. Radiographs were taken on the postoperative 10th, 30th, 45th days and the follow-up period was ended on 45th day. However, postoperative follow-up period of case no 5 has continued until day 58 due to infection.

**Table 1.** Scale for the assessment of lameness.

Score	Assessment
0	No lameness
1	Mild lameness
2	Moderate lameness
3	Severe lameness
4	No weight bearing

### Results

Cases have involved 6 dogs of various ages between 2 and 8. The average age of the cases was calculated to be 3.66. In the study, 4 of the 6 cases were identified as male and 2 as female, 5 as crossbreed and 1 as an Anatolian Sheep Dog (Kangal). 6 × 150 mm interlocking nail was used in 1 case (case no.2), 6 × 160 mm in 2 cases (cases no.1 and 6) and 6 × 170 mm in 3 cases (cases no. 3, 4 and 5). Case descriptions, the diameters, and the lengths of interlocking nails used are given in Table 2.

Postoperative radiographs were taken on 10th, 30th, 45th days, and patients were clinically controlled. On the postoperative 10th day, no weight bearing was observed in case no 1. It was also observed that cases no 3, 4 and 5 had severe lameness, cases no 2 and 6 had mild lameness. On the postoperative 30th day, it was reported that case no 5 had moderate, case no 1 had mild lameness where as cases no 2, 4 and 6 had no lameness.

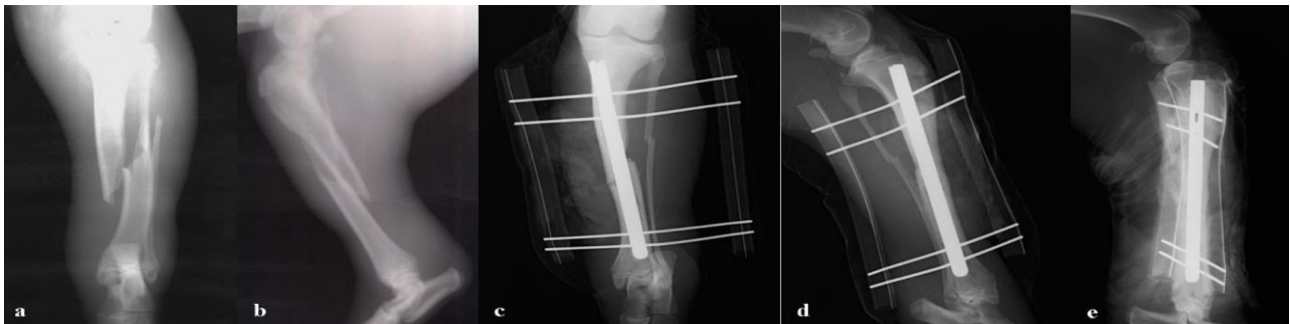
**Table 2.** Age, gender, breed, cause of lesion, diameters and lengths of the pins.

Case no	Age/Year	Gender	Breed	Cause of lesion	Diameters of pins	Lengths of pins
1	2	M	Crossbreed	Unknown	6 mm	160 mm
2	2	M	Crossbreed	Unknown	6 mm	150 mm
3	4	F	Kangal	Traffic accident	6 mm	170 mm
4	2	M	Crossbreed	Traffic accident	6 mm	170 mm
5	8	F	Crossbreed	Unknown	6 mm	170 mm
6	3	M	Crossbreed	Traffic accident	6 mm	160 mm

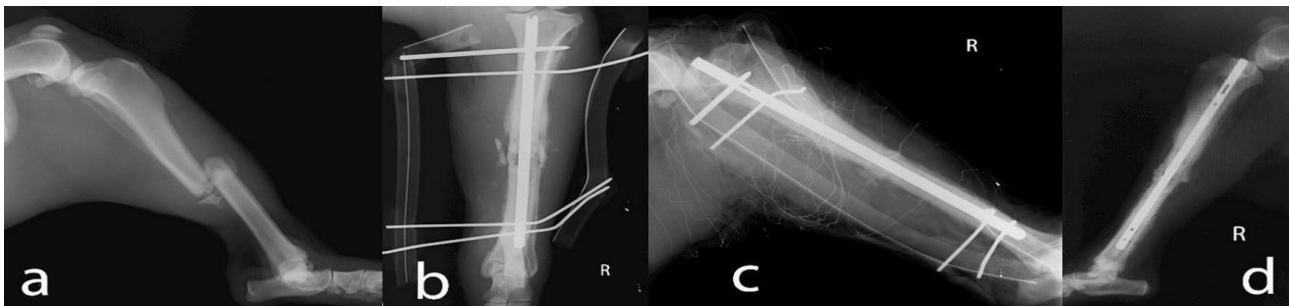
On the postoperative 45th day, no lameness was observed in cases no 1, 2, 4 and 6. However, mild lameness was observed in case no 5 with purulent discharge where the pins of the external fixator have been penetrated to the skin. In radiological examination infection was observed in tibia. After removing the acrylic fixator and the interlocking pin, antibiotic treatment and splint bandahe were practiced for case no 5. On the postoperative 58th day, no evidence of infection was observed in case no 5 and the treatment was finalized. Lameness results of the cases on the postoperative 10th, 30th and 45th days are given in Table 3. (Fig 2,3).

**Table 3.** Lameness assessment scale for the cases on the postoperative 10 th, 30 th and 45 th days.

Case no	10th day	30th day	45th day
1	4	1	0
2	1	0	0
3	3	-	-
4	3	0	0
5	3	2	2
6	1	0	0



**Figure 2.** Preoperative and postoperative radiographs of case no 4. **a** and **b**. preoperative, **c**. and **d**. postoperative 10<sup>th</sup> day, **e**. postoperative 45<sup>th</sup> day radiographs of case 4.



**Figure 3.** Preoperative and postoperative radiographs of case no 5. **a**. Preoperative, **b** and **c**. postoperative 30<sup>th</sup> day, **d**. postoperative 45<sup>th</sup> day radiographs after pins and external fixator removing of case 5.

## Discussion

Early weight bearing in the recovery period utilizes the treatment process. It also contributes to increase stability in the fracture line and this can be achieved by using a combination of an external fixator and interlocking nail. According to the researches carried out, early weight bearing in the recovery period can be achieved by using fixation systems that enable to reduce micro motions in the fracture line (Lu et al., 2009). Micro motions cause instability which is quite difficult to be prevented by fixation techniques such as interlocking nailing. According to a study, using only type I external

fixator, without combining with an interlocking nail, could not prevent instability caused by micro motions in the fracture line (Piórek et al., 2012).

In the study, interlocking nails of 6 mm diameter and of various lengths, Steinmann pins of 2-2.5 mm that were passed through the screw holes on interlocking nails have been used by combining with acrylic to form a external fixator. Via this application, it is expected that micro motions mentioned in literature will be avoided and early weight bearing in the healing process will be observed. Postoperative clinical and radiological examinations of the study



were performed on days 10th, 30th and 45th. In order to carry out the lameness assessment scores between 0 and 4 were given to the cases. In accordance with this, on the postoperative 10th day follow up it was observed that there was no weight bearing in case no 1, while weight bearing was observed in all other cases. On the postoperative 30th day, it was reported that cases no 2, 4 and 6 have weight bearing. In case no 1 mild and in case no 5 moderate lameness was observed. Case no 3 couldn't be followed up on the postoperative 30th day. On the postoperative 45th day, no lameness was recorded in cases no 1, 2, 4 and 6. Moderate lameness due to infection was observed in case no 5. Considering this data, healing was achieved in a short time in cases where weight bearing has been observed. The results of the study are consistent with literature.

Internal fixation of bone fractures by metallic plates and screws is a common and a reliable treatment method. However, these metallic implants need to be removed just after the healing process is completed. Unless implants, such as plate and screws, are removed, some spontaneous bone fractures may occur in the bone tissue just below the implants, even with normal weight bearing. On the other hand, screw loosening and inflammatory reactions due to corrosion can be seen (Bos et al., 1991).

Screw holes which are placed on interlocking pins, also reduce the resistance of the pin. If the screw holes are close to the fracture line, the possibility of bone fractures and implant failures can emerge (Bos et al., 1991). The hole on the proximal part of the distal fragment is where the pin break is mostly observed. During the postoperative period, complications such as pin breaks, misplacement of the screws or loose screw implementations can be observed (McLaughlin, 1999).

The weight bearing ratio between the bone and the interlocking pin increases on the bone as the bone heals. The reason for this is that the callus formation in the fracture zone increases the moment of stability and thus transfers weight from the implant to the bone (Dueland et al., 1996).

In standard interlocking nailing technique, cortical screws are used for fixing the pin to the bone. The pin and screws are not generally removed from related bone after healing. In the study, due to the Steinmann pins was applied to the holes on the pin instead of the screw, there was no necessity to open the hole zone after operation to remove the pins. In addition, as the callus formation increases, the stress on the implant decreases. Therefore, external fixators applied from the holes on the pins were

combined with the interlocking pins instead of the screws used in the standard treatment method. Thus, the stress on the pins was shared with the external fixator. On the other hand, the external fixators were removed after fracture healing and long-term spontaneous bone fractures caused by the screws which used in standard interlocking nailing technique were prevented. There were no complications due to the implant in the postoperative period. In this study, two objectives have been aimed by using interlocking pin and acrylic external fixator combinations for the treatment of diaphyseal tibial fractures: The first objective is to reduce complications due to implant loads. The second objective is to reduce the risk of healing losses due to torsional and bending forces as a result of early weight bearing during the postoperative period.

## Conclusions

Although interlocking nailing is used safely in the treatment of restless and aggressive dogs that need a rigid fixation and where the postoperative care is difficult and crucial, interlocking nailing and external fixator applications can be combined in order to prevent instability due to torsional and bending forces and to reduce the amount of foreign bodies on the bone. This combination can also be used for preventing inflammatory reactions due to the usage of metal screws.

During the postoperative period of external fixator applications, antibiotherapy and caring under hygienic conditions are quite important for reducing the risk of infection.

As a result, interlocking nailing, which is an alternative to intramedullary pin applications, has been successfully used when combined with external fixators. Combination of interlocking nailing and external fixators can be considered as an alternative treatment method as it prevents instability and provides a rapid healing process.

## References

- Bergsma** EJ, Rozema FR, Bos RRM, De Bruijn WC (1993) Foreign Body Reactions to Resorbable Poly(L-Lactide) Bone Plates and Screws Used for the Fixation of Unstable Zygomatic Fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 51:666-670. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(10\)80267-8](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(10)80267-8)
- Bhat** AK, Rao SK, Bhaskaranand K (2006) Mechanical failure in intramedullary interlocking nails. *J Orthop Surg*



14(2):138-41. <https://doi.org/10.1177/230949900601400206>

**Bos RRM, Rozema FR, Boering G, Nijenhuis AJ, Pennings AJ, Verwey AB, Nieuwenhuis P, Jansent HWB (1991)** Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly (Llactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats. *Biomaterials* 12(1):32-36. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(91\)90128-W](https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90128-W)

**Dueland RT, Berglund L, Vanderby R, Chao EYS (1996)** Structural Properties Of Interlocking Nails, Canine Femora, And Femur Interlocking Nail Constructs. *Vet Surg* 25:386-396. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1996.tb01432.x>

**Duhautois B (2003)** Use of Veterinary Interlocking Nails for Diaphyseal Fractures in Dogs and Cats: 121 cases. *Vet Surg* 32(1), 8-20. <https://doi.org/10.1053/jvet.2003.50008>

**Fossum TW (2013)** Fundamentals of Orthopedic Surgery and Fracture Management. In: *Small Animal Surgery, 4th Edn.* Mosby Inc., St. Louis, pp 1082-1083.

**Goett SD, Sinnott MT, Ting D, Basinger RR, Haut RC, Dejardin LM (2007)** Mechanical comparison of an interlocking nail locked with conventional bolts to extended bolts connected with a type Ia external skeletal fixator in a tibial fracture model. *Vet Surg* 36:279-286. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.2007.00265.x>

**Lu Y, Nemke B, Lorang DM, Trip R, Kobayashi H, Markel MD (2009)** Comparison of a new braid fixation system to an interlocking intramedullary nail for tibial osteotomy repair in an ovine model. *Vet Surg* 38: 467-476. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2009.00517.x>

**McLaughlin R (1999)** Internal Fixation: Intramedullary Pins, Cerclage Wires, and Interlocking Nails. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29(5):1097-1116. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(99\)50104-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(99)50104-6)

**Piórek A, Adamiak Z, Jaskólska M, Zhalniarovich Y (2012)** Treatment of comminuted tibial shaft fractures in four dogs with the use of interlocking nail connected with type I external fixator. *Pol J Vet Sci* 15:661-666. <https://doi.org/10.2478/v10181-012-0103-6>

**Stiffler KS (2004)** Internal Fracture Fixation. *Clin Tech Small Anim Pract* 19:105-113. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2004.09.002>

**Van der Elst M, Klein CPAT, De Blicke-Hogervorst JM, Patka P, Haarman HJ.Th.M (1999)** Bone tissue response to biodegradable polymers used for intra medullary fracture fixation: A long-term in vivo study in sheep femora. *Biomaterials* 20:121-128. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00117-3)



## Anticancerogenic Effects of Silymarin on Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma in Wistar Rats

Emin Karakurt\*, Serpil Dağ

Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

Karakurt E 0000-0003-2019-3690 Dağ S 0000-0001-7667-689X

\*Corresponding Author's E-Mail: mehmeteminkarakurt@hotmail.com

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the anticancerogenic effect of Silymarin by immunohistochemical methods on Diethylnitrosamine (DEN) induced Hepatocellular carcinoma (HCC) model in Wistar rats. Fifty male Wistar-Albino rats aging 2 months were randomly divided into 5 equal groups. The Control group rats were given pellet feed and drinking water for 20 weeks. The Sham group rats were injected intraperitoneally Propylene glycol dissolved in %0.9 NaCl three times for 20 weeks. The Silymarin group rats were injected intraperitoneally 100 mg/kg Silymarin three times a week for 20 weeks. The DEN group rats were injected intraperitoneally 50 mg/kg DEN once a week for 20 weeks. The DEN + Silymarin group rats were injected 50 mg/kg DEN once a week for 20 weeks. Silymarin at a dose of 100 mg/kg was injected intraperitoneally for 21 weeks, three times a week, starting 1 week before DEN administration. At the end of 21 weeks, macroscopically multifocal nodular structures were detected in the DEN and DEN + Silymarin group. A mix pattern of trabecular and acinar structures of HCC was observed in DEN and DEN + Silymarin groups. Besides; No statistically significant results were found between DEN and DEN + Silymarin groups in terms of iNOS, Nitrotyrosine, PCNA, GSTPi, MMP-9, HPIP and TUNEL staining ( $P > 0.05$ ). In line with the results of our study, we determined that Silymarin did not show the expected anticarcinogenic effect.

Received 25 December 2019  
Received in revised form 17 March 2020  
Accepted 11 May 2020

### Key words:

Diethylnitrosamine, hepatocellular carcinoma, liver cancer, rats, silymarin

**Cite this article:** Karakurt E, Dağ S (2020) Anticancerogenic Effects of Silymarin on Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma in Wistar Rats. Turk Vet J, 2(1):7-16.

### Wistar Ratlarında Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Hepatoselüler Karsinom Modelinde Silimarinin Antikanserojenik Etkileri

### Özet

Bu çalışmada Wistar ratlarında Dietilnitrozamin (DEN) uygulaması yapılarak oluşturulan hepatoselüler karsinom (HCC) modelinde, Silymarin'in antikanserojenik etkileri immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı. 50 adet 2 aylık Wistar Albino cinsi erkek rat rastgele olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara 20 hafta boyunca pelet yem ve içme suyu verildi. Sham grubundaki hayvanlara % 0.9 NaCl içerisinde çözündürülmüş propilen glikol intraperitoneal yolla haftada 3 kez olmak üzere 20 hafta boyunca verildi. DEN grubundaki hayvanlara 50 mg/kg dozunda haftada 1 kez olmak üzere 20 hafta boyunca DEN uygulaması yapıldı. DEN+Silymarin grubundaki ratlara DEN uygulamasından 1 hafta önce başlayacak şekilde 100 mg/kg dozunda haftada 3 kez olmak üzere 21 hafta boyunca intraperitoneal yolla Silymarin uygulandı. Silymarin grubundaki ratlara 100 mg/kg dozunda 20 hafta boyunca intraperitoneal yolla haftada 3 kez olmak üzere Silymarin uygulandı. 21 hafta sonunda DEN ve DEN+Silymarin gruplarında makroskopik olarak multifokal nodüler yapılar tespit edildi. Mikroskopik incelemeler sonucunda DEN ve DEN+Silymarin gruplarında HCC'nin trabeküler ve asiner paternini içeren miks tipi tespit edildi. iNOS, Nitrotirozin, PCNA, GSTPi, MMP-9, HPIP ve TUNEL boyamaları sonucunda DEN ve DEN+Silymarin grupları arasında istatistiki karşılaştırmada anlamlı sonuç bulunamadı ( $P > 0.05$ ). Çalışmamızın bulguları doğrultusunda Silymarin'in beklenen antikanserojenik etkiyi göstermediğini tespit ettik.

**Anahtar kelimeler:** Dietilnitrozamin, hepatoselüler karsinom, karaciğer kanseri, ratlar, silymarin.

### Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) constitutes 70-85% of the primary malignant tumors of the liver (Shirakami et al. 2012). It is ranked fifth in cancer cases worldwide and ranks third in cancer-related causes of death (Medhat et al. 2017).

Diethylnitrosamine (DEN), an N-Nitroso alkyl component, is used as an initiating agent in two-step (initiation and promotion) hepatocarcinogenic study protocols. Carcinogenic effect of DEN; It is possible to hydroxylate with cytochrome p450 enzymes and convert them to bioactive with the alkylation mechanism (Bingül et al. 2013). The intermediate

products formed after bioactivity (06-ethyl deoxy guanosine and 04- to 06-ethyl deoxy thymidine) exhibit low affinity to the binding sites of various enzymes, thus producing covalent bonds with important compounds of the cells instead of urinary excretion. As a result, they cause mutations, necrosis and cancer (Merhan et al. 2016). The bioactivation process is an important step to initiate carcinogenesis (Bingül et al. 2013). DEN, which becomes bioactive, reacts with the DNA and causes the ethylation of the bases. Ethyl DNA adducts interrupt base pairs, leading to mutations, activation of protooncogenes (eg RAS) and inhibition of tumor suppressor genes (eg p53). This often results in HCC (Matsuda et al. 2005).

*Silybum marianum* is an annual or biennial herbaceous plant belonging to the family Asteraceae (Bosch-Barrera & Menendez 2015). Seeds of *Silybum marianum* include approximately 70-80% Silymarin. The remaining and approximately 20-30% of the part is not chemically defined. Silymarin is a mixture of four flavonolignan isomers called Silybin, Isosilybin, Silydianin and Silycristin. The ratio of isomers; Silybin 60-70%, Silycristin 20%, Silydianin 10% and Isosilybin 5% (Ashraf et al. 2015). The researchers identified ten important characteristics of cancer. These are uncontrolled growth, resistance to death, replicative immortality, induction of angiogenesis, invasion, metastasis, genomic instability, tumor inflammation, escape from immune system and re-programming of energy metabolism. It has been reported in recent studies that Silymarin and Silybin have a healing effect on breast, skin, colon, cervix, ovarian, prostate, lung and liver cancers (Fan et al. 2014; Ben Rahal et al. 2015). Research shows that Silymarin is capable of affecting all of the above-mentioned characteristics in cancers observed in humans (Bosch-Barrera & Menendez 2015). Silymarin and / or Silybin exhibit anticarcinogenic effect by regulating the cell cycle, inducing apoptosis, and different mechanisms such as inhibition of angiogenesis, invasion and metastasis, and inflammation suppression (Eo et al. 2015). In this study, Silymarin's anticancer effect on cell proliferation, metastasis, transformation capacity, oncogenes and apoptosis was evaluated by various immunohistochemical markers in the hepatocellular carcinoma model inducing by DEN.

## **Materials and Methods**

### ***Animals and ethics committee***

Fifty male Wistar-Albino rats aging 2 months were provided by Erzurum Veterinary Control Institute Experimental Animals Unit. The rats were housed

under suitable conditions ( $23 \pm 2$  °C, % 55 humidity rate, 12-hour day-night illuminating cycle) in the Kafkas University Experimental Animals In the Application and Research Center Laboratory. During the trial, the animals were given standart feed and water ad libitum. Prior to the experiment, the rats were prepared for manipulation during a 1 week habituation period. The ethics committee report of the study was taken from Kafkas University Animal Experimentals Local Ethics Committee (KAU-HADYEK-2015-095).

### ***Experimental design***

The rats were randomly divided into 5 equal groups. The Control group rats were given pellet feed and drinking water for 20 weeks. The Sham group rats were injected intraperitoneally Propylene glycol (75/25) dissolved in 0.9% NaCl three times for 20 weeks. The Silymarin group rats were injected intraperitoneally 100 mg/kg Silymarin (Sigma-Aldrich, N 0292) three times a week for 20 weeks. The DEN group rats were injected intraperitoneally 50 mg/kg DEN (Sigma N 0756) once a week for 20 weeks. The DEN + Silymarin group rats were injected 50 mg/kg DEN once a week for 20 weeks. Silymarin at a dose of 100 mg/kg was injected intraperitoneally for 21 weeks, three times a week, starting 1 week before DEN administration.

At the end of the administration, the animals were euthanized by pentobarbital. The livers of all rats with systemic necropsies were examined for macroscopic changes and tissue samples were taken for histopathological-immunohistochemical examinations.

### ***Histopathological, immunohistochemical and TUNEL methods***

Liver tissue samples were fixed in 10 % buffered formaldehyde solution (Merck). After routine procedures, paraffin blocks were prepared and sections with a thickness of 5 µm were taken for Hematoxylin and Eosin (H&E) staining. Sections were examined with H&E in the light microscope (Olympus Bx53) to determine the histopathological changes and photographed with Cell ^P Program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4).

Avidin-Biotin Peroxidase method was used as immunohistochemical stain. For immunohistochemical staining, sections of 4 µm thick from paraffin blocks were rehydrated. In order to prevent endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide

solution for 15 minutes. Then, the microwave method was applied to the sections to reveal the antigenic receptors (Citrat Buffer Solution pH 6 for 25 min). In order to prevent nonspecific staining, the sections were incubated for 30 min with non-immune serum (Genemed Biotechnologies REF 54-0003). Following treatment with Phosphate Buffered Salt Solution (PBS) with different proportions of diluted antibodies (PCNA (Santa Cruz, Sc-56, Dilution Ratio 1: 100), GSTPi (Novocastra, NCL-L-GSTPi-438, Dilution Ratio 1: 100), MMP-9 (Santa Cruz, Sc-393859, Dilution Ratio 1: 100) and HPIP (Bethyl Lab, IHC-00327, Dilution Ratio 1: 100) were incubated for one hour. The sections were washed 3 times in PBS solution for 5 minutes, and the biotinised secondary antibody (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) were applied to them at room temperature for 30 minutes. After washing in PBS (3-5 min), all sections were incubated with peroxidase-bound Strep Avidin (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) for 30 minutes. A solution of 3,3-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) (Genemed Biotechnologies REF 10-0048) were used as colour revealing substrate. The sections were stained with Mayer Hematoxylin and coated with immune mount.

TUNEL method was used to detect apoptotic cells and the In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche 11684817910) was used for this purpose. Sections were kept in the incubator at 37°C overnight and passed through xylene solution. Later sections were rehydrated with a decreasing percentage of alcohol series and washed with distilled water. Subsequently, sections were incubated with proteinase K solution (Sigma) at 37 ° C for 25 minutes. The sections were then washed 3 times with PBS solution for 3 minutes. After washing with PBS, 3% hydrogen peroxide solution was applied to the sections for 15 minutes to block the endogenous peroxidase activity. Sections were washed again with PBS and incubated with TUNEL solution (Roche 11684817910) at 37 ° C for 60 minutes. The tissues were then washed 3 times with PBS for 3 minutes. At follow-up, the sections were incubated with Peroxidase (POD) solution (Roche 11684817910) for 30 min at 37 ° C. Sections were then again washed 3 times with PBS for 3 minutes. After washing, DAB solution (Genemed Biotechnologies) was dropped and stained with Mayer Hematoxylin. The sections were covered with entallen after passing through an increasing percentage of alcohol and xylol solution. The slides prepared after the covering were examined under a light microscope (Olympos Bx53) and

photographed via the Cell<sup>^</sup>P program (Olympos Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4). Analyzes of the images were done with Image J Program (1.51j8). Analysis of immunohistochemical and TUNEL staining results were performed by a grading system based on the number of positive cells in the areas that best reflect the character of staining. For quantification of the staining in the tissue, the analysis was started on the basis of high intensity reaction areas. For each sample, 10 different areas were examined at a total enlargement of 200. The number of cells stained positively in each area was recorded and the average of these 10 sites was taken as the data of that animal.

### ***Statistical analyses***

Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normal distribution of the groups. T-test was used for the evaluation of groups with normal distribution and Mann-Whitney-U test was used for the evaluation of groups that didn't show normal distribution. Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20 Program was used in statistical tests.

## **Results**

### ***Macroscopic results***

No lesions were found in the livers of rats in Control (Figure 1a), Sham (Figure 1b) and Silymarin groups (Figure 1c). Multifocal nodules and hemorrhagic areas were observed in the liver of rats in the DEN group (Figure 1d). In rats in the DEN + Silymarin group (Figure 1e), nodular structures similar to the rats in the DEN group were observed.

### ***Hematoxylin & eosin results***

We observed that liver tissue retained its normal structure in histopathological examination of livers Control (Figure 2a), Sham (Figure 2b) and Silymarin (Figure 2c). HCC was observed in the rats of the DEN group. Trabecular and acinar pattern were dominant in tumor tissue. In some areas only trabecular structures were observed, whereas in some areas only acinar structures were found. There were also areas where these two patterns were observed as mixed (Figure 2d). HCC was also diagnosed in animals administered with DEN Silymarin. Similar to the DEN group, the common histopathological appearance was a mix pattern with trabecular and acinar structures (Figure 2e).

**Table 1.** Average PCNA, GSTPi, MMP-9, HPIP and TUNELpositive cell numbers for all groups

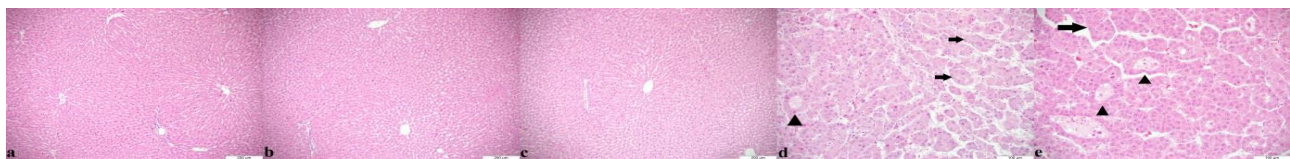
Groups	Group 1 (Control) n = 10	Group 2 (Sham) n = 10	Group 3 (Silymarin) n = 10	Group 4 (DEN) n = 10	Group 5 (DEN + Silymarin) n = 10
PCNA	---	---	---	82.9 ± 6.17 <sup>a</sup>	79.8 ± 6.74 <sup>a</sup>
GSTPi	---	---	---	176,1 ± 7.52 <sup>a</sup>	154.3 ± 11.54 <sup>a</sup>
MMP-9	---	---	---	32.5 ± 4.84 <sup>a</sup>	29.5 ± 3.21 <sup>a</sup>
HPIP	---	---	---	60.5 ± 7.46 <sup>a</sup>	50 ± 5.45 <sup>a</sup>
TUNEL	---	---	---	51.6 ± 5.27 <sup>a</sup>	59.8 ± 6.77 <sup>a</sup>

\* is equal to zero.

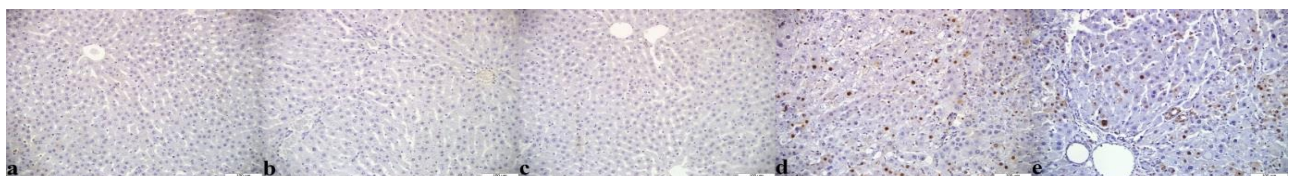
<sup>a</sup>There is no statistically difference between DEN and DEN + Silymarin groups (P > 0.05).



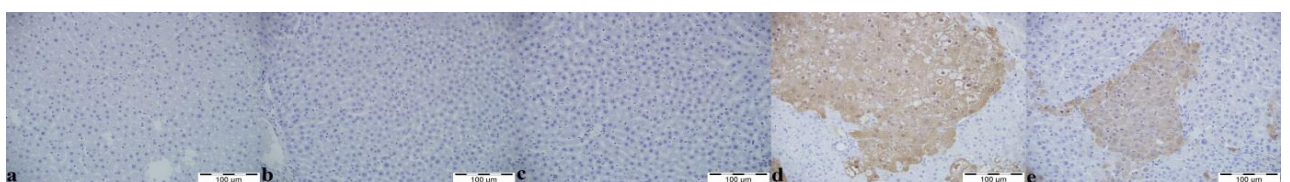
**Figure 1.** Macroscopic appearance of the livers from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, HCC nodule (arrow) and hemorrhage (arrowhead) (d) DEN + Silymarin Group, HCC nodule (arrow) and hemorrhage (arrowhead) (e).



**Figure 2.** Histopathologic appearance of the livers from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, trabecular (arrows) and glandular (arrowhead) structures (d) DEN + Silymarin group, trabecular (arrow) and glandular structures (arrowheads) (e), H&E, scale bar = 100 µm.

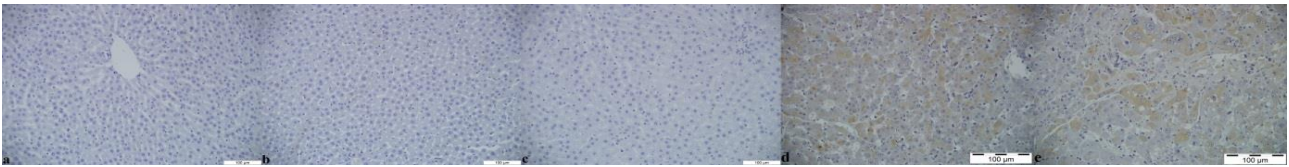


**Figure 3.** The liver sections from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, positive immune reaction in hepatocyte nuclei (d), DEN + Silymarin, positive immune reaction in hepatocyte nuclei (e), PCNA stain, scale bar = 100 µm.

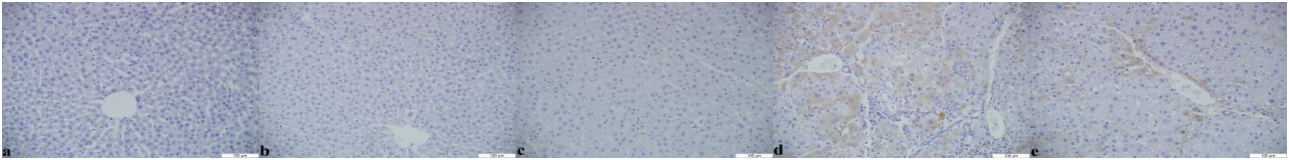


**Figure 4.** The liver sections from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, brown immune positive reaction in transformed area (d), DEN + Silymarin, brown immune positive reaction in transformed area (e), GSTPi stain, scale bar = 100 µm.

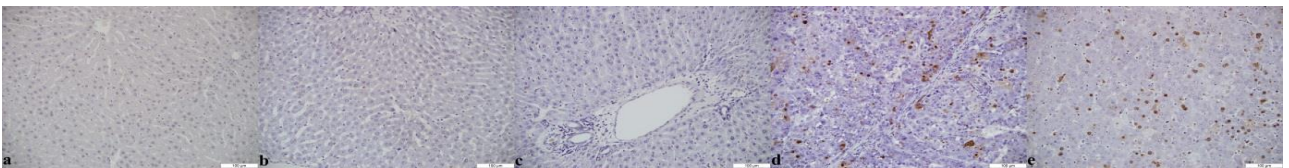




**Figure 5.** The liver sections from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, intracytoplasmic immune reaction (d), DEN + Silymarin, intracytoplasmic immune reaction (e), MMP-9 stain, scale bar = 100  $\mu$ m.



**Figure 6.** The liver sections from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, expression in the cytoplasm of hepatocytes (d), DEN + Silymarin, expression in the cytoplasm of hepatocytes (e), HPIP stain, scale bar = 100  $\mu$ m.



**Figure 7.** The liver sections from control and experimental group of rats. Control Group (a), Sham Group (b), Silymarin Group (c), DEN Group, positive reaction in nuclei of hepatocytes (d), DEN + Silymarin, positive reaction in nuclei of hepatocytes (e), TUNEL stain, scale bar = 100  $\mu$ m.

### ***Immunohistochemical results***

The mean values of PCNA, GSTPi, MMP-9, HPIP and TUNEL positive cell numbers of all groups were given in Table 1. Control (Figure 3a), Sham (Figure 3b) and Silymarin (Figure 3c) groups were not positive for PCNA immune positive reaction. PCNA positive staining was observed in the nuclei of hepatocytes in DEN (Figure 3d) and DEN + Silymarin (Figure 3e) groups.

The mean number of positive stained cells in DEN group compared to DEN + Silymarin group was high but the difference between them was not statistically significant ( $P > 0.05$ ) GSTPi expression was not observed in Control (Figure 4a), Sham (Figure 4b) and Silymarin (Figure 4c) groups, while immunoreactivity was found in DEN (Figure 4d) and DEN + Silymarin (Figure 4e) groups.

In the DEN and DEN + Silymarin groups, the brown GSTPi positive reaction was found particularly in large nodular structures. GSTPi expression was detected in both cytoplasm and nucleus of the hepatocytes forming these nodular structures. In the DEN group, the mean number of positive cells was  $176.1 \pm 7.52$  and in the DEN + Silymarin group this number decreased to  $154.3 \pm 11.54$ . However, we found that this decrease was not statistically significant ( $P > 0.05$ ).

MMP-9 immunoreactivity was not detected in Control (Figure 5a), Sham (Figure 5b) and Silymarin (Figure 5c) groups. MMP-9 immune positive staining in DEN (Figure 5d) and DEN + Silymarin (Figure 5e) groups was determined in the cell cytoplasm. Although there was a decrease in the mean values of MMP-9 positive cells in DEN + Silymarin group compared to DEN group, this decrease was not statistically dramatic ( $P > 0.05$ ).

Control (Figure 6a), Sham (Figure 6b) and Silymarin (Figure 6c) groups were not positive for HPIP expression. HPIP expression was observed in cytoplasm of hepatocytes in DEN (Figure 6d) and DEN + Silymarin (Figure 6e) groups. While the mean value of HPIP positive cells increased in DEN group, it was determined that the administration of Silymarin decreased the number of HPIP positive cells but this decrease was not statistically important ( $P > 0.05$ ).

### ***TUNEL results***

TUNEL positive staining was not observed in groups Control (Figure 7a), Sham (Figure 7b) and Silymarin (Figure 7c). TUNEL reaction in hepatocyte nuclei was determined in DEN (Figure 7d) and DEN + Silymarin (Figure 7e) groups.

Although it was observed that Silymarin administration increased the mean value of TUNEL positive cell compared to DEN group, this increase was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Except for the brown stained nuclei positive cells, both cytoplasmic and nuclear staining cells were observed in DEN and DEN + Silymarin groups. These cells were considered necrotic and not subjected to statistical evaluation.

## Discussion

Detection of cell proliferation rate is particularly important in diseases such as cancer (Srigopalram et al. 2014). PCNA is a 36 kDa nuclear protein that plays an important role in the replication, recombination and repair of genomic DNA (Taha et al. 2010). PCNA is correlated with DNA synthesis and cell proliferation rate (Abdel Salam et al. 2007). Detection of PCNA by immunohistochemical methods indicates both DNA replication and DNA damage resulting in carcinogenesis (Abike & Zengeroğlu 2010). In our study, we aimed to determine the uncontrolled cell proliferation of liver tissue and malignant transformation by evaluating PCNA immunohistochemically.

In the studies of liver cancer [11, 15-17] induced by DEN, it was shown that DEN administration increased PCNA expression compared to control groups. In our study, we found that DEN administration caused a significant increase in the number of PCNA positive cells compared to the control group in a similar way to the literature data (Raghunandhakumar et al. 2013; Song et al. 2013; Srigopalram et al. 2014; Zhao et al. 2014). We observed PCNA expression in the nucleus of hepatocytes. We interpreted this increase in the number of PCNA positive cells to the capacity of DEN administration to mutate and generate DNA damage.

In the studies of experimentally induced HCC (Gopalakrishnan et al. 2013), it was demonstrated that treatment of Silymarin significantly reduced the expression of PCNA and showed antiproliferative effect by immunohistochemically. In this study, contrast to the literature data (Gopalakrishnan et al. 2013), we observed that the treatment of Silymarin resulted in a decrease in PCNA positive cell number. However, there was no statistically dramatic difference between DEN and DEN + Silymarin groups. We interpreted this result as Silymarin showing partial antiproliferative effect.

GSTs are involved in the detoxification of carcinogenic or mutagenic substances. GSTs are

divided into three main groups: ( $\alpha$ ) basic, ( $\pi$ ) acidic, (u) neutral. GSTPi is considered as a potential tumor marker in hepatomas, gastric carcinomas and colonic carcinomas. In addition, GST levels were found to be high in patients with primary HCC and GST measurements were reported to be a usable marker for HCC (Aköz et al. 2010). In our study, we aimed to determine the preneoplastic and dysplastic foci that play an important role in HCC development by evaluating GSTPi expression immunohistochemically.

In liver cancer model studies (Shizuma et al. 2011; Fujise et al. 2012; Thumvijit et al. 2014; Abdo et al. 2015), researchers determined that DEN administration increases GSTPi expression compared to the control group especially in cellular transformation regions. They observed that GSTPi positive areas increased significantly in cancer groups both in terms of cell numbers and area measurements compared to the control group. In our study, we observed that GSTPi immunopositive areas increased significantly both in number and size in the DEN group compared to the control group in accordance with the literature data (Shizuma et al. 2011; Fujise et al. 2012; Thumvijit et al. 2014; Abdo et al. 2015). Although, we observed that GSTPi expressions were more severe in the transformed hepatocyte focuses that formed the nodular structures in particular. We interpreted this increase in expression that DEN administration effectively initiated the process of carcinogenesis in liver tissue.

Imamoto et al. (2014), induced liver cancer by administration DEN for 12 and 18 weeks. In the protective groups treated with Silymarin, they showed that the expression levels of GSTPi decreased compared to the DEN group but this decrease was not statistically significant. In our study, in accordance with the literature data [30], the treatment of Silymarin was found to cause a decrease in GSTPi positive cell number. But this decrease was not statistically important.

MMPs play a critical role in extracellular matrix (ECM) deterioration, metastasis, tumor cell invasion and angiogenesis (Mansour et al. 2014). MMP-2 and MMP-9 are the most detected matrix metalloproteinases in malignant tissues (Ramakrishnan et al. 2009). They play a crucial role in the metastatic process by locally disintegrating the basement membrane and the extracellular matrix (Sivaramakrishnan et al. 2009; Wu et al. 2014). In our study, we evaluated the MMP-9 expression immunohistochemically in order to demonstrate the role it plays in HCC metastasis.



In previous studies, MMP-9 expression was investigated immunohistochemically in the liver (Subramanian et al. 2014) and lung cancer models (Man et al. 2015) In the DEN-induced cancer groups, MMP-9 expression was observed in the cytoplasm of tumor cells. MMP-9 expression was found to be higher in the rats in the DEN group compared to the rats in the control group. In our study, we found that DEN administration significantly increased the expression of MMP-9 compared to the control group in a similar way to the literature data (Subramanian et al. 2014; Man et al. 2015). In addition, we observed MMP-9 expression in the cytoplasm of hepatocytes in particular. We believed that this increase in expression was consistent with the deterioration of ECMs caused by DEN administration. As a result of the destruction of ECMs, the barrier to tumor invasion and migration was removed. The role of matrix metalloproteinases in removing this barrier is very important. This increase in the number of positive cells observed in the DEN group is also important in terms of the role of matrix metalloproteinases, especially MMP-9, in the development of HCC. As a matter of fact, we found a large number of metastatic foci originating from the liver in the lung of a rat in the DEN-administered group.

In the experimentally generated HCC (Ramakrishnan et al. 2009) and Ehrlich ascites carcinoma (Beydogan & Bolkent 2016) model studies, MMP-9 expression was evaluated immunohistochemically in order to reveal the antimetastatic effect of Silymarin and its main component, Silybin. Researchers found that these hepatoprotective agents significantly reduced the expression of MMP-9 compared to cancer groups. Incompatible with literature data (Ramakrishnan et al. 2009; Beydogan & Bolkent 2016), we determined that Silymarin treatment slightly reduced the number of MMP-9 positive cells. Although lung metastasis was seen in a rat in the DEN group, no lung metastasis was found in any rat in the DEN + Silymarin group. According to the data of our study, Silymarin showed an antimetastatic effect even though it was statistically insignificant. We concluded that Silymarin's down-regulation through MMP-9 could play an important role in this protective effect.

HPIP is a recently described oncogene, which is reported to be expressed extremely in cancer types such as non-small cell lung cancer, HCC, spinal glioblastoma, thyroid cancer, gastric cancer, colorectal cancer, breast infiltrative ductal carcinoma, oral carcinoma and melanoma (Chen et

al. 2016; Bugide et al. 2017). In this study, we evaluated the expression of HPIP immunohistochemically so we aimed to determine the role of this oncogene in the development of experimentally induced HCC in rats. Thus, the link between inhibition of HPIP and the suppression of HCC development will also be demonstrated.

Xu et al. (2013a), reported that HPIP was over-expressed in most of 52 liver cancer patients. In another study Xu et al. (2013b) showed that HPIP levels were high in the majority of 328 liver cancer patients. Liver tissues of the control and cancer group were examined immunohistochemically and HPIP expression was significantly increased (> 90%) in liver cancer patients and immunoreactivity was observed especially in the cytoplasm. In the light of this information, HPIP is an oncogene that has an important role in the development and progression of liver cancer. It has been considered by researchers that blocking HPIP may be an effective strategy in the treatment of liver cancer. As a result of the inactivation of HPIP, they have demonstrated that tumor growth in the liver was regressed both in vivo and in vitro in genetically immune system blocked mice. In their study; HPIP was found to promote cell growth in HCC by activation of G2-M transition in the cell cycle. In our study, parallel to literature data (Xu et al. 2013b), we detected HPIP expression especially in the cytoplasm of hepatocytes in the HCC group that we formed by DEN administration.

There is no literature data on the experimental HCC model induced by DEN administration in rats and anticarcinogenic effects of Silymarin by immunohistochemical evaluation of HPIP expression. A significant increase in HPIP expression was observed in the DEN group compared to the control group. This increase was attributed to mutations resulting from DEN bioactivation. As previously reported (Matsuda et al. 2005), mutations resulting from DEN's bioactivation cause activations or inhibitions in important genes such as protooncogenes or tumor suppressor genes. HPIP, which is known to have important functions in cell proliferation, is basically an oncogene (Xu et al. 2013a). We thought that mutations resulting from the bioactivation of DEN could activate HPIP and trigger uncontrolled cell proliferation observed in HCC. In our study, although not statistically significant, we showed that Silymarin treatment caused a partial decrease in HPIP expression. We thought that this decrease may be related to the anti-proliferative capacity of Silymarin.

Apoptosis (programmed cell death) can be triggered by cancer, AIDS, oxidative stress diabetes and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease (Elmore 2007; Coşkun & Özgür 2011; Eröz et al. 2012). We aimed of to determine the apoptotic cells in experimentally induced HCC progression and to demonstrate the proapoptotic capacity of Silymarin by the evaluation of TUNEL method in this study. Thus, it would be demonstrated that the development of HCC can be suppressed by triggering controlled cell death.

It has been demonstrated by several researchers that the number of TUNEL positive cells in experimental liver cancer model group induced by DEN is quite insignificant compared to control group (Xu 2011; Gupta et al. 2013; Vásquez-Garzón et al. 2013; Zhang et al. 2013). Contrary to these studies, there are studies showing significant increase in the number of TUNEL positive cells in DEN-induced liver cancer models compared to control groups (Bharati et al. 2014, Patial et al. 2015). Bharati et al. (2014), reported that the number of TUNEL-positive cells was significantly higher in the liver cancer model induced by DEN compare to control group. They observed that TUNEL positive staining was in the cytoplasm as well as in the nucleus. They identified the cells stained in this way as necrotic cells. In our study, similar to these studies (Bharati et al. 2014, Patial et al. 2015), we found that the number of TUNEL positive cells increased significantly in the DEN group compared to the control group. In addition, TUNEL positive reaction was observed in the cytoplasm as well as the nucleus of hepatocytes in the DEN group. Induction of apoptosis is important in the treatment of cancer (Kaya et al. 2012). It is known that cancer rid of apoptosis mechanism plays a pivotal role in carcinogenesis process (Eröz et al. 2012). Suppression of apoptosis is a driving force in cancer development and progression (Dinçel & Kul 2016). Death receptor CD95 expression, which plays an important role in induction of apoptosis, has been reported to decrease in tumor cells in HCC (Jin & El-Deiry 2005). Therefore, we expected that the number of TUNEL positive cells would be quite low in the DEN group. However, the number of TUNEL positive cells in the DEN group was significantly increased compared to control group. We interpreted this increase as a certain level of programmed cell death in HCC progression.

In previous studies, it has been determined that in the lung cancer (Wu et al. 2016) and prostate cancer (Deep et al. 2008), the TUNEL method has shown that Silymarin treatment increases the number of apoptotic cells compared to cancer groups and has a

proapoptotic effect. Consistent with the literature data (Deep et al. 2008; Wu et al. 2016), we detected that Silymarin treatment increased the number of TUNEL positive cells and showed a mild proapoptotic effect compared to DEN group. However, we thought that the slight triggering of apoptosis caused by Silymarin treatment was not effective enough in the regression of HCC.

## Conclusion

As a result, according to the data of our study, the administration of DEN once a week for 20 weeks was found to be very useful in inducing HCC model in rats. However, we observed that Silimarin, an important anticancerogenic agent, does not have a significant protective effect.

## Acknowledgments

This study was supported by the Research Fund of Kafkas University (Project Number: 2016-TS-08, PhD thesis).

## Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest with respect to the publication of this manuscript.

## References

- Abdel Salam OM, Sleem AA, Omara EA, Hassan NS** (2007) Effect of ribavirin alone or combined with silymarin on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Drug Target Insights* 2:19-27. <https://doi.org/10.1177/117739280700200014>
- Abdo W, Hirata A, Shukry M, Kamal T, Abdel-Sattar E, Mahrous E, Yanai T** (2015) Calligonum comosum extract inhibits diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Oncol Lett* 10:716-722. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3313>
- Abike F, Zengeroğlu S** (2010) Epitelyal over karsinomlarında PCNA ekspresyonu. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2010; 67:173-178.
- Aköz M, Vatansev H, Gürbilek M, Akkuş İ, Vatansev C, Kaptanoğlu B** (2000) Glutatyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin çeşitli kanser vakalarında araştırılması. *Genel Tıp Derg* 10: 1-6.
- Ashraf M, Abid F, Riffat S, Bashir S, Iqbal J, Sarfraz M, Afzal A, Zaheer M** (2015) Rationalized and complementary findings of silymarin (milk thistle) in Pakistani healthy volunteers. *Acta Pol Pharm* 72:607-614.
- Ben Rahal N, Barba FJ, Barth D, Chevalot I** (2015) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil, fatty acids and flavonolignans from milk thistle seeds: Evaluation of

- their antioxidant and cytotoxic activities in Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 83:275-282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.006>
- Beydogan AB, Bolkent S** (2016) The effects of silibin administration for different time periods on mouse liver with Ehrlich ascites carcinoma. *Pharmacol Rep* 68:543-549. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.12.003>
- Bharati S, Rishi P, Koul A** (2014) Azadirachta indica modulates electrical properties and type of cell death in NDEA-induced hepatic tumors. *Cell Biochem Biophys* 70:383-390. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9923-6>
- Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Tekkeşin MS, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M** (2013) Effect of blueberry pretreatment on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 36:529-538. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.05.014>
- Bosch-Barrera J, Menendez JA** (2015) Silibinin and STAT3: A natural way of targeting transcription factors for cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 41:540-546. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.04.008>
- Bugide S, Gonugunta VK, Penugurti V, Malisetty VL, Vadlamudi RK, Manavathi B** (2017) HPIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation. *Cell Oncol* 40:133-144. <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0308-2>
- Chen B, Zhao J, Zhang S, Zhang Y, Huang Z** (2016) HPIP promotes gastric cancer cell proliferation through activation of cap-dependent translation. *Oncol Rep* 36:3664-3672. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5157>
- Coşkun G, Özgür H** (2011) Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 20:145-158.
- Deep G, Raina K, Singh RP, Oberlies NH, Kroll DJ, Agarwal R** (2008) Isosilibinin inhibits advanced human prostate cancer growth in athymic nude mice: comparison with silymarin and silibinin. *Int J Can* 123:2750-2758. <https://doi.org/10.1002/ijc.23879>
- Dinçel GÇ, Kul O** (2016) Patolojik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences* 5:86-108.
- Elmore S** (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eo HJ, Park GH, Song HM, Lee JW, Kim MK, Lee MH, Lee JR, Koo JS, Jeong JB** (2015) Silymarin induces cyclin D1 proteasomal degradation via its phosphorylation of threonine-286 in human colorectal cancer cells. *Int Immunopharmacol* 24:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.11.009>
- Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S** (2012) Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Dergisi* 14:87-101.
- Fan L, Ma Y, Liu Y, Zheng D, Huang G** (2014) Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *Eur J Pharmacol* 743:79-88. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.019>
- Fujise Y, Okano J, Nagahara T, Abe R, Imamoto R, Murawaki Y** (2012) Preventive effect of caffeine and curcumin on hepato-carcinogenesis in diethylnitrosamine-induced rats. *Int J Oncol* 40:1779-1788. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1343>
- Gopalakrishnan R, Sundaram J, Sattu K, Pandi A, Thiruvengadam D** (2013) Dietary supplementation of silymarin is associated with decreased cell proliferation, increased apoptosis, and activation of detoxification system in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 377:163-176. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1582-1>
- Gupta P, Bansal MP, Koul A** (2013) Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicon esculentum* on apoptosis during NDEA induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 434:479-485. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.099>
- Imamoto R, Okano JI, Sawada S, Fujise Y, Abe R, Murawaki Y** (2014) Null anticarcinogenic effect of silymarin on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Ther Med* 7:31-38. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1391>
- Jin Z, El-Deiry WS** (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4:139-163. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1508>
- Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z** (2012) Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi* 3: 26-37.
- Man S, Li J, Fan W, Chai H, Liu Z, Gao W** (2015) Inhibition of pulmonary adenoma in diethylnitrosamine-induced rats by *Rhizoma paridis* saponins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 154:62-67. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.004>
- Mansour MA, Aljoufi MA, Al-Hosaini K, Al-Rikabi AC, Nagi MN** (2014) Possible role of selective, irreversible, proteasome inhibitor (carfilzomib) in the treatment of rat hepatocellular carcinoma. *Chem Biol Interact* 215:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.03.001>
- Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T, Kaneko S** (2005) Interferon- $\gamma$ -mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine. *Lab Invest* 85:655-663. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700257>
- Medhat A, Mansour S, El-Sonbaty S, Kandil E, Mahmoud M** (2017) Evaluation of the antitumor activity of platinum nanoparticles in the treatment of hepatocellular carcinoma induced in rats. *Tumour Biol* 39:1-10. <https://doi.org/10.1177/1010428317717259>
- Merhan O, Özcan A, Atakişi E, Öğün M, Kükürt A** (2016) The Effect of  $\beta$ -carotene on Acute Phase Response in Diethylnitrosamine Given Rabbits. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 22:533-537. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2016.14995>
- Patial V, S M, Sharma S, Pratap K, Singh D, Padwad YS** (2015) Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 40:445-452. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.07.012>
- Ragunandhakumar S, Paramasivam A, Senthilraja S, Naveenkumar C, Asokkumar S, Binuclara J, Jagan S,**

- Anandakumar P, Devaki T (2013) Thymoquinone inhibits cell proliferation through regulation of G1/S phase cell cycle transition in N-nitrosodiethylamine-induced experimental rat hepatocellular carcinoma. *Toxicol Lett* 223:60-72. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.08.018>
- Ramakrishnan** G, Jagan S, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T (2009) Silymarin attenuated mast cell recruitment thereby decreased the expressions of matrix metalloproteinases-2 and 9 in rat liver carcinogenesis. *Invest New Drugs* 27:233-240. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9163-y>
- Shirakami** Y, Gottesman ME, Blaner WS (2012) Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin:retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions immediately after carcinogen administration. *Carcinogenesis* 33:268-274. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr275>
- Shizuma** T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N (2011) Protective effects of fermented rice vinegar sediment (Kurozu moromimatsu) in a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma animal model. *J Clin Biochem Nutr* 49:31-35. <https://doi.org/10.3164/jcfn.10-112>
- Sivaramakrishnan** V, Niranjali Devaraj S (2009) Morin regulates the expression of NF-kappaB-p65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Chem Biol Interact* 180:353-359. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.02.004>
- Song** Y, Jin SJ, Cui LH, Ji XJ, Yang FG (2013) Immunomodulatory effect of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular carcinoma in rats. *Molecules* 18:7179-7193. <https://doi.org/10.3390/molecules18067179>
- Srigopalram** S, Jayraj IA, Kaleeswaran B, Balamurugan K, Ranjithkumar M, Kumar TS, Park JI, Nou IS (2014) Ellagic acid normalizes mitochondrial outer membrane permeabilization and attenuates inflammation-mediated cell proliferation in experimental liver cancer. *Appl Biochem Biotechnol* 173:2254-2266. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1031-y>
- Subramaniyan** J, Krishnan G, Balan R, Mgi D, Ramasamy E, Ramalingam S, Veerabathiran R, Thandavamoorthy P, Mani GK, Thiruvengadam D (2014) Carvacrol modulates instability of xenobiotic metabolizing enzymes and downregulates the expressions of PCNA, MMP-2, and MMP-9 during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Mol Cell Biochem* 395:65-76. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2112-5>
- Taha** MM, Abdul AB, Abdullah R, Ibrahim TA, Abdelwahab SI, Mohan S (2010) Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). *Chem Biol Interact* 186:295-305. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.029>
- Thumvijit** T, Taya S, Punvittayagul C, Peerapornpisal Y, Wongpoomchai R (2014) Cancer chemopreventive effect of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:1611-1616. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.4.1611>
- Vásquez-Garzón** VR, Macias-Pérez JR, Jiménez-García MN, Villegas V, Fattel-Fazenta S, Villa-Treviño S (2013) The chemopreventive capacity of quercetin to induce programmed cell death in hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 41:857-865. <https://doi.org/10.1177/0192623312467522>
- Wu** T, Liu W, Guo W, Zhu X (2016) Silymarin suppressed lung cancer growth in mice via inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Biomed Pharmacother* 81:460-467. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.039>
- Wu** WY, Kim H, Zhang CL, Meng XL, Wu ZS (2014) Loss of suppressors of cytokine signaling 3 promotes aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *J Invest Surg* 27:197-204. <https://doi.org/10.3109/08941939.2013.873098>
- Xu** X, Fan Z, Kang L, Han J, Jiang C, Zheng X, Zhu Z, Jiao H, Lin J, Jiang K, Ding L, Zhang H, Cheng L, Fu H, Song Y, Jiang Y, Liu J, Wang R, Du N, Ye Q (2013a) Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *J Clin Invest* 123:630-645. <https://doi.org/10.1172/JCI64265>
- Xu** X, Jiang C, Wang S, Tai Y, Wang T, Kang L, Fan Z, Li S, Li L, Fu J, Liu J, Ji Q, Wang X, Wei L, Ye Q (2013b) HPIP is upregulated in liver cancer and promotes hepatoma cell proliferation via activation of G2/M transition. *IUBMB Life* 65:873-882. <https://doi.org/10.1002/iub.1202>
- Xu** XM, Deng JJ, Yuan GJ, Yang F, Guo HT, Xiang M, Ge W, Wu YG (2011) 5-Lipoxygenase contributes to the progression of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 4:1195-1200. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.547>
- Zhang** XL, Yu H, Xiong YY, Ma ST, Zhao L, She SF (2013) Resveratrol Down-Regulates Myosin Light Chain Kinase, Induces Apoptosis and Inhibits Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumorigenesis in Rats. *Int J Mol Sci* 14:1940-1951. <https://doi.org/10.3390/ijms14011940>
- Zhao** JA, Peng L, Geng CZ, Liu YP, Wang X, Yang HC, Wang SJ (2014) Preventive effect of hydrazinocurcumin on carcinogenesis of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma in male SD rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:2115-2221. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.5.2115>



## Kene Felci

### (Etiyoloji, Epidemiyoloji, Patofizyoloji, Klinik Tablo, Teşhis, Tedavi ve Korunma)

Kürşat ALTAY\*, Ömer Faruk ŞAHİN

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Ana Bilim Dalı, Sivas, Türkiye

Altay K 0000-0002-5288-1239 Şahin O F 0000-0002-3230-504X

\*Corresponding Author's E-Mail: kaltay@cumhuriyet.edu.tr

#### Özet

Keneler insanı da içine alan geniş bir konakçı spektrumuna sahip, Arachnida sınıfına bağlı kan ile beslenen ektoparazitlerdir. Keneler konakları üzerine direk parazitik etkileye sahip olduğu gibi birçok patojen için vektörlük yapmaktadırlar. Kene tükürük salgısı kenenin biyolojik zincirinin tamamlaması için hayati öneme sahip olmakla birlikte, parazitik etkisinin şekillenmesi ayrıca patojenlerin duyarlı konaklara taşınmasını da sağlar. Bununla birlikte bazı kene türlerinin tükürük salgısında bulunan nörotoksinler konaklarında kene felci adı verilen felç tablosunun oluşumuna yol açmaktadır. Son yıllarda özellikle insan ve köpeklerde kene felci vakalarının arttığı görülmektedir. Bu derlemede konu ile ilgili literatürler ışığında insan ve hayvanlarda kene felcinin etiyolojisi, epidemiyolojisi, patofizyolojisi, gelişen klinik tablo, teşhis, tedavi yaklaşımı ve korunma stratejilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Received 3 December 2019  
Received in revised form 20 January 2020  
Accepted 22 December 2020

#### Anahtar kelimeler:

Kene felci, güncel gelişmeler

**Cite this article:** Altay K, Şahin Ö, F. (2020) Kene Felci (Etiyoloji, Epidemiyoloji, Patofizyoloji, Klinik Tablo, Teşhis, Tedavi ve Korunma). Turk Vet J, 2(1):17-23.

#### Tick Paralysis

(Etiology, Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Picture, Diagnosis, Treatment and Prevention)

#### Abstract

Ticks are blood-fed ectoparasites of the Arachnid class with a broad spectrum of hosts, including humans. Ticks have direct parasitic effects on their hosts and vectors for many pathogens. Although tick salivation is vital to complete of the tick's life cycle, the shaping of its parasitic effect also enables the transport of many pathogens to suitable hosts. However, neurotoxins in the salivary glands of some tick species cause the formation of a paralysis called tick paralysis in their hosts. Recently tick paralysis cases have increased, especially in humans and dogs. The aim of this review is to evaluate the etiology, epidemiology, pathophysiology, clinical picture, diagnosis, treatment approach and prevention strategies of tick paralysis in humans and animals in the light of relevant literature.

**Key words:** Tick paralysis, current developments.

#### Giriş

Keneler yüksek parazitik özellikleri ve vektör kaynaklı hastalıkları bulaştırmadaki rolleriyle insan ve hayvan sağlığını etkileyen önemli eklem bacaklılardır (Sonenshine, 1991; Nicholson, 2009). Kenelerin tükürük salgısı, konakta kan emeceği noktaya tutunmasına, kan emme sürecinin başlamasına/sürdürülmesine, pozisyonunun muhafazasına diğer bir ifade ile kenenin gelişme dönemlerini tamamlamasına ve çiftleşmesine imkan sağlamaktadır (Rodriguez-Valle ve ark., 2010). Tükürük salgısının etkisi kenelerin kan emme süreci ile sınırlı kalmayıp, kene için hayati öneme sahip başka fonksiyonların gerçekleşmesinde de etkilidir.

Örneğin; dehidrasyon tehlikesiyle karşı karşıya kalan bazı kenelerin tükürük bezlerinden nem emici çözümler salgılayabildiği, aynı zamanda, serin proteaz inhibitörleri, proteazlar ve lipokalinler gibi karmaşık bir yapı aracılığıyla konakçı savunmalarının inhibe edilmesine aracılık ettiği bildirilmiştir (Francischetti ve ark., 2009; Rodriguez-Valle ve ark., 2010; Riberio ve ark., 2011). Bununla birlikte kenelerin konakları üzerine olan önemli bir zararlı etkisi de kan emmeleri yani parazit etkilerinin şekillenmesinde hayati öneme sahip tükürük salgılarından kaynaklan kene felcidir (Masina & Broady, 1999; Mans ve ark., 2004). Bu derlemede konu ile ilgili literatürler ışığında insan

ve hayvanlarda kene felcinin etiyojisi, epidemiyolojisi, patofizyolojisi, gelişen klinik tablo, teşhis, tedavi yaklaşımı ve korunma stratejilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### **Etiyoloji**

Keneler, hayvanlar aleminin Artropoda anacı, Chelicerata anaç altı, Arachnida sınıfı, Acari sınıf altı, Metastigmata dizisi, Ixodidae, Argasidae ve Nuttalliellidae ailelerinde yer alırlar. Dünyada bugüne kadar üç ailede 907 (Ixodidae: 720, Argasidae: 186, Nuttalliellidae: 1) kene türü tanımlanmıştır (Barker & Murrel, 2008; Camicas ve ark., 1998; Keirans, 1992; Keirans & Robbins, 1999; Walker ve ark., 2000). Dünya üzerinde tanımlanan kene türünün yaklaşık % 10'unun insan ve hayvanlarda kene felci ile ilişkili olduğu bildirilmiş, bu türlerin büyük çoğunluğunu Ixodidae (sert kene) ailesindeki kenelerin, 9 türü Argasidae (yumuşak kene) ailesindeki kenelerin oluşturduğu ifade edilmiştir (Masina & Broady, 1999; Stone, 1986).

Kene kaynaklı paraliz vakalarında rol oynayan kene türleri ülkelere göre değişmektedir. Kuzey Amerika'da *Dermacentor andersoni* ve *Dermacentor variabilis*, Afrika'da *Ixodes rubicundus*, *Rhipicephalus evertsi evertsi* ve *Argas (Persicargas) walkerae*, Avustralya'da *Ixodes holocyclus* (Avustralya kene felci) ve Avrupa'da *Argas reflexus*, *Ixodes crenulatus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata* türleri kene felci vakalarında yoğun olarak tespit edilen türlerdir (Masina & Broady, 1999; Mans ve ark., 2004; Nowak-Chmura & Siuda, 2012).

Kenelerin kan emme esnasında salgıladıkları tükürük salgılarındaki bazı bileşiklerin konakları için toksik etki gösterdikleri ve sonuçta paralize sebep oldukları ifade edilmektedir. *I. holocyclus* ve *Dermacentor spp.*'de bu toksinlerin özellikle üreme döneminde ergin dişi kenelerin beslenmesi esnasında ortaya çıktığı (Diaz, 2010), ancak bazı kenelerin larva ve nimf dönemlerinde de (*Argas walkerae*) beslenme esnasında salgıladıkları toksinlerinin paralize neden olduğu bildirilmiştir (Masina & Broady, 1999).

Kenelerin tükürük salgılarında kan emdikleri konakları için özellikle nörotoksik etkiye sahip bileşiklerin varlığının belirlendiği çalışmalar olduğu gibi, bunların sinir iletimi üzerine yöneldiğini gösteren deneysel çalışmalar da mevcuttur (Thurn ve ark., 1992; Kaire, 1966). *I. holocyclus*'tan elde edilen saflaştırılmış protein fraksiyonlarında köpeklerde paralize neden olan toksinlerin

bulunduğu ortaya konulmuştur (Kaire, 1966). *I. holocyclus*'un tükürük salgılarının toksik etkisi neonatal fareler üzerine yapılan deneysel çalışmalarla da gösterilmiştir (Stone ve ark., 1983). *I. holocyclus*'un tükürük salgısından izole edilen ve HT1, HT2 ve HT3 olarak isimlendirilen yaklaşık 5 kDa moleküler ağırlığa sahip üç nörotoksinin (HTs) rat sinaptozomlarına bağlandığı belirlenmiştir (Thurn ve ark., 1992).

### **Epidemiyoloji**

Kene felcinin hayvan türleri içerisinde özellikle köpeklerde görüldüğü, aynı oranda insan sağlığı için problem oluşturduğu bununla birlikte kedi, sığır, koyun ve atlar da ortaya çıktığı ifade edilmektedir (Doube, 1975; Malik & Farrow, 1991; Schull ve ark., 2007; Sloan, 1968). Avustralya'da ve Galler'in kuzeyinde evcil hayvanlar (köpek, kedi, koyun, buzağı, domuz, tavuk ve fare) arasında yılda 10.000'in üzerinde kene felci vakasıyla karşılaşıldığı ifade edilmektedir (Grattan-Smith ve ark., 1997; Stone, 1988).

Hayvanlarda kene felci ve yaş ilişkisi üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmakta, vakaların daha çok genç hayvanlarda ortaya çıktığı görülmektedir. Kedi ve köpeklerde vaka sayısının en yaygın olduğu yaş döneminin 0-2 yaş aralığı olduğu bildirilmiştir (Diaz, 2010; Brazier ve ark., 2014). Bu durumun yüksek motor aktivitesine ilaveten savunma sistemlerinin gelişiminin tam olarak tamamlanamamış olması ile ilişkilendirilebileceği ifade edilmiştir (Brazier ve ark., 2014).

Literatür düzeyinde insan vakalarına ait verilerin hayvanlara göre daha fazla olduğu görülmektedir (Pek ve ark., 2016; Engin ve ark., 2006; Laufer & Chiota-McCollum, 2015). İnsanlarda kene felcinin her yaş grubunda görüldüğü ancak gençlerin daha riskli grubu oluşturduğu, bunun da vücut ağırlığı ve toksinin dozu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Daugherty ve ark., 2005; Gordon & Giza, 2004; Felz ve ark., 2000). Buna ek olarak enfestasyon durumlarında, yetişkinlerin keneleri daha kolay tespit edilebileceklerinden maruziyet süresinin kısalmasının da etkili olabileceği ifade edilmektedir (Diaz, 2010). Diğer taraftan insan-kene felci vakaları ile cinsiyet ilişkisi açık değildir. 664 kene felci vakasının analiz edildiği bir çalışmada çocuk vakalarının % 64'nün kız çocukları olduğu (Rose, 1954) buna karşılık British Columbia'da 1928-1968 yılları arasında, 23 yetişkin vakasının 19 (% 83)'unun erkeklerden oluştuğu bildirilmiştir (Schmitt ve ark., 1969).

Kene felci vakaları ile kenelerin aktif olduğu dönemleri arasında yüksek bir ilişki vardır. Kuzey yarım kürede kene aktivitesinin en yüksek olduğu dönem bahar ve yaz aylarıdır (Diaz, 2010). Güney yarım kürede ise bu dönem Ağustos-Mart ayları arasında görülmektedir (Hall-Mendelin ve ark., 2011). Ancak bu mevsimsel durum yerel hava durumlarına ve yıldan yıla değişebilecek yağış, kuraklık, sıcaklık gibi faktörlere de bağlıdır (Edlow ve ark., 2008).

### **Patofizyoloji**

Kene kaynaklı nörotoksinlerin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu etkilerin genel olarak botulinum toksininin etkisine benzer şekilde etki gösterdiği ifade edilmiştir (Hall-Mendelin ve ark., 2011). I. holocyclus tarafından üretilen toksinler (holosiklotoksin) nöromusküler plağın sinaptik boşluğu içerisine asetilkolinin presinaptik salınımını inhibe etmektedir (Masina & Broady, 1999; Hall-Mendelin ve ark., 2011). Dermacentor spp. (D. andersoni, D. variabilis) toksinleri de benzer etkiye sahiptir. Toksinler sonuçta sinir iletiminin gecikmesine ve iletim süresinin uzamasına neden olmaktadır. Bu etkinin, Ranvier boğumlarında ve sinir uçlarında aksonal zar boyunca sodyum çıkışının engellenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Taraschenko & Powers, 2014; Gordon & Giza, 2004). Diğer taraftan aksiyon potansiyeli sırasında asetilkolin salınımının yetersizliğine, uyarı-sekresyon mekanizmalarının başarısızlığı ve kalsiyum miktarındaki azalmanın neden olabileceği bildirilmiştir (Taraschenko & Powers, 2014; Felz ve ark., 2000). Holosiklotoksinlerin, Dermacentor spp. tarafından üretilen nörotoksinlerden çok daha yüksek toksisite göstermesinin sebebi olarak nörotoksine maruz kalan konağın bulbar semptomlarının ve kas zayıflıklarının, kenenin tutunmasından sonraki 24-48 saat içinde daha yoğun etki gösterdiği, klinik iyileşmenin daha geç görüldüğü aynı zamanda holosiklotoksinlerin, proteaz direnci gösterdiği, pH değişikliklerine karşı da oldukça dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Felz ve ark., 2000; Grattan-Smith ve ark., 1997). A. walkerae'nin larvaları ise periferik sinir lifleri boyunca sinir uyarılarının iletimini zayıflatıp motor nöronlarında iletim hızını yavaşlatarak ekstremitelere felçlerine neden olmaktadır (Taraschenko & Powers, 2014; Maritz ve ark., 2001).

Tükürük salgısı, toksinlere ek olarak konakçı bağışıklık sistemini, fibrinolitik enzimleri, trombositleri ve antienflamatuar maddeleri etkileyen yapıları içermektedir (Hall-Mendelin ve

ark., 2011; Grattan-Smith ve ark., 1997). Bu yapılar, lokal alerjik reaksiyonlara, ödeme, iltihaplanmalara ve anafilaksiye neden olmaktadır (Grattan-Smith ve ark., 1997; Pek ve ark., 2016).

Felç geçiren köpek ve kedilerden toplanan I. holocyclus türünün doymuş dişileri bu türe ait sialotranskriptom çalışmalarının ön analizinde kullanılmaya başlanmıştır (Ong ve ark., 2016). Ayrıca toksin ile ilişkili sekans çalışmalarında 72 adet transkriptin toksinle ilişkili dizinin ortaya konduğu bildirilmiştir (Rodriguez-Valle ve ark., 2018). Açığa çıkan sonuçlar nörotoksinlerin (HT) değişken aminoasit sekanslarına sahip proteinleri kodlayan çok aileli bir dizinin üyeleri olduğunu göstermiştir (Vink ve ark., 2014). HT'ler konakçı sinir sisteminin hücreleri ile doğrudan etkileşimi sonucu oluşan nörotoksik etkiye sahiptir. Bu toksinlerin sentetik formları in vitro rat sinaptozomlarına ve in vivo olarak yeni doğan farelerde indüklenmiş yapılara uygun bir şekilde bağlanabilmiştir. Bu çalışmaların paraliz belirtilerinin önlenmesi için yeni uygulamaların geliştirilmesine, daha önemlisi konak canlıyı felçten korumak için aşuların üretilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Rodriguez-Valle ve ark., 2018).

### **Klinik tablo**

Kene felcine bağlı vaka analizleri, paralizin iki aşamalı olduğunu göstermektedir. Prodromal (ön belirti) dönem, spesifik olmayan grip benzeri semptomlarla karakterize edilmektedir. Bu semptomların içinde zayıflık, uyku hali, baş ağrısı, bazen parestezi ve karıncalanma gibi klinik belirtiler görülmektedir (Felz ve ark., 2000; Li & Turner, 2004). Semptomlar kenenin vücuda tutunmasından sonra ortalama 36 saat içerisinde ortaya çıkmaktadır. Paralizin ikinci aşamasında bu klinik semptomlara ek olarak ileri düzey kas zayıflığını takiben kaslarda felç şekillenmektedir. Bu durumun başlangıcında denge bozuklukları (ataksi) ve alt ekstremitelere kas bağlantıları arasında meydana gelen zayıflık yer almaktadır (Laufer & Chiota-McCollum, 2015). Hastalar genel olarak yürürken ya da otururken bile güçlük çekmektedir. Bu dönemin klinik belirtileri kenenin konağa tutunmasından sonra ortalama 4-7 gün arası ortaya çıkmaktadır (Laufer & Chiota-McCollum, 2015; Diaz, 2010).

Paraliz progressiv nitelik göstermekte, daha alt ekstremitelere doğru yönelip burada kas zayıflıklarına sebep olmakta ve ilerleyen durumlarda solunum sistemi kaslarını etkilemektedir (Masina & Broady, 1999; Diaz, 2010). Hastalık birkaç saat içinde çok hızlı bir



şekilde gelişebildiği gibi, birkaç gün içinde yavaş bir şekilde de gelişebilmektedir. Tendon refleksleri hastalığın şiddetine bağlı olarak değişmez, zayıflamaz ya da yok olmaz (Grattan-Smith ve ark., 1997). Ekstremitelerde bozukluklarına kranial sinirlerin felci eşlik edebilmektedir (Li & Turner, 2004). Okulomotor sinirlerin felci ortaya çıkabilir (Taraschenko & Powers, 2014). Pupillaların reaksiyonu yavaşlarsa da ışığa tepki vermektedirler. Salivasyon artışı, dizartri, konuşma bozukluğu, yutma güçlüğü ve göz kapaklarında düşme görülebilmektedir (Grattan-Smith ve ark., 1997; Felz & diğerleri, 2000; Dworkin ve ark., 1999). Kene felci genellikle ateşsiz seyretse de vücut ısısının hafif yükseldiği vakalar da vardır (Diaz, 2010; Grattan-Smith ve ark., 1997). Bulantı veya kusma genel olarak gözlenmemektedir (Grattan-Smith ve ark., 1997; Burke ve ark., 2005).

Altmış altı yaşındaki bir çiftide kol uyuşması ile karakterize brachial omuz felci tanısı konulduğu, sonrasında subklavyen bölgede bulunan kenenin çıkarılması ile semptomların azaldığı bildirilmiştir (Engin ve ark., 2006). Diğer bir vakada ise tipik semptomların yanında bradikardi ve asistoli (myokardın kasılması ve kardiyak etkinliğin olmaması) görüldüğü ifade edilmiştir (Grattan-Smith ve ark., 1997). Zaman içerisinde kalp kası iltihabı ve diğer kasların iltihaplanması ile bağlantılı kene felci komplikasyonlarının örnekleri de verilmiştir (Grattan-Smith ve ark., 1997).

Hayvanlarda çoğunlukla solunum sistemi bozukluğuna, hipoksemiye takiben hipoventilyasyona neden olan larinks felci, bronkospazm ve respiratorik sisteme ait kas paralizleri neden olmaktadır. Bu durum hava yollarının kasılmasına, yerel havalandırma sisteminin bozulmasına daha sonra bölgede sıvı birikmesine ve alveollerin çökmesine yol açmaktadır. Aynı zamanda felç gelişimi zaman içerisinde hiperkapni (kanda CO<sub>2</sub> miktarının artması) riskini artırmaktadır. Solunum yetmezliği olan hayvanların nekropsisinde kanal tıkanıklıkları ve pulmoner ödem gözükmemektedir (Webster ve ark., 2012; Chomel ve ark., 2003). Nörotoksinler ayrıca kalbin kasılma kuvvetinin zayıflamasına ve zaman içinde de durmasına neden olabilmektedir (Westwood ve ark., 2013). Hastalığın başlangıcında görülen klinik bulgular, Guillain-Barre sendromuna benzetildiği için genel olarak ilk etapta kene felci ile bu hastalığı ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir (Dworkin ve ark., 1999; Daugherty ve ark., 2005; Masina & Broady, 1999).

Bradikardi ve kardiyak arrest (kalbin pompalama işlemini durdurması), Afrika'da bulunan *O. savignyi* tutunduğu hayvanlar arasında teşhis

edilmiştir. Bununla birlikte bu hayvanlarda dalak, böbrek ve akciğer tıkanıklığıyla beraber ödem belirtisi de tespit edilmiştir (Mans ve ark., 2004). Kene felci geçiren atlar üzerine yapılan bir çalışmada, başlangıçta zayıflık ve durgunluk görüldüğü, spinal reflekslerinin normal olduğu fakat dil ve kuyruk kas tonusunun azalmaya başladığı, genellikle ayaktaki hayvanlarda kas titremesi ve disfonksiyon bulgularının görüldüğü aynı zamanda nörojenik kas atrofisinin belirgin olmadığı bununla birlikte BOS sitolojilerinin normal olduğu bildirilmiştir (Trumpp ve ark., 2019).

### **Teşhis**

Kene felci vakalarında ilk etapta genellikle yanlış teşhis konulabilmektedir. Bu nedenle kene felci teşhisi için etkili bir teşhis anahtarı oluşturulmalıdır. Çünkü kene tutunması ve görülen ilk semptomlar arasında birkaç günlük fark oluşabilmektedir (Inokuma ve ark., 2003; Gordon & Giza, 2004).

Kene felcinin teşhisinde, klinik semptom gösteren konak üzerinde kene kontrolü yapmak ve keneyi ya da keneleri bulmak önem taşımaktadır. Bu nedenle tam bir vücut (cilt) muayenesi yapılmalıdır. Muayene sırasında kenelerin tutunması muhtemel yerler (kulak arkası, dış kulak yolu, kasık, diz kapağı arkası, göbek çevresi) dikkatli bir şekilde kontrol edilmeli ve canlı üzerinde tek bir kene bulursa da çok dikkatli bir tarama yapılmalıdır (Dworkin ve ark., 1999; Rose, 1954).

Kız çocuklarının, erkek çocuklardan daha fazla etkilenmesinin sebebi olarak kene taramasının eksik yapılması bunun sonucunda uzun saçların etkisiyle gizlenen kenelerin paraliz riskini artırdığı ifade edilmektedir (Edlow ve ark., 2008). Veteriner Hekimler konak üzerinde kene varlığını araştırırken canlıyı uygun şekilde tıraş edebilirler. İnsanlarda ince dişli sık aralıklı bir tarak kullanmak fayda sağlayabilir. Teşhis ve tedavi amacıyla yapılan muayenenin eksiksiz olması çok önemlidir. Klinik belirtiler uzun sürebilir ve kene çıkarılmasını takip eden 24-48 saat içerisinde daha kötü sonuçlar ortaya çıkabilir (Grattan-Smith ve ark., 1997; Felz ve ark., 2000; Melissa, 2008). Bu durum genel olarak Avustralya vakalarında bildirilmiştir (Cooper, 1976). Bu hastaların doğru ve destekleyici bir tedavi ile hızlı bir şekilde iyileşmesi beklenir. Kene paralizisi olan hastalarda beyin omurilik sıvısı normaldir (Burke ve ark., 2005).

Kene felci için yapılan görüntüleme çalışmalarında, laboratuvar ve nörofizyolojik analizlerde genel olarak detaylı durum ortaya konulmaktadır. BT (Bilgisayarlı tomografi) ve MRG (Manyetik

rezonans görüntüleme) kullanılarak yapılan görüntüleme sistemlerinde beyin pozisyonu normal olmasına rağmen, MRG'nin retrospektif incelemesinde kafa derisi içerisine gömülü kenelerin olduğu bildirilmiştir (Burke ve ark., 2005).

Paralize bağlı nörofizyolojik çalışmalarda normal veya uzun latensli kas fonksiyonlarındaki zayıf genişlikler ya da sinir iletim hızına ait negatif değişiklikler (azalma) gözlenmiştir (Felz ve ark., 2000; Pek ve ark., 2016; Engin ve ark., 2006).

Kenelerin çıkarılmasından sonra genel değerler ve iletim süresinin normale döndüğü araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Felz ve ark., 2000).

### ***Tedavi yaklaşımı ve korunma***

Kene felci önemli ölçüde tedavi edilebilir bir hastalık olarak değerlendirilmektedir (Greenstein, 2002). Normal şartlarda kene konaktan uzaklaştırıldıktan sonra, semptomların saatler içerisinde düzelmeye başladığı ve ortalama 24 saat içerisinde tamamen iyileşme görüldüğü (Greenstein, 2002), solunum sistemine ait kaslarda paralize uğrayan hastalarda kısa süreli mekanik ventilasyon gerekebildiği bildirilmiştir (Diaz, 2010; Hall-Mendelin ve ark., 2011). Kenenin bulunduğu bölgede, kaşıntı, ürtiker veya ödem tespit edilmesi durumunda ise semptomatik tedavi önerilmektedir (Hall-Mendelin ve ark., 2011).

Kene felci potansiyel olarak ölüm riski taşıyan bir hastalıktır. Ortalama mortalite oranının %10-12 arasında olduğu bildirilmiş olsa da doğru tedavi uygulamaları ile mortalite oranının önemli ölçüde azalabildiği ifade edilmiştir (Rose, 1954; Schmitt ve ark., 1969). Semptomları minimal düzeyde olan hastalar, birkaç saat gözlem altında tutulduktan sonra, klinik yönden bir problem şekillenmezse taburcu edilebilirler (Masina & Broady, 1999). Genel olarak Kuzey Amerika'da gelişen vakalara kıyasla Avustralya vakalarında görülen iyileşme daha yavaş olduğu ifade edilmektedir (Greenstein, 2002). Avustralya vakalarında, kene çıkarıldıktan sonra klinik belirtilerin olumsuz yönde değişim gösterebildiği ve bu hastalarda iyileşme görülene kadar bir süre izlenmesi gerektiği belirtilmiştir (Masina & Broady, 1999).

Veteriner hekimlikte özellikle I. holocyclus toksinlerine karşı kullanılan, antitoksinler mevcuttur. Anafilaktik reaksiyonlar ve diğer yan etkilere yol açması sebebiyle insanlarda kullanımı sınırlıdır (Hall-Mendelin ve ark., 2011). Bununla birlikte konaklarda holosiklotoksinlere cevap olarak

antikor üretildiği belirtilmektedir (Masina & Broady, 1999).

Köpeklerden hazırlanan hiperimmün serum ilk kez 1935 yılında hayvanlarda kullanılmıştır (Malik & Farrow, 1991). Söz konusu hiperimmün serum Avustralya'da zaman zaman şiddetli kene felci semptomları görülen insanlarda da kullanılmış (Masina & Broady, 1999; Pearn, 1977) olmasına karşın, insanlarda hiperimmün serumun kullanımı ile ilgili verilerin yetersiz olduğu ifade edilmektedir (Melissa, 2008; Due ve ark., 2013).

Kene enfestasyonlarından korunmak ve konağa etkisini azaltmak için sık sık kene kontrolü yapmak, tutunan keneleri en erken sürede saptamak ve uygun bir şekilde çıkarmak gerekmektedir. Bununla beraber özellikle açık hava (ormanlarda, bahçelerde, su rezervuarlarında) gezintilerinden sonra vücudun kene varlığı yönünden dikkatli bir şekilde incelenmesi önemlidir. Açık renkli kıyafetler giyilmesi, repellentler (trans-p-metan-3,8 diol (PMD) ve W,N dietil-3-metilbenzamid gibi) kullanılması, pantolon paçalarının çoraplar içerisine sokulması kene enfestasyonlarına karşı etkili koruyucu önlemler arasındadır (Melissa, 2008; Due ve ark., 2013). Hayvanların periyodik olarak uygun akarisitlerle ilaçlanması da kene tutunmalarını önleyeceğinden, kene felci vakalarını engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Due ve ark., 2013).

### **Sonuç**

Kene felci insanları ve hayvanları etkileyen, nörotoksin kaynaklı bir hastalıktır. Bugüne kadar tüm dünyada tanımlanan kenelerin yaklaşık %10'unun kene felcine neden olduğu bilinmektedir. Kene felci özellikle Kuzey Amerika ve Avustralya'nın doğu kıyılarında yaygın olarak görülmektedir. Kene felci vakalarının benzer klinik semptom gösteren diğer hastalıklardan ayırt edilmesi önem taşımaktadır. Hastalığın ortaya çıktığı durumlarda ise doğru tedavi yöntemleri kullanılmalıdır. Kene felcinin endemik olduğu bölgelerde yaşayan kişiler, hastalıktan daha ziyade kene enfestasyonlarından korunmak için gerekli önlemleri almalıdırlar. Hayvanların da periyodik olarak uygun akarisitlerle ilaçlanması gerekmektedir.

### **Kaynaklar**

**Barker SC, Murrell A, Bowman AS, Nuttall PA (2008)** Ticks: biology, disease and control. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Cambridge University Press, Cambridge, 1-39.

- Brazier I, Kelman M, Ward MP (2014)** The association between landscape and climate and reported tick paralysis cases in dogs and cats in Australia. *Vet Parasit* 204:339-345.
- Burke MS, Fordham LA, Hamrick HJ (2005)** Ticks and tick paralysis: imaging findings on cranial MR. *Pediatr Radiol* 35(2):206-8.
- Camicas JL, Hervy JP, Adam F, Morel PC (1998)** The ticks of the world (Acarida, Ixodida). Nomenclature, described stages, hosts, distribution (including new species described before 1/01/96). Paris: Orstom Éditions, 233 pp.
- Chomel BB, Wey AC, Kasten RW (2003)** Isolation of *Bartonella washoensis* from a dog with mitral valve endocarditis. *J Clin Microbiol* 41(11):5327-32.
- Cooper BJ (1976)** Studies on the pathogenesis of tick paralysis [PhD thesis]. Sidney: Veterinary Sciences, University of Sydney.
- Daugherty RJ, Posner JC, Henretig FM, McHugh LA, Tan CG (2005)** Tick paralysis: atypical presentation, unusual location. *Pediatr Emerg Care* 21(10):677-80.
- Diaz JH (2010)** A 60-year meta-analysis of tick paralysis in the United States: a predictable, preventable, and often misdiagnosed poisoning. *J Med Toxicol* 6(1):15-21.
- Doube BM (1975)** Cattle and the paralysis tick *Ixodes holocyclus*. *Aust Vet J* 51:511-515.
- Due Ch, Fox W, Medlock JM, et al. (2013)** Tick bite prevention and tick removal. *BMJ* 347:7123.
- Dworkin MS, Shoemaker PC, Anderson DE (1999)** Tick paralysis: 33 human cases in Washington State, 1946-1996. *Clin Infect Dis* 29(6):1435-9.
- Edlow JA, Daniel C, Mc Gillicuddy (2008)** Infectious disease clinics of North America. Tick paralysis 22.3:397-413.
- Engin A, Elaldi N, Bolayir E, et al. (2006)** Tick paralysis with atypical presentation: isolated, reversible involvement of the upper trunk of brachial plexus. *Emerg Med J* 23(7):42.
- Felz MW, Smith CD, Swift TR (2000)** A six-year-old girl with tick paralysis. *N Engl J Med* 342(2):90-4.
- Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009)** The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 14:2051-2088.
- Gordon BM, Giza CC (2004)** Tick paralysis presenting in an urban environment. *Pediatr Neurol* 30(2):122-4.
- Grattan-Smith PJ, Morris JG, Johnston HM, et al. (1997)** Clinical and neurophysiological features of tick paralysis. *Brain* 120(11):1975-1987.
- Greenstein P (2002)** Tick paralysis. *Med Clin North Am* 86(2):441-6.
- Hall-Mendelin S, Craig SB, Hall RA, et al. (2011)** Tick paralysis in Australia caused by *Ixodes holocyclus* Neumann. *Ann Trop Med Parasitol* 105(2):95-106.
- Inokuma H, Takahata H, Fournier PE, et al. (2003)** Tick paralysis by *Ixodes holocyclus* in a Japanese traveler returning from Australia. *Ann N Y Acad Sci* 990:357-8.
- Jongejan F, Uilenberg G (2004)** The global importance of ticks. *Parasitology* 129:3-14.
- Kaire GH (1966)** Isolation of tick paralysis toxin from *Ixodes holocyclus*. *Toxicon* 4:91-97.
- Keirans JE (1992)** Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): an overview and some problems. In *Tick Vector Biology*, Springer, Berlin, Heidelberg pp 1-21
- Keirans JE, Robbins RG (1999)** A world checklist of genera, subgenera, and species of ticks (Acari: Ixodida) published from 1973-1997.
- Lauffer CB, Chiota-McCollum N (2015)** A Case of Subacute Ataxia in the Summertime: Tick Paralysis. *J Gen Intern Med* 30(8):1225-7.
- Li Z, Turner RP (2004)** Pediatric tick paralysis: discussion of two cases and literature review. *Pediatr Neurol* 31(4):304-7.
- Malik R, Farrow BR (1991)** Tick paralysis in North America and Australia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21(1):157-71.
- Mans BJ, Gothe R, Neitz AW (2004)** Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology* 129(supplement):95-111.
- Maritz C, Louw AI, Gothe R, et al. (2001)** Neuropathogenic properties of *Argas (Persicargas) walkerae* larval homogenates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128(2):233-9.
- Masina S, Broady KW (1999)** Tick paralysis: development of a vaccine. *Int. J. Parasitol* 29(4):535-541.
- Melissa LC (2008)** Neuromuscular Emergencies, *Clin Pediatr Emerg Med* 9:88-95.
- Nicholson WL, Sonenshine DE, Lane RS, Uilenberg G (2009)** Ticks (Ixodida). Mullen GR, Durden LA, editors. *Medical and Veterinary Entomology*. London: Academic Press, Elsevier 493-542.
- Nowak-Chmura M, Siuda K (2012)** Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann Parasitol*, 58(3):125-155.
- Ong CT, Rodriguez-Valle M, Moolhuijzen PM, Barrero RA, Hunter A, Szabo T, Bellgard MI, Lew-Tabor AE (2016)** Exploring the transcriptomic data of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*. *GSTF J. Vet. Sci*, 3. [https://doi.org/10.5176/2345-7880\\_5173.5171.5114](https://doi.org/10.5176/2345-7880_5173.5171.5114).
- Pearn J (1977)** The clinical features of tick bite. *Med J* 2(10):313-8.
- Pek CH, Cheong CS, Yap YL, et al. (2016)** Rare Cause of Facial Palsy: Case Report of Tick Paralysis by *Ixodes Holocyclus* Imported by a Patient Travelling into Singapore from Australia. *J Emerg Med* 51(5):109-114.
- Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM (2011)** A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 12:136.
- Rodriguez-Valle M et al. (2018)** Transcriptome and toxin family analysis of the paralysis tick, *Ixodes*

holocyclus. *International journal for parasitology* 48:71-82.

**Rodriguez-Valle M**, Lew-Tabor AE, Gondro C, Moolhuijzen P, Vance M, Guerrero FD, Bellgard M, Jorgensen W (2010) Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae preattachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *BMC Genomics* 11:47.

**Rose I** (1954) A review of tick paralysis. *Can Med Assoc J* 70(2):175–6.

**Schmitt N**, Bowmer EJ, Gregson JD (1969) Tick paralysis in British Columbia. *Can Med Assoc J* 100(9):417–21.

**Schull DN**, Litster AL, Atwell RB (2007) Tick toxicity in cats caused by *Ixodes* species in Australia: a review of published literature. *J Feline Med Surg* 9:487-493.

**Sloan CA** (1968) Mortality in sheep due to *Ixodes* species. *Aust Vet J* 44:527.

**Sonenshine DE** (1991) *Biology of ticks*, Vol. 1. New York: Oxford University Press, 3–26.

**Stone BF** (1986) Toxicoses induced by ticks and reptiles in domestic animals. In: Harris JB, editor. *Natural toxins*. Oxford: Oxford University Press 56-71

**Stone BF** (1988) Tick paralysis, particularly involving *Ixodes holocyclus* and other *Ixodes* species. In: Harris KF, editor. *Advances in disease vector research*, Vol. 5. New York: Springer-Verlag 61–85.

**Stone BF**, Commins MA, Kemp, DH (1983) Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *Int. J. Parasitol* 13:447–454.

**Taraschenko OD**, Powers KM (2014) Neurotoxin-induced paralysis: a case of tick paralysis in a 2-year old child. *Pediatr Neurol* 50(6):605-7.

**Thurn MJ**, Gooley A, Broady KW (1992) Identification of the neurotoxin from the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*, In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K.Z' (Ed.), *Recent Advances in Toxinology Research*. Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore, Singapore 243–256.

**Trumpp KM**, Parsley AL, Lewis MJ, Camp Jr JW, Taylor SD (2019) Presumptive tick paralysis in 2 American Miniature horses in the United States. *Journal of veterinary internal medicine* 33(4): 1784-1788

**Vink S**, Daly NL, Steen N, Craik DJ, Alewood PF (2014) Holocyclotoxin-1, a cystine knot toxin from *Ixodes holocyclus*. *Toxicon* 90:308–317.

**Walker BJ**, Keirans JE, Horak IG (2000) *The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world*. Cambridge: Cambridge University, 2000.

**Webster R**, Haskins S, Mackay B (2012) Management of respiratory failure from tick paralysis. *Aust Vet J* 91:499–504.

**Westwood M**, Emery D, Dhand N (2013) Clinical presentation and treatment of tick paralysis in dogs and cats in Sydney (2001–2010). *Aust Vet J* 91:491-498.



## Açık Yara Tedavilerine Son Yaklaşımlar

Duygu SEZER\*, Mustafa AKTAŞ

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Ana Bilim Dalı, Avcılar, Türkiye

Sezer D 0000-0001-5809-8213 Aktaş M 0000-0002-3674-2511

\*Corresponding Author's E-Mail: m.duygu.sezer@gmail.com

### Özet

Günümüz veteriner hekimliğinde, yara tedavileri klasik görüşlerin dışında artık yeni teknolojik ürünlerin de dahil edilmesiyle boyutlarını değiştirmiştir. Bunun yanında bal gibi bazı kadim preparatların faydaları ve diğer bazı ilaçlara olan üstünlükleri yeniden tartışılmaya başlanmıştır. Bu derlemeyle açık yara tedavisinde kullanılan tedavi yöntemleri ve preparatları bir araya toplanmaya çalışıldı. Amacımız bunların ülkemizde de aktif bir şekilde kullanılmaya başlanması ve açık yara tedavisinin iyileştirilmesidir.

Received 11 February 2020  
Received in revised form 28 April 2020  
Accepted 11 May 2020

### Anahtar kelimeler:

Debridman, lavaj, pansuman, yara.

**Cite this article:** Sezer D, Aktaş M (2020) Açık Yara Tedavilerine Son Yaklaşımlar. Turk Vet J, 2(1):24-28.

### New Approaches to Open Wound Management

#### Abstract

Nowadays, wound management takes its place in veterinary medicine with all the new aspects and techniques employed all around the world. In addition, the use of classical products or substances like honey brought some discussions about their benefits compared to other drugs. In this review, we tried to collect the most important treatment methods and products which are still used in open wound management in pet animals. Our aim, was to introduce some new concepts and knowledge in our veterinary practice and to promote their uses in open-wound therapies.

**Key words:** Debridement, dressing, lavage, wound.

### Giriş

Yara, deri ve altındaki dokunun bütünlüğünü kaybetmesini tanımlar. Yara iyileşmesi, fibrin-plateletten oluşan pıhtıların yara hattında birikmesi, beyaz kan hücrelerinin bölgeyi enfeksiyondan korumak için toplanması, neovaskülarizasyon, hücre proliferasyonu ve dokunun yeniden yapılanmasından oluşur. (Anderson, 1996; Dyson, 1997; Singh ve ark., 2017)

#### Yaranın sınıflandırılması ve yara tipleri

Açık yara için sınıf 1, 0'dan 6 saate kadarlık süreçte gerçekleşen ve minimal kontaminasyonla karakterize doku travmasını ifade eder. Sınıf 2, yaranın 6-12 saat arası süreçteki halidir; mikroorganizma replikasyonu gerçekleşmiştir. Teknik olarak, altın periyotla kontaminasyonun durması sağlanabilir. Sınıf 3, 12 saatten daha eski yaralar; mikrobiyel replikasyon kritik seviyeye ulaşabilir ve enfeksiyon gelişebilir. Yara tipleri; abrazyon, delinme yaraları, yırtık yaraları, soyuk yaraları, termal yanıklar ve dekübitis yaralarından oluşur (Pavletic, 2010; Dernell, 2006).

#### Yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi; primer yara iyileşmesi, gecikmiş primer iyileşme, kontraksiyon ve epitelizasyon ile iyileşme ve sekonder olarak iyileşme olmak üzere dört şekilde gerçekleşir (Cornell, 2012)

**Yara lavajı:** Akut yara temizliğinde Hartmann solüsyonu sitotoksik etkiye sebep olmaması ile en ideal lavaj solüsyonu gibi gözükmektedir. Antiseptik solüsyonlar da mutlaka gerekliyse düşük konsantrasyonlarda kullanılabilir (%0,05'lik Klorheksidin, %0,1'lik povidon iodin içinde). Basıncın 4 ile 15 psi arasında olması gereklidir. Yüksek basınçlı lavaj debris oluşturabileceğinden ve bakteriyi doku içerisine itilebileceğinden kullanılmamalıdır (Hosgood, 2012).

**Dakin Solüsyonu:** Sitotoksik etki açısından iyi izlenmelidir.

**Organik Asitler:** Kollajen bağları zayıflatıcı olarak etki eder.

**Tris EDTA:** Bakterilerin lizozimlerini yıkılmayarak antiseptik/ antibiyotik etki gösterir (Cornell, 2012).

## **Yara debridmanı**

Yara debridmanı seçici ve seçici olmayan olmak üzere iki şekilde yapılabilir.

**Cerrahi debridman:** Uygun yaralar, doku hasar boyutu ve kontaminasyon seviyesine göre 'blok' yöntemiyle kaldırılabilir. Bu verimli, çok etkili bir yara tedavi metodudur.

**Katmansal debridman:** Katmansal debridman, yara yüzeyindeki devitalize dokunun segmental olarak alınmasıdır. Eksize edilmesi mümkün olmayan yaralarda endikedir.

**Enzimatik debridman:** Kollajenöz doku, debristeki süperfisiyal kalıntı ve devitalize dokuları eriten topikal enzimatik ya da kimyasal ajan uygulamaları yapılır. Enzimatik ajanlar nekrotik dokuyu yıkımlar ve koagulum ile bakteriyel biyofilm salgırlar; bu da hücrel ve humoral bağışıklık gelişiminin artmasına izin verir. Enzimatik veya kimyasal etkili ajanlar: tripsin, kollajenaz, papain ve üre. Canlı maya hücre ekstraktı da oksijen kullanımını stimüle eder, kollajen üretimi ve epitelizasyon sağlar. Nonenzimatik debridman pomatlar; hipertonic tuz (%20), şeker, bal, dekstran emdirilmiş pomatlar.

**Otolitik debridman:** Otolitik debridman, nemli yara çevresindeki ölü dokunun, endojen enzimler tarafından yıkılmasını sağlar. Sıklıkla ulaşılması zor dokularda tercih edilir. Nispeten az ağrılı olmakla beraber çok daha ağır işleyen bir yöntemdir.

**Mekanik debridman:** Yara yüzeyinin mekanik debridmanı, nonselektif debridman sağlayan kuru/yaş pansuman ve abraziv güç uygulaması teknikleriyle sağlanabilmektedir. Yaş-kuru pansuman ve kuru-kuru pansuman hızla yara yüzeyine yapışır. Bu pansumanlar erken dönemde yara iyileşmesi ve enfeksiyonla baş edilmesinde oldukça etkilidir. Ancak debridman ağırlıdır ve nonselektif özellikte olduklarından sağlıklı iyileşme dokusunu travmatize edebilir. Bu nedenle kuru-yaş ve kuru-kuru pansumanlar sağlıklı granülasyon dokusu üzerine uygulanmamalıdır.

**Biyocerrahi debridman:** Kurtçuk tedavisi, cerrahi debridmanın uygulanamadığı durumlarda uygulanır. Kurtçuklar; nekrotik dokuları eriten digestif enzimler salgırlar. Bunlar, sağlıklı dermis ve subkutanöz dokuyu zedelediği için tercih edilmektedir (Mickelson ve ark., 2016).

## **Topikal yara tedavisi**

**Bal:** Bal, bakteriyostatik özelliğinden dolayı yara temizlenmesine yardımcı, düşük pH'da olması sayesinde streptokoklar üzerinde öldürücü ve inhibe edici etkili, ayrıca stafilokok koagulaz pozitif

özelliğindedir. Yara debridmanı sağlar, ödem ve yangıyı azaltır, granülasyon doku formasyonu ve epitelizasyonu artırır (Mathews ve Binnington, 2002; Çelimli, 2004; Molon ve Rhodes, 2015; Williams, 1999).

**Üçlü antibiyotik yağlar:** Basitrasin çinko kombinasyonları, neomisin sülfat ve polimiksin sülfat gibi topikal yağların özelliği, geniş spektrumlu olmaları ve sitotoksitenin olmamasıdır. Primer olarak ılımlı kontamine yaralarda endikedirler. Basitrasin çinkonun yara kontraksiyonunu geciktirici etkisi gözden kaçmamalıdır (Pavletic, 2018).

**Yavaş salınan gümüş pomatlar:** %1'lik gümüş sülfadiyazın, "nonpartiküler yavaş salınan" gümüş emdirilmiş ve iyonik gümüş emdirilmiş pansumanların kullanımı hızlı yenilenme sağlar. İyonik gümüş emdirilmiş pansumanlar yarayı geniş çapta yeniler ve yanık tedavisinde üstün etki gösterir. Bunlar; su geçirmez köpük, aljinat, geçirgen polyester yama ve karboksimetil selüloz fiber pansuman formlarında olur. Hidrofilik gümüş emdirilmiş pansumanlar, iyonik gümüş içine jel salınımı sağlar ve bol eksudat üreten yaralarda kullanılır. Bunlar, aerobik ve anaerobik bakteriler üzerine aktivite gösterir, dirençli zincirler, mayalar ve filamentöz mantarlara etki ederler (Ovington, 2007).

**Nitrofurazon:** Hidrofilik özellikte ve fazla sıvıyı absorbe edebilmektedir. Ancak yara epitelizasyonunu geciktirir.

**Poliheksametilen biguanid:** %0,2'lik poliheksametilen biguanid sekonder yüzeyde aşırı mikrobiyal yükün azaltılmasında kullanılabilir.

**Gentamisin sülfat ve sefazolin:** Yavaş yara kontraksiyonu ve epitelizasyon oluşturur. Gram (-) bakterilerin kontrolünü sağlar (Fossum, 2018).

**Penisilinler:** Doku döküntüleri ve irin; aminoglikozitler, sülfonamidler ve polimiksinlerin etkisini azaltırken penisilinler bundan etkilenmez

**Mafenid:** Topikal sülfat bileşiği, aköz sprej şeklinde üretilmektedir, antibakteriyeldir (Akkan ve Karaca, 2003).

## **Yara iyileşmesini hızlandırıcılar**

**Aloe vera:** Aloe vera *Pseudomonas aeruginosa* üzerine olan antibakteriyel etkisinden dolayı yanıklarda tercih edilir. Ayrıca fungal büyümeyi de inhibe eder. Antiprostaglandin ve antitromboksan özelliği vardır ve bu da avert (ayrılmış) dermal iskemide yardımcı olur. Fibroblastik replikasyonu stimüle eder, dokuya penetre olabilir ve anestezize eder. Allantoin, aloe vera içeren bir diğer jel

komponentidir; yara onarımını stimüle eder, suppuratif yaralarda ve inatçı ülserlerde epitelizasyonu destekler. Yara dokusunda kalınlaşmayı da anti-inflamatuvar etkisi sayesinde azaltır.

*Acemannan:* Hidrojel ve donmuş kuru jel formunda, yanık, yırtık, dermal ülser, abrazyon ve iyileşmeyen yaralarda kullanılabilir. Acemannan makrofajların IL-1 ve TNF-alfa üretimini stimüle eder, fibroblast proliferasyonu, neovaskularizasyon, epidermal büyüme ve motilite, granülasyon dokusunda kollajen depolanmasını sağlar (Pavletic, 2018).

*Tripeptid-bakır kompleksi:* Glisil-L-histidil-lizin-tripeptid-bakır kompleksi yara iyileşmesini stimüle eder ve mast hücresi, monosit ve makrofajların anjiyogenez, kollajen sentezi ve epitelizasyonu için kemoatraktanttır. İlerlemiş, kronik iskemik açık yaraların iyileşmesinde etkilidir.

*D-glukoz polisakkarit:* Maltodekstrin kontamine ve enfekte yaralarda, yara iyileşmesini stimüle etmek için kullanılır. Hidrofilik özelliği sayesinde sıvıyı doku içine çekerek yaranın nemli kalmasını sağlar. Ayrıca maltodekstrinin antibakteriyel ve bakteriyostatik özelliği vardır. Ağrı, eksudat, şişlik ve enfeksiyonu azaltır, erken granülasyon doku formasyonu ve epitelizasyonu sağlar (Pavletic, 2018).

*Şeker:* Şeker antibakteriyel etkili olup sağlıklı granülasyon dokusu oluşumuna yardımcı olur. % 40'lık şeker solüsyonu *Staphylococcus aureus* dışındaki bakterilerin üremesini durdurmaktadır. Bu aktivitenin sağlanması için 35°C'de 100 g suya 194 g kristal şeker yeterlidir (Chirife ve ark., 1982; Yavru ve ark., 1992).

*Büyüme faktörleri:* Yara iyileşmesini hızlandırır.

*Hidrolize Sığır Kollajeni:* Hidrofilik preparatları erken fazlarda otolitik debridman için gerekli olan nemli ortamı ve epitelizasyon için optimal çevreyi sağlar (Pavletic, 2108).

*Kitosan:* Midye kabuğundan elde edilen kitosanın etken maddesi olan glukozaminin yangı hücreleri fonksiyonunu, büyüme faktörü ve fibroblastların granülasyon doku formasyonunu artırdığı ve yara iyileşmesinin hızlandırdığı rapor edilmiştir (Hosgood, 2012).

*Biyoiskeletler ve sentetik matriks:* Semioklüziv örtü şeklinde üretilip piyasaya sürülen biyoiskeletler; ekstraselüler matriks gelişimi için iskelet oluşumunu sağlayarak, kronik yaralarda onarımı hızlandırır. Sentetik matriks, matriks metaloproteinazların aşağı regülasyonunu sağlar, kronik yara çevresini dengeler ve iyileşmeyi

hızlandırır. Yara ortamındaki nem ve ısı ile aktive edildiğinden ikincil bir örtü ile birlikte kullanılmalıdır. Eğer doku sağlıklı ise, ekstraselüler matriks, hücre yenilenmesini stimüle eder interselüler kominikasyonu düzenler.

*Tissupor yara pedi:* Bir tekstil ürünü olan materyal, gözenekli yapısıyla mekanik uyarı yaparak yara bölgesinde granülasyon doku oluşumu ve yara iyileşmesi sağlar (MacPhail, 2013; Selçukbiricik ve ark., 2004).

### **Pansuman çeşitleri**

*Perfore film pansumanlar:* Kuru yaralarda kullanılır.

*Köpük pansumanlar:* Köpük pansumanlar, optimum sıcaklıkta ve çevresi iyi oksijenize olmuş nemli dokuda mükemmel emme kapasitesine sahiptir. Yara üzerindeki aşırı nemi emer hafif nemli kalmasını sağlar. Yenilenmeyi, otolitik debridmanı stimüle eder, granülasyon doku formasyonu, kontraksiyon ve epitelizasyonu sağlar (Fossum, 2018).

*Hidroaktif pansumanlar:* Otoliz ve debridmanı takiben gelişen nemli yara iyileşmesinin sağlanmasında en önemli yoldur. Amorföz hidrojel, tabaka şeklinde hidrojel ve hidrokolloidler diye üçe ayrılır.

*Hidrokolloidler:* Hidrokolloidlerin rehidrasyon özelliği had safhadadır ve yaradaki presipite dokuların otolitik debridmanını sağlar. Süperfisiyal, minimal eksudatlı yaralar için ideal preparatlardır. İnce hidrokolloidlerde bakteri üremesi çok düşük orandadır (Miller, 2003).

*Semipermeabl film pansumanlar:* Çok az eksudatlı/eksudatsız yaralarda nemi sürdürmek ve epitelizasyona yardımcı olmak için mükemmeldir (Tablo 1) (Liptak, 1997; Williams, 1999; Vowden ve Vowden, 2017).

*Biobran pansumanlar:* Silikon film ve domuz kollajeninden üretilmiş biyosentetik bir materyaldir. Ağırlıklı olarak yanık yaraları gibi maddi doku kaybı olan vakalarda yara yüzeyini örtmede kullanılır (Preifke, 2015).

*Silikon yüzeyler:* Epitelizasyon aşamasındaki yaralar veya deri greftlerinde kullanılır.

*Parafin gaz:* Yumuşak parafin emdirilmiş materyallerdir (Mathews ve Binnington, 2002).



**Tablo 1:** Piyasada bulunabilecek yara pansuman malzemeleri

Pansuman Tipi	Ticari İsmi	Üretici
<b>Perfore Film Adsorbanlar</b>	Melolin	Smith&Nephew
	Release	Johnson&Johnson
	Skintact	Robinson Health Care
	Cutilin	TSK Animal Health
<b>Köpükler</b>	Lyof foam	Ultra Lab Ltd
	Cutinova Foam	TSK Animal Health
	Tielle	Johnson&Johnson
	Allevyn	Smith&Nephew
<b>Hidrojel</b>	Intrasite	Smith&Nephew
	Granugel	ConvaTec
	Nu-Gel	Johnson&Johnson
	AquaFoam	TSK Animal Health
	Cutinova Cavity	TSK Animal Health
	Cutinova Hydro	TSK Animal Health
<b>Hidrokolloidler</b>	Biodres	DVM Pharmaceuticals
	Tegasorb	3M
	Granuflex	ConvaTec
	Comfeel	Coloplast Ltd
<b>Alginatlar</b>	Kaltogel	ConvaTec
	Kaltostat	ConvaTec
	AlgiSite	Smith&Nephew
	Algosteril	TSK Animal Health
	Sorbsan	AnimalCare Ltd
	Tegagel	3M
<b>Semi-permeabl Adeziv Film</b>	Cutifilm	BDF Medical Ltd
	Opsite	Smith&Nephew
	Tegaderm	3M
	Bioclusive	Johnson&Johnson

### **Yara iyileşmesini etkileyen dış faktörler**

Pico-tesla elektromanyetik dalgalar ratlardaki açık yaralarda yara dikişinin gerginliğini ve kontraksiyon hızını etkileyerek iyileşme sağlamıştır. Hiperbarik oksijen tedavisi ise plazmadaki serbest oksijen miktarını artırır, yeni kapıllarların büyümesini stimüle eder ve iskemik yaraların tedavisinde kullanışlıdır. Ultrason ve fototerapi, onarımın proliferatif formunda salınan faktörleri stimüle eder. Bunların yanı sıra ozon tedavisinin de bakteri enfeksiyonunu azaltmak, yarayı onarmak ve yara bölgesindeki oksijen miktarını arttırmak suretiyle yara iyileşmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir. Ozonun tek başına hücre içerisine penetre olma özelliği bulunmadığından susam yağı, zeytin yağı gibi doymamış yağ asitleriyle birlikte kullanılmaktadır (Güzel ve ark., 2011).

Sonuç olarak, önceki yıllarda sadece beşeri hekimlikte kullanılan birçok yöntem ve materyal artık veteriner hekimlik için de kullanılabilir ve ulaşılabilir hale gelmiştir. Açık yara iyileşmesinde kullanılan tedavi metodu ve materyallerde, derlememizde de değindiğimiz bazı önemli püf noktalarına dikkat edilmesi, yaranın daha etkili ve

kontrollü sağaltımına olanak verir. Yaranın niteliğine spesifik ajanların tercih edilmesi daha verimli sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

### **Kaynaklar**

- Akkan HA, Karaca M** (2003) Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı. *YYU Vet Fak Derg* 14 (2): 72-77.
- Anderson D** (1996) Wound management in small animal practice. *Companion Animal Practice* 18 (3): 115-128.
- Chirife J, Scarmato GA, Herszage L** (1982) Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. *Lancet* 1: 560-561.
- Cornell K** (2012) Wound healing. In: Tobias KM, Johnston SA (ed) *Veterinary surgery small animal*, 1st edn. Elsevier- Saunders, Missouri. pp: 125-135.
- Çelimli N** (2004) Wound management using honey in veterinary practice. *Veteriner Cerrahi Derg* 10 (3-4): 73-77.
- Dernell WS** (2006) Initial wound management. *Vet Clin Small Anim* 36: 713-738.
- Dyson M** (1997) Advances in wound healing physiology: the comparative perspective (*Avances en fisiologia de la*

curación de heridas: perspectiva). *Vet Dermatol* 8: 227–233.

**Fossum TW** (2018) Surgery of the integumentary system. In: Fossum TW (ed) *Small Animal Surgery*, 5th edn. Elsevier, Philadelphia. pp: 179-955.

**Güzel Ö, Yıldar E, Erdikmen DO** (2011) Medikal ozon ve veteriner cerrahide kullanımı. *IU Vet Fak Derg* 37 (2): 177-184.

**Hosgood G** (2012) Open wounds. In: Tobias KM, Johnston SA (eds): *Veterinary Surgery Small Animal*, 1st edn. St. Louis: Elsevier. pp 1210-1220.

**Liptak JM** (1997) An overview of the topical management of wounds. *Aust Vet J* 75: 6: 408-413.

**MacPhail CM** (2013) Biomaterials, suturing and hemostasis. In: Fossum TW (ed) *Small animal surgery*, 4th edn. Elsevier, Philadelphia, PA. pp: 64-84.

**Mathews KA, Binnington AG** (2002) Wound management using honey. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian -North American Edition-* 24: 1: 53-60.

**Mickelson MA, Mans C, Colopy SA.** (2016) Principles of wound management and wound healing in exotics pets. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 19(1): 33-53.

**Miller CG** (2003) Bandages and drains. In: Slatter DH (ed) *Textbook of Small Animal Surgery*, 3rd edn. Saunders, Philadelphia. pp: 244-250.

**Molon P, Rhodes T** (2015) Honey: A biologic wound dressing. *Wounds* 27(6): 141-151.

**Ovington LG** (2007) Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology* 25: 33-38.

**Pavletic MM** (2010) Basic principles of wound management. In: Pavletic MM (ed): *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*, 4th edn. Wiley-Blackwell, Massachusetts. pp: 33-53.

**Pavletic MM** (2018) Concept of Moist Wound Healing MWH. In: Pavletic MM (ed) *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*, 4th edn. Wiley, Hoboken, USA. Pp: 67-78.

**Preifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC** (2015) Current wound healing procedures and potential care. *Mater Sci Eng C* 48: 651-662.

**Selçukbiricik H, Hayat A, Eraslan H, Tursun G** (2004) Management of chronic wound in a dog with tissupor wound pad: Case report. *YYÜ Vet Fak Derg* 15 (1-2): 75-77.

**Singh S, Young A, McNaught CE** (2017) The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)* 35: 9: 473-477.

**Vowden K, Vowden P** (2017) Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* 35: 9: 489-494.

**Williams JM** (1999) Open wound management. In: Fowler D, Williams JM (eds) *BSAVA Manual of canine and feline wound management and reconstruction*, 1st edition. BSAVA, Cheltenham, UK. pp: 37-47.

**Yavru N, Koç Y, Arıcan M, Doğruer Y** (1992) The effect of granulated sugar application on healing in the treatment of infected wounds and abscesses. *SU Vet Fak Derg* 8(1): 64-68.



## Benzimidazollerin Antineoplastik Madde Olarak Etkinliği

Mahmut ŞAHİN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri, Türkiye

\*Corresponding Author's E-Mail: mahmutvet@gmail.com

### Özet

Dünyada ve Türkiye’de kanser en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların ciddi yan etkilerinin olması ve pek çok kanser türünde halen istenilen tedavi başarısına ulaşılamaması, kanser ile mücadelede bilim insanlarını yeni stratejiler ve tedavi yolları bulmaya zorlamaktadır. Bu sebeple halen ruhsatlı olarak kullanımda olan ilaçların anti-kanser etkilerinin araştırılması ve bu türden etkilerinin ortaya konulması hem yeni ilaç geliştirme sürecindeki zamandan ve hem de yüksek maliyeti azaltmak bakımından önem arz etmektedir. Bunun yanı sıra halen kullanımda olan ruhsatlandırılmış ilaçların biyogüvenlikleri ve hastalar üzerindeki yan etkilerinin uzun yıllardır incelenmiş olması sebebiyle bu tür etken maddelerin anti-kanser ilacı olarak kullanılması durumunda konvansiyonel anti-kanser ilaçların hastalar üzerindeki ciddi yan etkilerinden kaçınılması da kuvvetle muhtemeldir.

Received 13 February 2020  
Received in revised form 20 March 2020  
Accepted 6 April 2020

### Anahtar kelimeler:

Benzimidazol, kanser, tedavi.

Cite this article: Şahin M (2020) Benzimidazollerin Antineoplastik Madde Olarak Etkinliği. Turk Vet J, 2(1):29-35.

### The Effectiveness of Benzimidazoles as Antineoplastic Material

#### Abstract

Cancer is among the most important health problems in Turkey and in the world. Medications used to treat cancer have serious adverse effects on both animals and humans. The desired therapeutic success in the fight against cancer has not been achieved yet. For this reason, it is crucial to investigate the effects of currently licensed drugs as anti-cancer drug and to define as an alternative treatment for cancer to decrease the high cost and time length in the process of drug development. In addition, since currently used licensed medicines have been studied due to their biosafety and their side effects on the patients, avoidance of the use of such active substances as conventional anti-cancer drugs on patients is extremely likely.

**Key words:** Benzimidazole, cancer, treatment.

### Giriş

Kanser, büyük bölümü edinsel olarak kendiliğinden veya çevreden kaynaklanan travmalara bağlı olarak gerçekleşen DNA mutasyonlarının neden olduğu genetik temelli bir hastalıktır (Kumar, 2013). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ise kanser, invazyon ve metastaz yapabilen kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tarif edilmekte ve ölüm sebepleri arasında en yaygın sağlık problemi olarak bildirilmektedir (2020). Erkeklerde akciğer, prostat, kolon, mide ve karaciğer kanserleri, kadınlarda ise meme, kolon, akciğer, serviks ve mide kanserleri en yaygın kanser türleri arasında yer almaktadır. Her yıl dünyada 8,2 milyon insan kanser sebebiyle ölmekte ve bu sayı dünya çapında bir yılda olan tüm ölüm vakalarının tahminen %13’üne denk gelmektedir. Yine WHO verilerine göre gelecek 20 yıl içerisinde yeni kanser vakalarında %70 oranında bir artış olacağı öngörülmektedir (Bray F ve ark, 2018).

Günümüzde kullanılmakta olan klasik antineoplastik ilaçların ciddi yan etkilerinin bulunması, kanser tedavileri için yeni ilaç geliştirme çalışmalarına süreklilik kazandırmaktadır. Son yıllarda kullanımda olan mevcut ilaçların bir kısmının muhtemel anti-kanser etkinliklerinin bulunduğu ortaya konması ile birlikte bu ilaçların etkinliklerinin yeniden değerlendirilmesi, kanser ilacı geliştirme faaliyetleri arasında yer almaya başlamıştır (Pantziarka P ve ark, 2014). Bu derlemede mevcutta anthelmintik olarak kullanılan benzimidazol grubu ilaçların antineoplastik etkilerine yönelik literatür taraması yapılarak, benzimidazollerin anti kanser etkinliklerine yönelik bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

### ***Benzimidazollerin etki mekanizması, toksisitesi, metabolizasyonu ve etkinliği***

Benzimidazoller, kimyasal yapılarına eklenen imidazol ve benzen grupları taşıyan heterosiklik aromatik ve organik yapıdadırlar (Barker H ve ark, 1960). 1961 yılında tiyabendazolün gastrointestinal parazitlere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olduğunun keşfedilmesi ile birlikte kullanımı hızla artmıştır. Takip eden yıllarda ise tiyabendazole ek olarak parabendazol, kambendazol, mebendazol, oksibendazol ve albendazol gibi diğer benzimidazollerin üretimiyle benzimidazol grubu olarak antihelmintik ilaçların kullanımında çeşitlilik kazanılmıştır (McKellar Q ve Scott E, 1990).

Günümüzde benzimidazoller insan ve hayvanlarda helmint ve funguslara karşı kullanılmakla birlikte insanlarda peptik ülser tedavisinde de kullanılmaktadırlar. Benzimidazollerin insan ve hayvanlarda kullanımı oldukça yaygındır (Laryea D ve ark, 2010).

#### ***Benzimidazollerin etki mekanizması***

Benzimidazollerin hücresel boyutta mitokondride oksidatif fosforilasyonu bozmak, enerji rezervlerini tüketmek ve hücrede oksidatif stresi artırmak (Bogan J ve Marriner S, 1980) gibi pek çok etkisi olmakla birlikte en temel etkisi tubulin proteini üzerine olmandır (Schmit JM, 2013). Tubulin proteini, hücre iskeletini oluşturan ve hücre içi organelleri bir bütün halinde tutmaya yarayan temel bir protein olup, hücre büyümesinde ve hücre bölünmesinde hücre canlılığı için hayati rolleri de bulunmaktadır (Soengas MS ve Lowe SW, 2003; Zhuang L ve ark, 2007).

Tubulin proteinini oluşturacak mikrotübüllerin polimerizasyonu ve bu mikrotübüllerin bir araya gelmesi neticesinde tubulin oluşmaktadır. Benzimidazoller mikrotübüllerin polimerize olabilecekleri uçlara bağlanarak mikrotübüllerin polimerizasyonunu bozmakta ve sonuç olarak tubulin oluşumunu inhibe etmektedirler (Bai RY ve ark, 2011; Doudican NA ve ark, 2013; Spagnuolo PA ve ark, 2010). Tubulin yapısı bozulduğunda ise parazite ait bölünme aşamasındaki hücrelerin mitoz iplikçikleri kopmakta ve parazit hücre bölünmesini gerçekleştirememektedir (Clément M-J ve ark, 2008). Bu durum parazit hücrelerinin G2/M fazı arasında kalmasına ve parazit hücrelerinin mitoz girememesine sebep olarak bu aşamada kalan hücrelerin apoptozuyla sonuçlanmaktadır (Schmit JM, 2013).

#### ***Benzimidazollerin farmakokinetiği***

Benzimidazol grubu ilaçların tamamının suda çözünürlüğü düşüktür. Benzimidazoller, sığırlarda

oral olarak uygulanmasını takiben plazmaya ancak 4. saatte ulaşmaktadırlar. İnsanlarda ve kedi-köpek gibi küçük hayvanlarda, ruminantlara oranla mide hacimlerinin ve gastro-enterik içeriğin hacim olarak az olması sebebiyle benzimidazollerin emilimi biraz daha yavaştır. Canlı türüne ve benzimidazol içeriğine göre değişmekle birlikte benzimidazoller oral yoldan verilmelerini takiben 24-30 saat arasında pik plazma düzeyine ulaşırlar (Lanusse CE ve Prichard RK, 1993). Benzimidazollerin yağlı diyetler ile birlikte kullandıklarında oral emilimlerinin arttığı bildirilmiştir (Bekhti A ve Pirote J, 1987). Mebendazolün sebze yağları ile formüle edilmesi (Garcia-Rodriguez JJ ve ark, 2011; Liu CS ve ark, 2012), kristal yapısının değiştirilmesi (Chiba Y ve ark, 1991) ve PEGilasyonu [polietilenglikol ile bağlanması] (Bekhti A ve Pirote J, 1987) ile düşük olan biyoyararlanımının artırılabilceği bildirilmiştir.

H2 reseptör antagonisti olan ve anti-kanser etkileri bulunan simetidin ile albendazol ve mebendazol birlikte kullanılabilirler. Simetidin ile mebendazolün kombine kullanımlarında mebendazolün plazma konsantrasyonunun yükseldiği bilinmektedir (Deva S ve Jameson M, 2012). Ayrıca simetidinin kanser önleyici etkileri olabileceği de bildirilmektedir (Dayan A, 2003).

Kullanımı oldukça yaygın olan mebendazol ve albendazol de dahil olmak üzere hemen hemen tüm benzimidazol türlerinin oral yol ile verilmesinde ilk geçiş etkisine maruz kaldığı bilinmektedir (Coyne CP ve ark, 2018; Dayan A, 2003; Sanchez S ve ark, 2000). Benzimidazollerin ilk geçiş etkisi ile etkinlik kayıpları benzimidazol türüne göre değişmekle birlikte bu oran %2 ile %60 arasında değişebilmektedir (Spasov A ve ark, 2002).

Benzimidazol grubu ilaçlar oral alımı takiben ruminantlarda rumenin akuöz ortamında hızlıca emilirler. Oral yoldan alınmasını takiben 4 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşırlar (Lanusse CE ve Prichard RK, 1993).

Benzimidazollerin metabolizasyonu karaciğerde gerçekleşmektedir. Karaciğer metabolik enzimlerinden sitokrom P450 (CYP) enzim ailesi, benzimidazollerin faz 1 ve faz 2 metabolizasyonu gerçekleştiren enzimlerdir (Velık J ve ark, 2004).

Mebendazolün karaciğerde geçirdiği metabolizasyonu konjugasyon ile gerçekleşmektedir. Mebendazol metabolizasyonu sonucunda etkinliğini kaybeder ve inaktif metabolitlerine dönüşür. Mebendazol metabolizasyonu sonucunda mebendazolün birincil metaboliti olarak, 2-amino-5-benzoylbenzimidazole aktif metaboliti meydana gelmektedir. Yanı sıra

oluşan hidroksi ve hidrosiamino metabolitleri ise inaktiftirler (U.S. National Library of Medicine P, 2020).

Mebendazolün karaciğer enzimleri ile metabolizasyonu normal karaciğer fonksiyonu olan kişilerde 2,5-5 saat arasında sürmektedir. Karaciğer fonksiyonları gerilemiş kişilerde bu sürenin 35 saate kadar yükseldiği bildirilmiştir (Drugbank, 2020). Benzimidazollerin başlıca atılım yolu ise idrarla atılım şeklindedir (Dayan A, 2003).

#### *Benzimidazollerin toksisitesi*

Benzimidazollerin hayvanlar ve insanlardaki kullanım güvenliği ve toksisitesi hakkında geçmişten günümüze kadar çalışılmıştır. Uzun yıllardır yapılan toksiste ve sağaltım güvenliği çalışmaları sonucunda benzimidazollerin grup olarak, terapötik dozlarında iyi tolere edilebilir ve minimal toksisiteye sahip ilaçlar olduğu bildirilmektedir (Lanusse CE ve Prichard RK, 1993).

Albendazolün toksik dozlarında köpek, kedi ve insanlarda kemik iliği toksisitesi ve buna bağlı olarak gelişen lökopeni ve anemiye yol açtığı bilinmektedir. Albendazol kullanılarak 6 aylık süre ile ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada günlük 30 mg/kg dozundan daha yüksek dozdaki kullanımında, vücut ağırlığında azalma, karaciğer büyümesi ve kemik iliği hipoplazisi bildirilmiştir (Gary AT ve ark, 2004).

Fenbendazolün ise günlük 250 mg/kg dozda 30 günlük kullanımında veya 90 gün boyunca 125 mg/kg dozunda her hangi bir yan etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Düwel D, 1977). Ratlarda fenbendazolün oral öldürücü doz 50 (ÖD50) dozunun 500 mg/kg dan yüksek olduğu bilinmektedir (Van den Bossche H ve ark, 1982).

Benzimidazollerin içerisinde mebendazol, insanlarda uzun süreli hidatid kist tedavisinde kullanılan başlıca anthelmintik olarak yer almaktadır (Reute S ve ark, 2000). İnsanlarda ekinokokkozisin uzun süreli tedavisinde genel olarak hastaların mebendazolü iyi tolere ettikleri; 17 hasta üzerinde 24 ay süresince yapılan bir çalışmada sadece 3 hastada reverzibl alopesi, dikkat dağınıklığı ve fiziksel güç düşüklüğü gibi yan etkilerin çıktığı, diğer hastaların ise tedaviye devam ettikleri bulguları ile ortaya konulmuştur (Hirschberg E ve ark, 1957).

Benzimidazollerin ruminantlarda gebeliğin ilk üç haftalık sürecinde uygulanması halinde teratojenik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Piercy D ve ark, 1979). Benzimidazollerin süt veren ineklerde sütle atılım düzeyi hakkında yapılan bir çalışmada

albendazol ve okfendazol, oral ve subkutan olarak iki farklı yolla verilmiş ve sütte bıraktıkları kalıntı düzeyleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda her iki benzimidazol türünün de sütteki kalıntı düzeyinin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından izin verilen 0,6 µg/ml düzeyini geçmediği bildirilmiştir (Moreno L ve ark, 2005).

#### *Benzimidazollerin anti-kanser etkinlikleri*

Benzimidazollerin anti-kanser etkileri hakkında yapılan literatür taramasında pek çok kanser türü üzerinde yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak mebendazol tek başına kullanılarak etkinliği konvansiyonel anti-kanser ilaçlar ile mukayese edilmiştir.

Benzimidazollerin anti-kanser etkileri ilk kez 1957 yılında bir benzimidazol türevi olan amino-metil benzimidazol molekülüne 2 farklı kloroetil bileşeni eklendiğinde farelerde meme adenokarsinomu ve sarkomunun inhibe edildiğinin gösterilmesi ile ortaya çıkarılmıştır (Habib N ve Aboulwafa OM, 1982). 1980 li yıllarda ise farklı benzimidazol türleri alkilleyici maddeler ile kombine edilerek yeni elde edilen alkilenmiş benzimidazol türlerinin anti-kanser etkileri olup olmadığı denenmiş ve alkilenmiş benzotiazolün lenfositik lösemide etkinliği olduğu bildirilmiştir (Holden HE ve ark, 1980; Ibrahim E-SA ve ark, 1980).

Uzun yıllar boyunca ve çok sayıda araştırmacı tarafından çeşitli benzimidazol türlerinin anti-kanser etkinliklerinin hücresel düzeyde mekanizması/mekanizmaları tam anlamı ile izah edilemese bile bu çalışmalar sonucunda benzimidazollerin anti-kanser etkilerinin canlı türü ve kanser çeşidi ile değil, kullanılan benzimidazol bileşiğinin dozuna ve uygulama süresine bağlı olduğu anlaşılmıştır (Schmit JM, 2013). Ancak 1980' li yılların başlarında Holden ve arkadaşları insan lenfosit hücre kültürleri üzerinde mebendazol, parabendazol, kambendazol ve fenbendazolün mitozu durdurarak hücre büyümesini inhibe ettiğini, tiyabendazol ve oksfendazolün ise böyle bir etkisinin olmadığını (Gao P ve ark, 2008) ortaya çıkarmaları ile birlikte benzimidazollerin hücresel boyuttaki etki mekanizmasına açıklık getirilebilmiştir. Ayrıca fenbendazolün anti-kanser etkilerinin olabileceği kazara anlaşılmıştır. Bu durum fenbendazol verilen deney hayvanlarının yanlılıkla karıştırılarak insan lenfoma hücre zenografklarının bu deneklere verilmesi ve sonuçta bu ratlarda deneysel insan lenfoma kanserinin başlatılamaması ile anlaşılmıştır (Nygren P ve ark, 2013).

Mebendazolün de aralarında bulunduğu 10 farklı benzimidazol türevi ilaç, kemorezistant metastatik melanoma kanseri üzerinde denenmiş ve çalışmada

kullanılan 10 benzimidazol türevi içerisinde öncelikle mebendazol olmak üzere albendazol, fenbendazol ve oksibendazol tubulin inhibisyonu bakımından etkin bulunmuşlardır. Bu çalışmaya araştırmacılar tarafından farmakokinetik üstünlükleri bakımından mebendazol ile devam edilmiştir. Bu çalışmada inhibitör konsantrasyon 50 (IC50) 0,32  $\mu$ M konsantrasyonda mebendazol uygulandığında kemorezistans melanoma hücrelerinde apoptoz artmasına karşın melanositlerde herhangi bir etki görülmemiştir. Tubulin depolimerizasyonu sonucu kanserli hücrelerde meydana gelen apoptozun hücresel düzeydeki mekanizmasını açıklamak için antiapoptotik bir faktör olan Bcl-2 fosforilasyon seviyeleri mebendazol uygulanmasını takiben ölçülmüş ve melanosit hücrelerinde fosforile Bcl-2 seviyesinde değişiklik tespit edilemezken kanserli hücrelerde fosforile haldeki Bcl-2 düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Böylelikle mebendazol uygulanan melanoma kanser hücrelerinde tubulin inhibisyonu sonucu hücrelerin apoptoze uğradıkları ve ayrıca mebendazolün antiapoptotik faktörlerden biri olan Bcl-2 yi fosforilasyon düzeyini düşürerek kanserli hücrelerin apoptozten kaçmalarını da engellediği açıklanmıştır. Bu çalışmada mebendazol uygulanan melanositlerde ise Bcl-2 düzeyleri kontrol grubuna göre dikkat çekici oranda düşüş göstermiştir (Doudican N ve ark, 2008).

2002 yılında yapılan bir çalışmada insan akciğer kanseri hücreleri üzerinde mebendazolün anti-kanser etkinliği hem in-vitro hem de in-vivo olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda mebendazolün konsantrasyon ve zamana bağlı olarak IC50 0,16  $\mu$ M konsantrasyonda mikrotübül inhibisyonu yapması sebebiyle kanserli hücrelerde hücre bölünmesini, hücre siklusunun G2/M geçiş fazında durdurduğu ve hücre bölünmesini tamamlayamayan kanser hücrelerinin apoptozu uğradığı in-vitro olarak gösterilmiştir. Daha da önemlisi bu çalışmada mebendazol 1  $\mu$ M konsantrasyonda; yani neredeyse kanserli hücrelerde mikrotübülün inhibisyonu yaptığı konsantrasyonun yaklaşık 6 katı yüksek bir konsantrasyonda dahi insan umbilikal ven endoteli hücrelerinde (HUVECs) ve insan fibroblast hücrelerinde (W138) herhangi bir etki göstermemiş olmasıdır. Aynı çalışmada akciğer kanser hücresi zenografları farelere verilerek kanserli hücrelerin metastaz yetenekleri fareler üzerinde in-vivo olarak test edilmiş ve sonuçta oral mebendazol uygulanan farelerdeki metastazın kontrol grubuna oranla 5 kat daha düşük seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Yine bu çalışmada in-vivo olarak neovaskülarizasyon düzeyinde test edilmiş ve mebendazol uygulanan gruptaki deneklerde

apoptozu uğrayan endotel hücreleri sebebiyle anjiyogenezin baskılandığı tespit edilmiştir (Mukhopadhyay T ve ark, 2002).

Mebendazolün küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri üzerindeki anti-kanser etkilerini incelemek için Sasaki ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mebendazolün anti-kanser etkinliği hem in-vitro ve hem de in-vivo çalışmalar ile izah edilmiştir. Bu çalışmada kanserli hücreler üzerinde mebendazolün tubulin proteini polimerizasyonunu bozması (tubulin depolimerizasyonu) sonucunda mitoz içiciklerinin normal formasyonlarının bozulduğu ve kanserli hücrelerde mitozun inhibe edildiği in-vitro olarak gösterilmiştir. Mitoz bölünmenin inhibe edilmesi sebebiyle kanserli hücreler apoptozu uğrayarak hücre ölümü gerçekleşmiştir. Bu çalışmada mebendazolün in-vivo etkinliği bir anti-kanser ilaç olarak halen kanser tedavisinde kullanılmakta olan paklitaksel ile karşılaştırılmıştır. Oral olarak mebendazol verilen farelerde çok kuvvetli anti tümör etkiler ve kanserli hücrelerin metastazında inhibisyon tespit edilmiş ve bu esnada paklitaksel ile yapılan denemede gözlenen hiçbir yan etki ortaya çıkmamıştır (Sasaki J-i ve ark, 2002).

2008 yılında insan adrenokortikal karsinomasında mebendazolün in-vitro ve in-vivo etkinliği test edilmiştir. İki kanser hattı hücre kültürü ve 3 farklı normal fibroblast hücre kültürüne (H295R, SW-13 ve WI-38) farklı konsantrasyonlarda mebendazol aynı anda uygulanmış ve adrenokortikal karsinoma hücre kültürlerinde IC50 0,23  $\mu$ M konsantrasyonda hücre bölünmesi ve büyümesi inhibe olurken, normal fibroblast hücre kültürlerinde IC50 0,27  $\mu$ M konsantrasyonda dahi her hangi bir etki gözlenmemiştir. İn-vivo denemede ise 1  $\mu$ M konsantrasyonda mebendazol uygulanan deneklerde yaklaşık 20 günde tüm tümör hücrelerinin öldüğü gözlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında in-vitro ve in-vivo koşullarda mebendazolün kanserli hücrelerde apoptozu indüklediğini, in-vitro olarak kanserli hücrelerin invazyon ve migrasyon yeteneklerini inhibe ettiğini ve in-vivo koşullarda metastazın engellendiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar temelde mebendazolün kanserli hücrelerde oluşturduğu tubulin depolarizasyonu sonucunda hücre bölünmesinin engellenmesi ve hücre siklusunda mitoz aşaması sekteye uğrayan hücrelerin apoptoz yoluyla ölmelerine dayandırmışlardır (Martarelli D ve ark, 2008).

Mebendazolün antiapoptotik faktörler üzerindeki in-vivo etkinliği ve bu etkinliğin bir anti-kanser ajanı olarak kullanılan temozolomid ile mukayesesi için atimik fareler kullanılarak insan melanoma

zenografları ile bir hayvan modelleme çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada deneye katılan farelere insan melanoma zenografları verilmesini takiben deneklerin tamamında 3-5 mm tümör geliştikten sonra, günlük oral 1 mg/kg mebendazol verilen grup, günlük oral 2 mg/kg mebendazol verilen grup ve 5 gün boyunca günlük intraperitoneal 100 mg/kg temozolomid verilen grup olmak üzere gruplar oluşturulmuştur. Kontrol grubuna oranla 1 mg. dozda mebendazol uygulanan farelerde tümör kitlesinde % 83, 2 mg/kg konsantrasyonda mebendazol uygulanan farelerde ise tümör kitlesinde % 77' lik bir küçülme tespit edilmiştir. Temozolomid uygulanan grupta da aynı sonuçlar ortaya çıkmış olmakla birlikte bu çalışma ile insan melanoma kanser hücrelerinde temozolomid ile elde edilebilecek tümör regresyonunun herhangi bir yan etki ile karşılaşmadan daha düşük dozlarda mebendazol ile elde edilebileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada da Bcl-2 fosforilasyon düzeyinde tümör regresyonu ile uyumlu bir düşüş kaydedilmiştir (Doudican NA ve ark, 2013).

Mebendazol beyin dokusunda yeterli konsantrasyonlara ulaşabilmesi sebebiyle santral sinir sisteminin parazitik hastalıklarının tedavisinde de yaygın olarak güvenli bir şekilde kullanılan bir antiparaziter olduğu için, mebendazolün beyin tümörlerinde de kullanılıp kullanılmayacağı 2011 yılında araştırılmıştır. Glioblastoma multiforme gibi prognozu gayet kötü olan bir beyin tümöründe mebendazolün anti-neoplastik etkileri in-vitro ve in-vivo olarak denenmiştir. Bu çalışmada mebendazolün IC50 0,1-0,3 µM konsantrasyon aralığında glioblastoma multiforme kanser hücre hattında tubulin polimerizasyonunu azalttığı ve bunun sonucunda kanser hücre hattında sitotoksik etkiyle hücre ölümüne sebep olduğu doğrulanmıştır. Bu çalışmada ayrıca glioblastoma multiforme kanser hücre zenografları fare modellemesi yapılarak in-vivo deneme yapılmış ve kontrol grubuna oranla oral mebendazol uygulanan deneklerin hayatta kalma oranının % 63 oranında arttığı bildirilmiştir (Bai RY ve ark, 2011).

2013 yılında ise kolon kanseri tedavisi için kullanılabilen 1600 ilaç iki kolon kanser hücre hattında (HCT 116, RKO) anti-neoplastik etkileri bakımından her bir ilaç 10 µM konsantrasyonda incelenmiş ve çalışmaya alınan 1600 ilaçtan sadece 64'ünün kolon kanserinde kullanılmaya aday olduğu tespit edilmiştir. Kolon kanseri tedavisine aday olarak gösterilen bu 64 ilaç içerisinde benzimidazol grubundan mebendazol, albendazol, oksibendazol ve fenbendazol yer almıştır. Albendazolün mebendazole göre daha ciddi yan etkileri bulunması sebebiyle çalışmaya mebendazol

ile devam edilmiştir. Bu derlemede mebendazolün hücre proliferasyonu ve hücre bölünmesinde önemli görevleri bulunan kinazlara yüksek bir affinite ile bağlanarak kinaz inaktivasyonu oluşturduğu bildirilmiştir (Pinto LC ve ark, 2015).

Kemorezistant meme kanseri üzerinde gemsitabisin ve mebendazol, albendazol kombinasyonu kullanılarak yapılan bir çalışmada ise; mebendazolün tek başına kullanımında dahi gemsitabisinden daha etkin kanser hücre sitotoksitesi ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmada mebendazolün albendazole nispeten daha yüksek anti-kanser etkileri bulunduğu da izah edilmiştir. Mebendazolün 0,5 µM konsantrasyonda kanser hücre hattında hücre canlılığını % 63,1 oranında düşürdüğü bu çalışma ile bildirilmiştir (Coyne CP ve ark, 2018).

Kedi osteosarkoma hücreleri (DS 17) kullanılarak yapılan in-vitro bir çalışmada ise anti-kanser özellikleri bakımından fenbendazol, albendazol ve mebendazol kullanılmıştır. Her 3 benzimidazolün de tubulin depolimerizasyonu yaptığı, kanser hücrelerini hücre siklusunda G2-M fazında durdurarak apoptoze yol açtığı ve mikrotübül inhibisyonu yaptığı belirtilmiştir. Bu çalışmada fenbendazolün kanserli hücre proliferasyonunda ve tubulin depolimerizasyonunda grup içerisinde en az etkin, mebendazol ve albendazolün bu konularda birbirleri ile benzer profilde buldukları, albendazolün ise apoptozu artırmak konusunda grup içerisinde en az etkin benzimidazol türü olduğu bildirilmiştir (Schmit JM, 2013).

Mide kanser hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ise mebendazol, klasik anti-neoplastik ilaçlar ile anti-kanser etkileri bakımından mukayese edilmiştir. Bu çalışmada 3 farklı tip (gastrik tip adenokarsinoma hücresi ACP-01, diffuz tip gastrik adenokarsinoma hücresi ve ACP-03 intestinal tip kanser hücresi) gastrik kanser hücre kullanılmış ve her üç gastrik kanser hücresi üzerinde mebendazolün anti-proliferatif etkileri bulunduğu gösterilmekle birlikte; diffuz tip gastroadenokarsinoma hücreleri üzerinde mebendazolün IC50 0,39 µM konsantrasyonda oluşturduğu anti-proliferatif etkiyi, 5-FU (5-florourasil) IC50 19,71 µM , oksaliptatin IC50 8,85 µM, gemsitabin IC50 7,45 µM , irrinotesan IC50 29,83 µM , paklitaksel IC50 2,43 µM , sisplatin IC50 15,82 µM ve doksorubisin IC50 0,82 µM dozlarında ancak oluşturabilmişlerdir. Mebendazolün ayrıca 0,1-0,5-1,0 µM dozlarında ACP-01 kanser hücrelerinde mikrotübül yapısını bozduğu ve kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu engellediği belirtilmiştir (McKellar QveScott E, 1990).



Benzimidazol grubu ilaçlardan mebendazolün klinik öncesi çalışmaları yanı sıra kanser tedavisinde yeni tedavi protokolleri oluşturmak üzere klinik denemeleri de başlamıştır. Halen 2 farklı klinik deneme devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde John Hopkins Hastanesi ve New York Cohen Çocuk Hastalıkları Tıp Merkezi'nde sürdürülen her iki klinik denemede de beyinlerinde glioblastoma bulunan kanserli hastalar üzerinde mebendazol ile tedavi denemeleri sürdürülmektedir (Pantziarka P ve ark, 2014).

## Sonuç

Benzimidazol türü ilaçların anti-kanser etkileri ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalardan anlaşılacağı üzere; mebendazol ve albendazol başta olmak üzere benzimidazol grubu ilaçların tubulin inhibisyonu yaparak kanserli hücrelerin apoptoz yoluyla ölümlerini ve BCL-2 proteinini fosforilasyonunu düşürerek kanser hücrelerinin apoptozten kurtulmalarını engelledikleri yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır.

Düşük maliyeti, ülkemizde ve pek çok ülkede ruhsatlı olarak halen antiparaziter olarak kullanımda olması, farmakokinetik profili ve düşük toksisitesi dikkate alındığında benzimidazol grubu ilaçların kanser tedavisinde kullanılabileceği ve bu yönde yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

## Kaynaklar

**Bai RY, Staedtke V, Aprhys CM, Gallia GL, Riggins GJ** (2011) Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 13: 974-982.

**Barker H, Smyth R, Weissbach H, Toohey J, Ladd J, Volcani B** (1960) Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5, 6-dimethylbenzimidazole. *Journal of Biological Chemistry* 235: 480-488.

**Bekhti A, Protte J** (1987) Cimetidine increases serum mebendazole concentrations. *Br. J. clin. Pharmacol.* 24: 390-392.

**Bogan J, Marriner S** (1980) Analysis of benzimidazoles in body fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69: 422-423.

**Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A** (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68: 394-424.

**Chiba Y, Kohri N, Iseki K, Miyazaki K** (1991) Improvement of dissolution and bioavailability for mebendazole, an agent for human echinococcosis, by preparing solid dispersion with polyethylene glycol. *J Chemical pharmaceutical bulletin* 39: 2158-2160.

**Clément M-J, Rathinasamy K, Adjadj E, Toma F, Curmi PA, Panda D** (2008) Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin. *J Biochemistry* 47: 13016-13025.

**Coyne CP, Jones T, Bear R** (2018) Gemcitabine-(C4-amide)-[anti-HER2/neu] Anti-Neoplastic Cytotoxicity in Dual Combination with Mebendazole against Chemotherapeutic-Resistant Mammary Adenocarcinoma. *Journal of Clinical & Experimental Oncology* 02.

**Dayan A** (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *J Acta tropica* 86: 141-159.

**Deva S, Jameson M** (2012) Histamine type 2 receptor antagonists as adjuvant treatment for resected colorectal cancer. *J Cochrane Database of Systematic Reviews* 8: 1-30.

**Doudican N, Rodriguez A, Osman I, Orlow SJ** (2008) Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol Cancer Res* 6: 1308-1315.

**Doudican NA, Byron SA, Pollock PM, Orlow SJ** (2013) XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. *Anticancer Drugs* 24: 181-188.

**Drugbank** (2020) Mebendazole. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00643> (accessed 12.01.2020 2020).

**Düwel D** (1977) Fenbendazole. II. Biological properties and activity. *J Pesticide Science* 8: 550-555.

**Gao P, Dang CV, Watson J** (2008) Unexpected antitumorogenic effect of fenbendazole when combined with supplementary vitamins. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 47: 37-40.

**Garcia-Rodriguez JJ, de la Torre-Iglesias PM, Vegas-Sanchez MC, Torrado-Duran S, Bolas-Fernandez F, Torrado-Santiago S** (2011) Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: improved anthelmintic activity. *Int J Pharm* 403: 23-28.

**Gary AT, Kerl ME, Wiedmeyer CE, Turnquist SE, Cohn LA** (2004) Bone marrow hypoplasia associated with fenbendazole administration in a dog. *J Journal of the American Animal Hospital Association* 40: 224-229.

**Habib N, Aboulwafa OM** (1982) Potential alkylating agents derived from benzimidazole and benzothiazole. *J Journal of pharmaceutical sciences* 71: 991-993.

**Hirschberg E, Gellhorn A, Gump WS** (1957) Laboratory evaluation of a new nitrogen mustard, 2-[di-(2-chloroethyl) aminomethyl] benzimidazole, and of other 2-chloroethyl compounds. *J Cancer research* 17: 904-910.

**Holden HE, Crider PA, Wahrenburg MG** (1980) Mitotic arrest by benzimidazole analogs in human lymphocyte cultures. *J Environmental mutagenesis* 2: 67-73.

**Ibrahim E-SA, Omar A-MM, Khalil M** (1980) Novel potential anticancer agents derived from benzimidazole. *J Journal of pharmaceutical sciences* 69: 1348-1350.

- Kumar**, (2013) Neoplazi, In: Robins Temel Patoloji 9ed. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, pp 161-190.
- Lanusse CE, Prichard RK** (1993) Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Methabolism Rewievs* 25: 235-279.
- Laryea D, Gullbo J, Isaksson A, Larsson R, Nygren P** (2010) Characterization of the cytotoxic properties of the benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, in human tumour cell lines and primary cultures of patient tumour cells. *J Anti-Cancer Drugs* 21: 33-42.
- Liu CS, Zhang HB, Jiang B, Yao JM, Tao Y, Xue J, Wen AD** (2012) Enhanced bioavailability and cysticidal effect of three mebendazole-oil preparations in mice infected with secondary cysts of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 111: 1205-1211.
- Martarelli D, Pompei P, Baldi C, Mazzoni G** (2008) Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 61: 809-817.
- McKellar Q, Scott E** (1990) The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of veterinary pharmacology therapeutics* 13: 223-247.
- Moreno L, Imperiale F, Mottier L, Alvarez L, Lanusse CJ** (2005) Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows. 536: 91-99.
- Mukhopadhyay T, Sasaki J-i, Ramesh R, Roth JA** (2002) Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clinical cancer research* 8: 2963-2969.
- Nygren P, Fryknas M, Agerup B, Larsson R** (2013) Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139: 2133-2140.
- Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP** (2014) Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. *Ecancermedicallscience* 8: 443.
- Piercy D, Reynolds J, Brown PJB** (1979) Reproductive safety studies of oxfendazole in sheep and cattle. 135: 405-410.
- Pinto LC, Soares BM, Pinheiro JdJV, Riggins GJ, Assumpcao PP, Burbano RMR, Montenegro RC** (2015) The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. *J Toxicology in vitro* 29: 2038-2044.
- Reute S, Jensen B, Buttenschoen K, Kratzer W, Kern P** (2000) Bendimidazole treatment of alveolar echinococcosis. *The journal of biological chemistry* 46: 451-456.
- Sanchez S, Sallovitz J, Savio E, McKellar Q, Lanusse C** (2000) Comparative availability of two oral dosage forms of albendazole in dogs. *J The Veterinary Journal* 160: 153-156.
- Sasaki J-i, Ramesh R, Chada S, Gomyo Y, Roth JA, Mukhopadhyay T** (2002) The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest and Apoptosis by Depolymerizing Tubulin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 1201-1209.
- Schmit JM** (2013) in vitro anti-cancer effects of benzimidazoles on the canine osteosarcoma d17 cell line. Master of Science, University of Illinois.
- Soengas MS, Lowe SW** (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22: 3138-3151.
- Spagnuolo PA, Hu J, Hurren R, Wang X, Gronda M, Sukhai MA, Di Meo A, Boss J, Ashali I, Beheshti Zavareh R, Fine N, Simpson CD, Sharmeen S, Rottapel R, Schimmer AD** (2010) The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood* 115: 4824-4833.
- Spasov A, Smirnova L, Iezhitsa I, Sergeeva S, Ozerov A** (2002) Pharmacokinetics of benzimidazole derivatives. *J Voprosy meditsinskoi khimii* 48: 233-258.
- U.S. National Library of Medicine P** (2020) Mebendazole. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole>.
- Van den Bossche H, Rochette F, Hörig C**, (1982) Mebendazole and related anthelmintics, In: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp 67-128.
- Velik J, Baliharova V, Fink-Gremmels J, Bull S, Lamka J, Skálová L** (2004) Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *J Research in veterinary science* 76: 95-108.
- WHO** (2020) Cancer. [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1) (accessed 03.01.2020 2020).
- Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, Hersey P** (2007) Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Modern pathology* 20: 416.



## A Case of Lung Adenocarcinoma Determined by Perianesthetic Death in a Cat

Ahmet AYDOĞAN<sup>1</sup>, Huseyin Topcuoğlu<sup>2</sup>, Mehmet Haligur<sup>1</sup>, Uğur Cayanoglu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Çukurova University, Adana, Turkey

<sup>2</sup>Department of Pathology, Adana Veterinary Control Institute, Adana, Turkey



Aydoğan A 0000-0003-2504-8150

Topcuoğlu H 0000-0002-2338-3492

Haligur M 0000-0002-3987-9628

Cayanoglu U 0000-0002-0290-9109

\*Corresponding Author's E-Mail: aaydogan@cu.edu.tr

### Abstract

In this case report, a 5-year-old, female cat that died during the perianesthetic period and diagnosed with lung adenocarcinoma was described pathologically. The cat was brought to a private veterinary clinic for shaving and anesthetized. It experienced restlessness, vomiting, respiratory distress and died after a while of anesthetic administration. The necropsy was performed, and gross examination showed multicentric nodular formations ranging in diameter from 1 to 5 cm in lung. Microscopically, lepidic pattern of the adenocarcinoma of lung was diagnosed. To our knowledge, this is a unique case in terms of both related and coexisted rare problems (perianesthetic death and lung carcinoma) in a cat.

Received 25 March 2020

Received in revised form 16 May 2020

Accepted 20 June 2020

### Key words:

Lung adenocarcinoma, perianesthetic death, pathology, cat.

**Cite this article:** Aydoğan A, Topcuoğlu H, Haligur M, Cayanoglu U (2020) A Case of Lung Adenocarcinoma Determined by Perianesthetic Death in a Cat. Turk Vet J, 2(1):36-38.

### Bir Kedide Perianestezik Ölüm ile Saptanan Akciğer Adenokarsinomu Olgusu

#### Özet

Bu olgu sunumunda, perianestezik dönemde ölen ve akciğer adenokarsinomu tanısı alan 5 yaşında dişi bir kedi patolojik olarak değerlendirildi. Kedi genel anestezi uygulamasıyla tıraş edilmek için özel bir veteriner kliniğine getirildi. Anestezi uygulamasından kısa bir süre sonra hayvanda huzursuzluk, kusma, solunum sıkıntısı ve bu bulguların sonunda ölüm gözlemlendi. Nekropside, akciğerlerde çapları 1 ile 5 cm arasında değişen, multisentrik yerleşimli nodüler oluşumlar görüldü. Mikroskopik olarak, akciğer adenokarsinomu (lepidik patern) teşhis edildi. Sunulan olgu, bir kedide perianestezik ölüm ile akciğer karsinomunun bir arada görülmesinden dolayı patolojik değerlendirmeye ve rapor edilmeye uygun görüldü.

**Anahtar kelimeler:** Akciğer adenokarsinomu, perianestezik ölüm, patoloji, kedi.

### Introduction

Lung cancer is one of the most important causes of death in human, especially in developed countries. Primary lung tumors are very rare in domestic animals and more often seen in older cats and dogs. Adenocarcinoma is the most common histologic type of lung cancer (Devesa et al. 2005). Similar to the classification made in humans, animals have 5 types of lung carcinoma. These are lepidic, papillary, acinar, squamous, and adenosquamous types (Wilson 2017).

Deaths of dogs and cats in perianesthetic period may occur due to anesthetic and surgical complications and preexisting disease may become one of the factors causing death. Such cases are stressful and troubled for both veterinarians and animal owners (De Lay 2016).

This case report describes a cat that died during the perianesthetic period and diagnosed pathologically with lung adenocarcinoma.

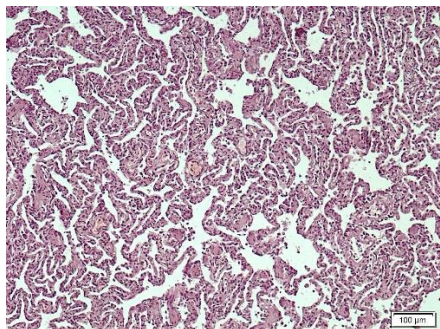
### Case report

In this case report, a spayed 5-year-old, female cat brought to a private veterinary clinic for shaving and died perianesthetically. Systemic necropsy of the cat was performed in the department of pathology. Tissue samples taken for histopathological examination were fixed in 10% formalin solution and were embedded in paraffin after routine procedures. Microtome sections (5 µm) from paraffin blocks were used to stain with Hematoxylin and Eosin (H&E) staining technique. Prepared slides were evaluated under light microscope.

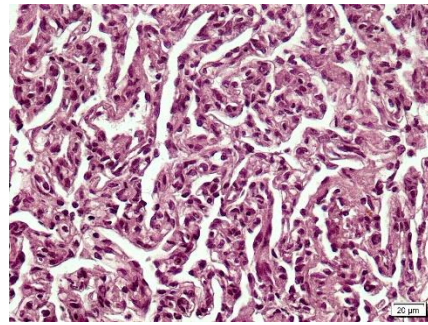
It is reported that the owner of the cat brought her to a private veterinary clinic for the purpose of shaving. Then it was planned to shave under anesthesia and for this purpose, general anesthetic medicine was applied. The cat experienced restlessness, vomiting, respiratory distress and died after a while of anesthetic administration. Animal owner reported that the cat had no previous respiratory and related problems.

During the necropsy, multicentric nodular formations ranging in diameter from 1 to 5 cm were seen in the lung. These nodules were grayish-white in color and moderate hard in touch. The cut surfaces of the nodules were homogeneously and also greyish-white in color. No metastatic focus was found in the body. The liver was swollen, soft to touch with blunt edges and also grayish-white foci were detected throughout the liver. In addition, mucosal thickening of intestines with hyperemia was observed.

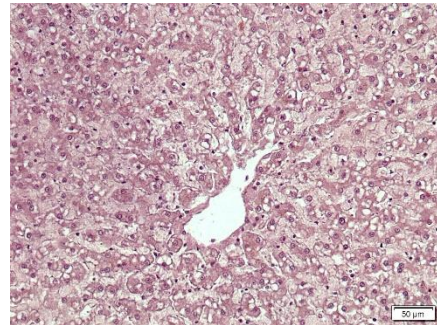
Microscopically, lepidic pattern of the adenocarcinoma was observed in the lung. This pattern showed alveolar wall thickening because of cuboidal or columnar pleomorphic tumor cell proliferation (Figure 1 and 2). Small papillary projections towards the alveolar lumen were also noted in some areas. Anisocytosis and anisonucleosis were prominent in tumor cells. There was no any evidence of metastasis and vascular spreading. In the liver, it was seen that the classical lobule structure was disrupted due to coagulation necrosis, degenerative changes and congestion (Figure 3). The hepatocytes were swollen and contained varying size of droplets, and sinusoidal dilatation was also observed together with hemosiderin-laden macrophages. In intestines, diffuse mononuclear cell infiltrations with prominent hyperemia were seen in lamina propria. In addition, in some areas, loss of villi was also detected.



**Figure 1.** Microscopic appearance of lung adenocarcinoma, H&E, Bar=100  $\mu$ m



**Figure 2.** Lepidic pattern of adenocarcinoma, alveolar wall thickening by atypical tumor cell proliferation, H&E, Bar=20  $\mu$ m.



**Figure 3.** Degenerative changes in the liver, H&E, Bar=50  $\mu$ m.

## Discussion and conclusion

Cases of animals that die as perianesthesia are increasing day by day and are sent to veterinary diagnostic laboratories for necropsy. In these cases, preexisting health problems or diseases may conduce to mortality. Thus, in a retrospective study of which evaluated necropsy findings in 221 animals with perianesthetic death, preexisting diseases or health problems were demonstrated in most animals. However, surgical or anesthesia-related complications were seen in a much lower rate of cases (De Lay 2016). In the present case, an anesthetized 5-year-old, female cat that referred to a private veterinary clinic due to shaving was showed restlessness, vomiting, respiratory distress and died after a while of anesthetic administration. Gross pathology and histopathology showed pulmonary carcinoma, liver disorders (such as necrosis, degeneration and congestion) and chronic enteritis. In accordance with the literature, it was determined that the cat died after anesthesia because of health problems rather than anesthesia-related complication.

In cats, primary lung cancers are very rare and show a very aggressive spread or rapid progression even more than dogs. Metastases occur in approximately 75-80% of cases and are observed generally in bronchial lymph nodes and intrathoracic region; rarely in bones of the feet and digits (Costa et al. 2012; Thrift et al. 2017; Wilson 2017). In addition,

in a case, invasive spreading of pulmonary adenocarcinoma in the esophagus and heart also detected in a cat (Ambrosini et al. 2018). However, in our case, there was no any evidence of distant metastasis grossly and histopathologically.

Generally, histologic patterns of pulmonary carcinoma include lepidic, papillary, acinar, squamous, and adenosquamous types. Separate lepidic and papillary growth of lung carcinoma is seen approximately 25% compared to other types in cats (Wilson 2017). In the lepidic type, alveolar wall thickening by pleomorphic alveolar type 2 pneumocyte-like cell proliferations is prominent histopathologic finding (Zhang et al. 2013; Wilson 2017). In this case, alveolar wall thickening due to atypical tumor cell proliferations together with micropapillary projections towards the alveolar lumen in some areas were observed and determined as lepidic type of pulmonary carcinoma.

In conclusion, this is a unique case in terms of both related and coexisted rare problems (perianesthetic death and lung carcinoma) in a cat. In this regard, this report may help veterinary clinicians and animal owners get at the most likely diagnosis and treatments.

## References

**Ambrosini** YM, Johnson KA, Matthews M, Sato AF (2018) Unusual invasion of primary pulmonary adenocarcinoma in a cat. *JFMS Open Reports* 4 (2): 2055116918810897.

**Costa** SD, Yoon BI, Kim DY, Motsinger-Reif AA, Williams M, Kim Y (2012) Morphologic and Molecular Analysis of 39 Spontaneous Feline Pulmonary Carcinomas. *Vet Pathol* 49 (6): 971-978.

**De Lay** J (2016) Perianesthetic Mortality in Domestic Animals: A Retrospective Study of Postmortem Lesions and Review of Autopsy Procedures. *Vet Pathol* 53 (5): 1078-1086.

**Devesa** SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM (2005) International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 117: 294–299.

**Thrift** E, Greenwell C, Turner AL, Harvey AM, Maher D, Malik R (2017) Metastatic pulmonary carcinomas in cats (feline lung–digit syndrome): further variations on a theme. *JFMS Open Reports* 3 (1): 2055116917691069.

**Wilson** DW (2017) Tumors of the Respiratory Tract. In: Meuten, DJ (ed) *Tumors in Domestic Animals*, 5th edn. John Wiley & Sons, Iowa, pp: 467-498.

**Zhang** J, Wu J, Tan Q, Zhu L, Gao W (2013) Why Do Pathological Stage IA Lung Adenocarcinomas Vary from Prognosis? A Clinicopathologic Study of 176 Patients with Pathological Stage IA Lung Adenocarcinoma Based on the IASLC/ATS/ERS Classification. *J Thorac Oncol* 8 (9): 1196-1202.