

Proje Türü : Bağımsız
Proje No :13B3330017
Proje Yöneticisi :Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR
Proje Başlığı : Prosesus Vajinalis Obliterasyonunda Rol Oynayan Apoptotik Ve Antiapoptotik
Gen Düzeyleri

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

01.02.2017

Proje Yöneticisi

Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR

İmza

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Proje Başlığı

Prosesus Vajinalis Obliterasyonunda Rol Oynayan Apoptotik Ve Antiapoptotik Gen Düzeyleri

Proje Yürütücüsünün İsmi

Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR

Yardımcı Araştırmacıların İsmi

Yrd. Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ

Gönül Fatma KÜÇÜK

Uzm. Dr. Ufuk ATEŞ

Prof. Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK

Yrd. Doç. Dr. Deniz BİLLUR

Proje Numarası

13B3330017

Başlama Tarihi

29.11.2013

Bitiş Tarihi

29.11.2016

Rapor Tarihi

15.01.2017

RAPOR FORMATI

Bilgisayarda 12 punto büyüklüğünde karakterler ile, tercihan "Times New Roman" stili kullanılarak yazılacak ve aşağıdaki kesimlerden (alt kesimler de dahildir) oluşacaktır.

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Prosesus Vajinalis Obliterasyonunda Rol Oynayan Apoptotik Ve Antiapoptotik Gen Düzeyleri

Amaç:Prosesus vajinalis kapanmasında rol oynayan apoptotik ve anti-apoptotik genleri ortaya koyarak kasık fitiği, hidrosel, inmemiş testis patogenezinde oluşum mekanizmaları üzerine literatüre katkı sağlayarak ileriki çalışmalara yol gösterecek bulguları ortaya koymaktır.

Materyal ve Yöntem: Oniki erkek çocuklardan normal ameliyat seyrinde bağlanıp çıkarılan fitik kesesi veya patent prosesus vajinalis dokusu alındı. Kontrol grubu için akut apendisit nedeniyle ameliyat olan 12 erkek hastadan 1cm² lik periton dokusu alındı. Apoptozun histopatolojik incelemesi ışık mikroskopi ve TUNEL yöntemi ile yapıldı. Apoptotik ve anti-apoptotik genlerin mRNA düzeyleri PCR Array metodu ile değerlendirildi.

Sonuçlar: Histopatolojik olarak fitik olan hasta grubunda apoptozis indeksinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı. Anti-apoptotik genlerden en fazla BCL2A1 kontrol grubuna göre düşük olduğu saptandı. Anti-apoptotik genlerden BCL2L1,BIRC3, CD40LG, CFLAR, NAIP geni kontrol grubuna göre azaldığı saptandı. CASP5 (en fazla), CASP4, CASP1, CASP8 geninin azaldığı saptandı.Caspase aktivatörlerinden BCL2L10arttığı saptandı. CD40LG, CFLAR, CIDEA, NAIP azaldığı saptandı. Pozitif regülatörlerden BAX, BCL2L11, BID, BIK, CASP1, CASP4, CASP8, CIDEB, LTA, PYCARD, TNF, TRAF2, TRAF3 azaldığı saptandı. Negatif regülatörlerden BCL2L10'un arttığı, BCL2A1, BCL2L1, BIRC3, CD40LG, CFLAR, CIDEA, NAIP azaldığı saptandı. Apoptosis indükleyen genlerden BAX, BCL2L11, CASP1, CASP4, CASP8,LTA, PYCARD, TNFRSF10A azaldığı saptandı.

Tartışma: Prosesus vajinalis kapanmasında rol oynayan anti-apoptotik genlerdeki azalma gösterilmiş olmakla beraber apoptotik genlerde beklenen artış yerine azalma görülmüştür. Prosesus vajinalis kapanmasında sadece apoptozisin rol oynamadığı ortaya koyulmuş ve bu süreçte farklı mekanizmalarında olabileceği düşünülmüştür. Bu mekanizmaları ortaya koyabilmek için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Anahtar kelimeler: Kasık fitiği, apoptozis, antiapoptotik gen, apoptotik gen, prosesus vajinalis obliterasyonu

The levels of apoptotic and antiapoptotic genes which play role in obliteration of processus vaginalis

Aim: To present apoptotic and anti-apoptotic genes which play role on obliteration of processus vaginalis and expose results to guide new researches on pathogenesis of inguinal hernia, hydrocele, undescended testes.

Material and Methods: Patent processus vaginalis or hernia sac samples were taken from 12 boys who were operated for inguinal pathologies. 1 cm³ peritoneal samples were taken from children who were operated because of acute appendicitis for control group. Histopathologic examination of apoptosis was made by TUNEL and light microscopy. Mrna levels of apoptotic and anti-apoptotic genes were evaluated by PCR Array method.

Results: Apoptosis index were found to be higher in hernia group than the control group. BCL2A1 was found to be the most decreased one than the control group. The anti-apoptotic genes; BCL2L1, BIRC3, CD40LG, CFLAR, NAIP were found to be lower than control group. CASP5 (the most decreased), CASP4, CASP1, CASP8 were decreased. Of the caspase activators; BCL2L10 was increased, CD40LG, CFLAR, CIDEA, NAIP were decreased. Of the positive regulators, BAX, BCL2L11, BID, BIK, CASP1, CASP4, CASP8, CIDEB, LTA, PYCARD, TNF, TRAF2, TRAF3 were decreased. Of the negative regulators, BCL2L10 was increased. BCL2A1, BCL2L1, BIRC3, CD40LG, CFLAR, CIDEA, NAIP were decreased. Of the apoptosis inducing genes, BAX, BCL2L11, CASP1, CASP4, CASP8, LTA, PYCARD, TNFRSF10A were decreased.

Discussion: The decrease of anti-apoptotic genes which play role on processus vaginalis obliteration was shown, however apoptotic genes were decreased too; on the contrary of expected increase. It was shown that apoptosis is not only factor which plays a role on processus vaginalis obliteration. It is thought that different mechanisms get involved. Further studies are required to expose these mechanisms.

Key words: Inguinal hernia, apoptosis, apoptotic gene, anti apoptotic gene, obliteration of processus vaginalis

II. Amaç ve Kapsam

Kasık fitiği ve hidrosel çocukluk çağında cerrahi gerektiren en sık patolojilerdendir. Testisin inmesinden sonra prosesus vajinalisin yeterli kapanmamasından bu patolojilerin oluştuğu düşünülmektedir. Çocuklarda kasık fitiği sık görülmesine karşın oluşum mekanizmaları halen tam bilinmemektedir(1,2). Yapılan çalışmalarda oblitere prosesus vajinaliste düz kas hücrelerinin olmadığı, kasık fitiğinde ise düz kas hücrelerinin olduğu gösterilmiştir. Prosesus vajinalisin kapanmasının düz kas hücrelerinin apoptozisi sonucunda olduğu düşünülmektedir(1,3-5). Klinik olarak inguinal herni veya hidrosel oluşumu devamlılık gösteren düz kas hücrelerinin sayısına bağlanmıştır. Kasık fitiği keselerindeki düz kas hücrelerinde daha düşük oranda apoptozis olduğu, diğer taraftan, hidroselli olgularda ise düz kas hücrelerinde kasık fitiğine göre daha fazla apoptozis olduğu gösterilmiştir(1,4).

Mouravas ve ark'na göre periton ve oblitere prosesus vajinalisten alınan dokularda sadece mezotel ve bağ dokusu olduğu herni keselerinde ise düz kas hücrelerinin olduğu gösterilmiştir(1). Tanyel ve ark'na göre düz kas hücrelerinin gelişimi ve apoptozis indedifferensiasyon ve dedifferensiasyon önemli basamaklardır(3). Düz kas hücrelerinin differensiasyonu hücrelerin apoptozise daha duyarlı olması için gerekli olan basamaklardan biri olduğu gösterilmiştir(1). Yapılan bir çalışmada erkek inguinal hernili hastalarda herni kesesindeki düz kas hücreleri tamamen diferansiye iken hidroselli erkeklerde ise daha az diferansiye bulunmuştur ve daha az diferansiye olan düz kas hücrelerinin apoptozise daha duyarlı olmasıyla ilişkilendirilmiştir(1,3).

Düz kas hücrelerinin apoptozisi sonucunda fibroblastlar ile düz kas hücrelerinin ortak morfolojik özelliklerine sahip miyofibroblastlar oluşmaktadır(6). Miyofibroblastların varlığı prosesus vajinalis obliterasyonu için önemli basamaklardan biri olan düz kas hücrelerinin dediferansiasyonu için gerekli olan apoptozisin gerçekleştiğini göstermektedir(1). Düz kas hücrelerinin miyofibroblastta doğru dediferansiye olması apoptozise olan duyarlılığını artırmaktadır(3). Miyofibroblastların prosesus vajinalisin mezotel katının kaybolmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Bir çalışmada ise inmemiş testisteki keselerde belirgin anti-apoptotik gen Bcl-2 ve Fas-L ekspresyonu bulunmazken apoptotik gen Bax ve Fas ekspresyonu daha fazla bulunmuştur. Düz kasın en az olduğu yerlerde Bax ve Fas düzeylerinin fazla olduğu gösterilmiştir(3,4).

Programlanmış hücre ölümü apoptotik genlerin artması ve anti-apoptotik genlerin azalması sonucunda oluşmaktadır(7). Prosesus vajinalisin kapanması sırasında apoptozisin rol oynadığı bilinmekle beraber

yapılan literatür taramasında hangi apoptotik ve anti-apoptotik genlerin bu mekanizma üzerinde etkili olduğunu gösteren çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmanın amacı prosesus vajinalis kapanmasında rol oynayan apoptotik ve anti-apoptotik genleri ortaya koyarak kasık fitiği patogenezinde oluşum mekanizmaları üzerine literatüre katkı sağlayarak ileriki çalışmalara yol gösterecek bulguları ortaya koymaktır.

III. Materyal ve Yöntem

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalında, 6-12 yaş arasında kasık fitiği ya da apendisit ameliyatı planlanan 24 erkek çocukların ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam formu alındıktan sonra kasık fitiği nedeni ile ameliyat edilen 6-12 yaş arasındaki 12 erkek çocuklardan normal ameliyat seyrinde bağlanıp çıkarılan fitik kesesi veya patent prosesusvajinalis dokusu alındı. Ayrıca kontrol grubu için akut apendisit nedeniyle ameliyat olan 6-12 yaş arasındaki 12 erkek hastadan 1cm² lik periton dokusu alındı. Alınan doku örnekleri ikiye bölünüp biri -80°C sıcaklığındaki özel solüsyon içerisinde ve diğeri formaldehit içerisinde saklandı. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalında apoptozis gen düzeyleri PCR Array yöntemi ile belirlendi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ise immunohistokimyasal olarak TUNEL yöntemi ile değerlendirme yapıldı.

TUNEL yönteminde parafine gömülü dokular kesilerek polilizin kaplı lamlara alındıktan sonra deparafinize edilecek ve PBS ile yıkandı. TUNEL immunohistokimyasal boyama setine ait Tdt enzimi her lama eklenip inkübe edildi.. Daha sonra anti-digoxigenin-peroksidaz ile tutulup DAB (diaminobenzidine) substratsolüsyonu damlatılacak ve pozitif renk reaksiyonu oluşturuldu. Kesitler apoptozis skoruna göre değerlendirildi ve fotoğraflandı. Skor 0: Yüzey epitelinde birbirinden ayrı duran TUNEL (+) nukleuslar, Skor 1: Yüzey epitelinde izlenen TUNEL (+) nukleus grupları, Skor 2: Yüzey epitelini tamamen kaplayan ancak kriptaya inmemiş TUNEL (+) nukleus grupları, Skor3: Villusepitelive kriptalarda TUNEL (+) nukleus grupları, Skor 4: Transmural yayılım gösteren TUNEL (+) nukleus grupları olarak sınıflandırıldı.

PCR Array yönteminde ise mRNA izolasyonu RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. RNA miktarı spektroskopik olarak saptandı. İzole edilen RNA örneklerinin kantitatif analizi "Real Time RT-PCR" olarak bilinen metodoloji ile "RT-PCR Array Kiti" kullanılarak yapıldı. "House keeping genleri" için elde edilen Ct değerlerinin ortalaması ile kontrol ve kasık fitiği hastaları için saptanan genlerin (gönderilen genler) Ct ortalamaları normalize edildi. Bu normalizasyon üzerinden gen ekspresyonundaki değişim (fold change) olarak belirlendi. Gen ekspresyonundaki fold change

(ekspresyondaki artış veya azalma) kontrol hastalar için elde edilen değerlerin ortalaması 1 (sabit değer) kabul edilerek, kontrol hastalara göre gen ekspresyonundaki değişim olarak saptandı.

Apoptotik skor ve dokulardaki hasar derecelendirilmesinin istatistiksel olarak değerlendirmesinde gruplar arası kıyaslamalar için Mann-Whitney U testi gen transkripsiyon çalışmalarında Student's t-test istatistiksel yöntem olarak kullanıldı.

IV. Analiz ve Bulgular

Histopatolojik olarak fitik olan hasta grubunda apoptozis indeksinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı. Anti-apoptotik genlerden en fazla BCL2A1 kontrol grubuna göre düşük olduğu saptandı. Anti-apoptotik genlerden BCL2L1, BIRC3, CD40LG, CFLAR, NAIP geni kontrol grubuna göre azaldığı saptandı. CASP5 (en fazla), CASP4, CASP1, CASP8 geninin azaldığı saptandı. Caspase aktivatörlerinden BCL2L10 arttığı saptandı. CD40LG, CFLAR, CIDEA, NAIP azaldığı saptandı. Pozitif regülatörlerden BAX, BCL2L11, BID, BIK, CASP1, CASP4, CASP8, CIDEB, LTA, PYCARD, TNF, TRAF2, TRAF3 azaldığı saptandı. Negatif regülatörlerden BCL2L10'un arttığı, BCL2A1, BCL2L1, BIRC3, CD40LG, CFLAR, CIDEA, NAIP azaldığı saptandı. Apoptosis indükleyen genlerden BAX, BCL2L11, CASP1, CASP4, CASP8, LTA, PYCARD, TNFRSF10A azaldığı saptandı.

Apoptozis İndeks Sonuçları

Kontrol grubu	Mezotel Tabakası (%)	Bağdokusu (%)	İnguinal herni grubu	Mezotel Tabakası (%)	Bağdokusu (%)
1	6	-	1	60	50
2	17	5	2	80	70
3	34	-	3	95	80
4	16	2	4	90	60
5	4	-	5	90	60
6	27	10	6	80	60
7	11	4	7	90	80
8	4	-	8	80	60
9	16	10	9	80	50
10	11	-	10	30	70
11	22	-	11	82	50
12	25	-	12	70	50

V. Sonuç ve Öneriler

Programlanmış hücre ölümü apoptotik genlerin artması ve anti-apoptotik genlerin azalması sonucunda oluşmaktadır. Prosesus vaginalis kapanmasında rol oynayan anti-apoptotik genlerdeki azalma gösterilmiş olmakla beraber apoptotik genlerde beklenen artış yerine azalma görülmüştür. Sonuç olarak prosesus vaginalis kapanmasında sadece apoptozisin rol oynamadığı ortaya konulmuş ve bu

süreçte farklı mekanizmalarında olabileceği düşünülmüştür. Bu mekanizmaları ortaya koyabilmek için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Prosesus vaginalis kapanmasında rol oynayan apoptotik ve anti-apoptotik genleri gösterilmiş olup koyarak kasık fitiği patogenezinde sadece apoptosisin rol oynamadığı ve sürece farklı mekanizmaların eşlik ettiği gösterilerek literatüre katkı sağlayarak yeni çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Yok

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Yok

IX. Kaynaklar

1. Mourava VK, Koletsa T, Sfougaris DK, Philippopoulos A, Petropoulos AS, Zavitsanakis A, Kostopoulos I. Smoothmusclecelldifferentiation in theprocessusvaginalis of childrenwithherniaorhydrocele. *Hernia* 2010; 14:187–191
2. Tanyel FC, Muftuoglu S, Dagdeviren A, Kaymaz FF, Buyukpamukcu N. Myofibroblastsdefinedbyelectronmicroscopysuggestthededifferentiation of smoothmusclewithinthe sac wallsassociatedwithcongenitalinguinalhernia. *BJU Int* 2001; 87:251–255
3. Tanyel FC. Obliteration of processusvaginalis: aberrations in theregulatorymechanismresult in an inguinalhernia, hydroceleorundescended testis. *Turk J Pediatr*2004; 46:18–27
4. Tanyel FC, Okur HD. Autonomicnervoussystemappearstoplay a role in obliteration of processusvaginalis. *Hernia* 2004;8:149–154
5. Hosgor M, Karaca I, Ozer E, Erdag G, Ulukus C, Fescekoglu O, Aikawa M. The role of smoothmusclecelldifferentiation in themechanism of obliteration of processusvaginalis. *J Pediatr Surg*2004; 39:1018–1023
6. Shimasaki N, Kuroda N, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan H, ShuinTDistributionand role of myofibroblasts in human normal seminalvesiclestroma. *MedMolMorphol* 2007;40:208–211
7. Rastogi RP, Sinha R, Sinha RP. Apoptosis: Molecularmechanismandpathogenicity. *EXCLI Journal* 2009;8:155-181

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

	Destekleme Miktarı(TL)	Harcanan(TL)	Kalan(TL)
Tüketime yönelik mal ve malzeme alımı	59.999,99	39.996,10	20.003,89

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Yok

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

Yok

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı Projeleri için uygulanmaz)

Yok

e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (Altyapı Projeleri için uygulanmaz)

Yok

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.