

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**HİPOSPADİAS GENETİĞİNDE SHH (SONIC HEDGEHOG)
YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Şenay CANPOLAT**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARAÇ**

**ELAZIĞ
2018**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ünal BAKAL

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden “Uzmanlık Tezi” olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARAÇ

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her aşamada desteğiyle yanımda olan ve tez çalışmamda bilgi ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet KAZEZ'e,

Bilim ve hayat adına bir şeyler öğrenmeye çalışırken yanımda olan, destek ve katkılarını her zaman hissettiğim, bilgi ve birikimlerinden istifade ettiğim değerli hocam tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARAÇ'a,

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı öğretim üyesi Doç. Dr. Ünal BAKAL'a ve Yrd. Doç. Dr. Tugay TARTAR'a,

Tezimin her aşamasındaki büyük katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ebru ETEM ÖNALAN'a,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi Dr. Ahmet TEKTEMUR'a,

Elazığ Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesinde görevli Psikiyatri uzmanı canım arkadaşım Dr. Rümeyza YAMAN'a,

FTM Pediatri Kliniği asistanı Dr. Buket AKDENİZ'e,

Birlikte çalıştığım arkadaşlarım Dr. İbrahim AKDENİZ ve Dr. Ercan GENÇ'e,

Kliniğimiz sorumlu hemşiresi Neşe KILAVUZ'a, tüm klinik hemşirelerine ve personellerine,

Ameliyathane hemşirelerimiz Ebru ŞİMGAR ve Nida BAT'a,

Ameliyathane personelimiz Aziz AKBAL'a,

Kliniğimiz sekreterleri Derya ERALAN, Gülistan SED, İmren KÖKSAL ve Faika GÜROCAK'a,

Bugünümü borçlu olduğum sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Asistanlığın süresince hertürlü destek, sevgi ve özverisini esirgemeyen değerli eşim Doç. Dr. Ramazan YILDIZ'a ve çocuklarımız Begüm ve Yusuf'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza verdiği katkı ve desteklerden dolayı FÜBAP (Proje no: TF: 17. 24) birimine teşekkür ederiz.

ÖZET

Hipospadias, genital sistemin en sık görülen konjenital anomalilerinden biridir. Hipospadiasın potansiyel olarak bozulmuş gen ekspresyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiş olsa da nedeni büyük ölçüde bilinmezliğini korumaktadır. Bu çalışmamızda hipospadiaslı çocuklardan elde edilen kan ve penil dokularda Sonic Hedgehog yolağının etyolojideki rolünü araştırdık.

Haziran 2007 ile Haziran 2017 tarihleri arasında hipospadias tanısıyla ameliyat edilen, takip ve tedavileri sürdürülen 0-16 yaş arası 200 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalardan Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında ameliyata alınan 48 inden doku örnekleride toplandı. Kontrol grubu olarak; Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında sünnet talebi ile başvuran sağlıklı ve fizik muayenesinde ek patoloji saptanmayan 0-16 yaş arası 200 çocuk çalışmaya alındı. Bu çocukların 48 inden de yine doku örnekleri toplandı. Fazla (artık) prepüsyal doku (sünnet dokusu), hiçbir periüretral doku alınmadan elektif cerrahi sırasında elde edildi. Hipospadias hastalarından alınan penil dokulardan mRNA kat değişimleri, kanlardan DNA polimorfizmleri çalışıldı.

Bu çalışmada, hipospadiak dokularında çalışılan Sonic Hedgehog yolağı genlerinin mRNA kat değişimlerinde önemli farklılıklar bulduk. Hipospadias tamiri için cerrahi operasyon geçiren 48 hastadan ve elektif şartlarda sünnet olan 48 çocuktan doku örnekleri alınarak yapılan çalışmada, hipospadias grubunda Sonic Hedgehog yolağında görevli genlerden, Sonic Hedgehog, Patched Homolog 1 ve Glioma-Associated Oncogene Homolog 2 genlerinin ekspresyonlarındaki azalma gösterildi ($p<0,05$). Hipospadias tamiri için cerrahi operasyon geçiren 200 hastadan ve elektif şartlarda sünnet olan 200 çocuktan kan örnekleri alınarak yapılan çalışmada Sonic Hedgehog, Patched Homolog 1 ve Glioma-Associated Oncogene Homolog 2 genlerinin DNA polimorfizmlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık bulamadık.

Son yıllarda hipospadias insidansındaki artış, hipospadias gelişim mekanizmalarının açıklanmasını zorunlu kılmaktadır. Yapılan moleküler çalışmalar hipospadiasa neden olan eksojen hormonların rolünü açıklamamıza yardımcı olacak ve başka erkek gelişim bozukluklarının iç yüzünü kavramamızı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Sonic Hedgehog, Patched Homolog 1, Glioma-Associated Oncogene Homolog 2, Hipospadias, Moleküler, Genetik

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SHH (SONIC HEDGEHOG) PATH IN HYPOSPADIAS GENETICS

Hypospadias is one of the most common congenital anomalies of the genital system. Hypospadias has been shown to be associated with potentially impaired gene expressions, but the cause remains largely unknown. In this study, we investigated the role of Sonic Hedgehog pathway in the etiology penile tissues and blood from hypospadias children.

In this study we chose 200 patients who were diagnosed with hipospadias and operated in the date between june 2007 and july 2017. We took tissue sample from 48 patients who were operated in the date between june 2016 and july 2017. Our control group consist of 200 patients. We chose control group from the patients whose age were in between 0-16 and also whose parents wanted them to be circumcised. Furthermore our control group were healthy and there is no pathological sign in their examination. We took tissue sample from 48 patients in the control group too. Cicumcised tissue was took during elective surgery without taking ant periurethral tissue. We study mRNA fold changes of penil tissue taken from patients with hipospadias.

In this study, we found significant differences in the mRNA folds of the Sonic Hedgehog pathway genes in the hypospadiac tissues. In this study, in which tissue samples were taken from 48 patients who underwent surgery for hypospadias repair and 48 patients who were circumcised electively, the expression of Sonic Hedgehog, Patched Homolog1 and Glioma-Associated Oncogene Homolog 2 genes was shown to decrease in the genes responsible for pathway in the hypospadias group ($p < 0,05$).

We did not find any significant difference in the DNA polymorphisms of the Sonic Hedgehog, Patched Homolog 1 and Glioma-Associated Oncogene Homolog 2 genes compared to the control group in the study of blood samples from 200 patients who underwent surgery for hypospadias repair and 200 cases who were circumcised electively.

The increase in the incidence of hypospadias in recent years has made it necessary to explain the developmental mechanisms of hypospadias. Molecular studies will help us to explain the role of the exogenous hormones that cause

hypospadias and provide the concept of inner aspect of other male developmental disorders.

Keywords: Sonic Hedgehog, Patched Homolog 1, Glioma-Associated Oncogene Homolog 2, Hypospadias, Molecular, Genetic.



İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------------|
| BAŞLIK SAYFASI | i |
| ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| TABLO LİSTESİ | ix |
| ŞEKİL LİSTESİ | x |
| KISALTMALAR LİSTESİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Genel Bilgiler | 2 |
| 1.1.1. İnsidans | 2 |
| 1.1.2. Sınıflandırma | 2 |
| 1.1.3. Etiyoloji | 4 |
| 1.1.4. Hipospadias Genetiği | 9 |
| 1.1.5. Penil Gelişiminde Rol Oynayan Genler | 10 |
| 1.1.6. Anatomi | 14 |
| 1.1.6.1. Penis | 14 |
| 1.1.6.2. Kan damarları | 16 |
| 1.1.6.3. Lenfatikler | 17 |
| 1.1.6.4. Sinirler | 17 |
| 1.1.6.5. Üretra | 18 |
| 1.1.6.5.1. Erkek üretrası | 18 |
| 1.1.6.5.1.1. Hipospadiyak üretra | 19 |
| 1.1.7. Embriyoloji | 19 |
| 1.1.8. Kordi Deformitesi | 24 |
| 1.1.9. Penil Torsiyon | 24 |
| 1.1.10. Hipospadiasa Eşlik Eden Ek Anomaliler | 24 |
| 1.1.11. Hipospadias Anomalisinin Kliniği | 25 |
| 1.1.12. Cerrahi Tedavi Zamanı | 26 |
| 1.1.13. Cerrahi Tedavi | 27 |
| 1.1.13.1. Penis eğriliğinin düzeltilmesi | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 1.1.13.2. Penil Torsiyonun Düzeltilmesi | 29 |
| 1.1.13.3. Üretroplasti | 29 |
| 1.1.14. Hipospadias Ameliyatları Sonrası Görülen Komplikasyonlar | 30 |
| 1.1.14.1. Erken Dönem Komplikasyonlar | 30 |
| 1.1.14.2. Geç Dönem Komplikasyonlar | 31 |
| 1.2. Hedgehog Sinyal Yolağı | 31 |
| 1.2.1. Embriyogenezde Hedgehog Sinyalinin Rolü | 35 |
| 1.2.2. Testiste Hedgehog Sinyal Yolağı | 35 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 37 |
| 2.1. Hasta Seçim Kriterleri | 38 |
| 2.1.1. Hasta Grubu | 38 |
| 2.1.2. Çalışmaya Alınma Kriterleri ve Grupların Oluşturulması | 38 |
| 2.1.3. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri | 38 |
| 2.1.4. Kontrol Grubu Seçim Kriterleri | 39 |
| 2.2. Moleküler Genetik Analizler | 39 |
| 2.2.1. Total RNA İzolasyonu | 42 |
| 2.2.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü | 43 |
| 2.2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi | 43 |
| 2.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle cDNA Çoğaltımı | 44 |
| 2.3. İstatistiksel Analizler | 45 |
| 3. BULGULAR | 46 |
| 4. TARTIŞMA | 50 |
| 5. KAYNAKLAR | 62 |
| 6. EKLER | 79 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ | 84 |

TABLO LİSTESİ

| | | |
|------------------|---|----|
| Tablo 1. | Penil şaft veya skrotum ile ilişkili olarak eksternal meatusun lokalizasyonuna göre hipospadiasın sınıflaması | 4 |
| Tablo 2. | Hipospadiasla ilişkili olduğu gösterilen genler | 13 |
| Tablo 3. | GLI2 genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve nükleotit dizileri | 41 |
| Tablo 4. | SHH genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve nükleotit dizileri | 41 |
| Tablo 5. | PTCH1 genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve nükleotit dizileri | 41 |
| Tablo 6. | Gen polimorfizimlerinin katalog numaraları | 41 |
| Tablo 7. | Polimorfizimlerin ankestral ve polimorfik varyantlarının gösterimi | 41 |
| Tablo 8. | RT-PZR reaksiyon karışım | 42 |
| Tablo 9. | Genotipleme için uygulanan RT-PZR programı | 42 |
| Tablo 10. | cDNA karışım miktarı | 44 |
| Tablo 11. | cDNA sentezi için uygulanan PZR programı | 44 |
| Tablo 12. | RT-PZR için her bir kuyucuğa koyulan bileşikler | 44 |
| Tablo 13. | Uygulanan RT-PZR programı | 45 |
| Tablo 14. | Doku örnekleri alınan hastaların ve annelerinin yaş dağılımı | 46 |
| Tablo 15. | Doku örnekleri alınan hastaların gruplara göre ek inguinal bölge patolojilerinin dağılımı | 47 |
| Tablo 16. | Doku örnekleri alınan hastaların gruplara göre ailede başka hipospadiaslı birey dağılımı | 47 |
| Tablo 17. | Penil dokularda Grup 1 ve Grup 2 arasında genlerin mRNA kat değişimi | 49 |
| Tablo 18. | SHH geni mRNA kat değişimi Grup 1 ve Grup 2 ilişkisi | 49 |
| Tablo 19. | Kan örnekleri alınan hastaların ve annelerinin yaş dağılımı | 49 |
| Tablo 20. | Kan örneği bakılan hastalarda ek inguinal bölge patolojilerinin dağılımı | 50 |
| Tablo 21. | Kan örneği bakılan hastaların Gruplara göre ailesinde başka hipospadiaslı birey dağılımı | 50 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | | |
|------------------|---|----|
| Şekil 1. | Megameatus | 3 |
| Şekil 2. | Koronal hipospadias görüntüsü | 3 |
| Şekil 3. | Subkoronal hipospadias görüntüsü | 3 |
| Şekil 4. | Midpenil hipospadias | 3 |
| Şekil 5. | Penoskrotal hipospadias | 3 |
| Şekil 6. | Hipospadias etiolojisinde rol alan mekanizmalar | 9 |
| Şekil 7. | Penis üst yarısından kesitin üst-ön taraftan görünüşü | 14 |
| Şekil 8. | Erkek perineumu ve penisin fasyaları | 15 |
| Şekil 9. | Penisin korpus kavernozum, korpus spongiozum, arter ve ven görüntüsü | 17 |
| Şekil 10. | Penis innervasyonu | 18 |
| Şekil 11. | Gelişimin 3-7. haftaları. Farklanmamış evre | 22 |
| Şekil 12. | Gelişimin 4-12. haftaları. Penil (spongioz) üretranın transvers kesitlerinin görünümü | 22 |
| Şekil 13. | Gelişimin 9-12. haftaları | 23 |
| Şekil 14. | İnsan penil üretra gelişim teorisi | 23 |
| Şekil 15. | Penis düzleştirmede dorsal plikasyon | 28 |
| Şekil 16. | Penis düzleştirmede ventral korpus kavernozumun kesilerek greftlenmesi | 28 |
| Şekil 17. | Tubularize insize plate üretroplasti (TIPU) | 29 |
| Şekil 18. | Proksimal tubularize insize plate üretroplasti (TIPU) | 30 |
| Şekil 19. | HH sinyal yolağı | 34 |
| Şekil 20. | Kontrol grubu ile Grup 1 ve Grup 2 arasındaki mRNA kat değişimi ilişkisi | 48 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|----------------|--|
| AF | : Anal fold |
| AKT | : Serin/treonin protein kinaz |
| AMH | : Anti müllerian hormon |
| AR | : Androgen receptor |
| ark. | : Arkadaşları |
| ATF3 | : Activating transcription factor-3 |
| BCL-2 | : B cell lymphoma 2 |
| BMI1 | : B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 |
| BMP | : Bone morphogenetic protein |
| CBX2 | : Chromobox 2 |
| Ci | : Cubitus interruptus |
| Cos2 | : Costal 2 |
| CYP11A1 | : Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 |
| CYP17 | : Sitokrom P450, 17 |
| DDT | : Diklordifeniltri-kloroetan |
| DES | : Dietilstilbestrol |
| DGKK | : Diacylglycerol kinase kappa |
| DHH | : Desert hedgehog |
| DHT | : Dihidrotestosteron |
| dk. | : Dakika |
| DMRT1 | : Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 |
| DYRK1 | : Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1 |
| EFNB2 | : Ephrin B 2 |
| EGF | : Epidermal growth factor |
| EMX2 | : Empty Spiracles Homeobox 2 |
| ESR | : Östrojen reseptör |
| FGF | : Fibroblast growth factor |
| FGFR2 | : Fibroblast growth factor receptor 2 |
| FOG2 | : Friend of GATA 2 |
| FU | : Fused |
| FZD1 | : Frizzled homolog |
| GAPDH | : Gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz |

| | |
|-------------------------------|--|
| GATA4 | : GATA Binding Protein 4 |
| GLI1 | : Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 |
| GS | : Genital şişlik |
| GSK3β | : Glikojen sentaz kinaz 3 β |
| GT | : Genital tüberkül |
| hCG | : Human chorionic gonadotropin |
| HH | : Hedgehog |
| HHip | : Hedgehog interacting protein |
| HOX | : Homeobox |
| HOXA13 | : Homeobox A13 |
| HOXD13 | : Homeobox D13 |
| HSD3B1 | : Hidroksi-delta-5-steroid dehidrogenaz 3 beta ve steroid delta-izomeraz 1 |
| ICSI | : İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu |
| ID-1 | : İnhibitör of DNA binding 1 |
| IHH | : Indian hedgehog |
| INSL3 | : İnsülin-like factor 3 |
| IUGG | : İntrauterin gelişme geriliği |
| IVF | : İn-vitro fertilizasyon |
| KLL | : Kronik lenfosit lösemi |
| LH | : Lüteinize hormon |
| MAGPI | : Meatal advancement and glanuloplasti incorporated |
| MAMLD1 | : Mastermind like domain containing protein 1 |
| MAP3K1 | : Mitogen activated-protein 3 kinas 1 member 5A |
| MIS | : Müllerian inhibiting substance |
| MSX1 | : Muscle segment homolog homeobox 1 |
| MYC | : V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog |
| NR5A1 | : Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 |
| PAX7 | : Paired box transcription factor 7 |
| PBX1 | : PBX Homeobox 1 |
| PDS | : Polydiaksanone |
| PGD2 | : Prostaglandin D2 |

| | |
|---------------|---|
| PKA | : Protein kinaz A |
| PTCH | : Patched homolog |
| RAS | : Raspberry |
| REN | : Renin |
| SC | : Stem cell |
| SD | : Standart deviation |
| SHH | : Sonic hedgehog |
| SMAD | : Mothers agains decapentaplegic homolog |
| SMO | : Smoothened |
| sn | : Saniye |
| SNP | : Single nükleotide polymorphism |
| SOX9 | : SRY-Box 9 |
| SRD5A2 | : Steroid 5-alpha reductase deficiensy |
| SRY | : Seks determining region Y |
| StAR | : Seroidogenik akut düzenleyici protein |
| STK36 | : Serin/threonin-protein kinase 36 |
| SUFU | : Supressor of fused |
| TCDD | : 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin |
| TGF-β | : Transforming growth factor β |
| THBS4 | : Thrombospondin 4 |
| TIPU | : Tubularize insize plate üretroplasti |
| UF | : Üretral fold |
| VEGF | : Vasküler endothelial growth factor |
| VUR | : Vezikoüreteral reflü |
| WNT5A | : Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family |
| WT1 | : Wilm tumor supresor gen 1 |

1. GİRİŞ

Hipospadias, üretral spongiozum ve ventral prepüsyumun yetersiz gelişimi ile karakterize olan ve üretral meatusun olması gerekenden daha proksimalde olduğu konjenital bir anomali olarak tanımlanır (1). Hipospadias kelimesinin kökü, eski Yunanca'daki "altında" anlamındaki hypo ve "yarık-fissür" anlamındaki spadon sözcüklerinden gelmektedir (2, 3). Yenidoğan erkek bebeklerde en sık görülen genital malformasyondur ve sıklığı 1/250-300 gibi genel olarak kabul edilen bir oran olsa da toplum, ülke, şehir ve eyaletlerde farklılık göstermektedir (4-6).

Etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (1, 7). Vakaların % 20-25'inde kalıtımın rol oynadığı düşünülmektedir (7-10).

Hedgehog (HH) ailesi proteinleri birçok dokunun gelişiminde rol oynar. Hedgehog geni ilk olarak Drosophila'da tanımlanmıştır (11). Hedgehog geni çıkartılan Drosophila embriyolarında vücudun ön ve arka kısımlarında dikenlere benzer çıkıntılar oluşmuştur ve bu fenotipten dolayı bu gene "hedgehog" (kirpi) adı verilmiştir. Memelilerde 3 HH geni homologu tanımlanmıştır. Bunlar; Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) ve Desert Hedgehog (DHH)'dur. SHH bunlar içinde en güçlü olan, embriyo ve erişkin dokularında en sık eksprese olandır (12). Gelişmekte olan fare embriyosunda, SHH mRNA'sı notokord, nöral tüp ve uzuv tomurcukları gibi yapılarda lokalizedir (13). SHH ayrıca diş, saç, yanak, bağırsak, mesane, duktus deferens, üretra, akciğer ve prostat gibi dokularda da bulunmaktadır (12, 14). SHH genindeki mutasyonlar, hem insanlar hemde farelerde ön beyin yarıklanmasının tamamlanamaması, yüz defektleri ve göz defektleri ile karakterize olan holoprosencephaliye neden olmaktadır (13).

Embriyogenez boyunca SHH penis ve prostatdan kaynaklanan doku olan ürogenital sinüsten ortaya çıkmaktadır (15). SHH ekspresyonu hem genital kabartının büyümesi hem de farklılaşması için gereklidir (16). SHH işaretlenmiş delesyonu olan farelerde eksternal genitalya eksikliği gösterilmiştir (17). SHH penisin postnatal farklılaşmasının tüm periyodu boyunca ekspresyonu olmakta, pubertede artmakta ve yetişkin peniste en yüksek seviyesine ulaşarak, erişkinlerde devam eden fonksiyonunu desteklemektedir. SHH, primer olarak korpus kavernozumdaki düz kasda yer almaktadır. Ancak tunikanın, sinirlerin ve üretranın altındaki poliferatif bölgede de bulunmaktadır. Penisde SHH inhibisyonu ile

SHH'nın penisin sinüzoid morfolojisinin meydana gelmesinde esas rol oynadığı gösterilmiştir (18).

Bu çalışmamızda hasta sünnet deri dokularında SHH yolağı genlerinin mRNA ifadeleri ve bu genlerin polimorfik varyantlarının kontrollerle karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. İnsidans

Anomalinin görülme sıklığı üretral meatusun lokalizasyonuna bakılmaksızın ortalama 1/250–300 canlı doğumda ve yaşayan her 1/125 erkek doğumda bir görülmektedir (19). Distal hipospadias daha sık görülmekte ve insidansı 1/80–125 iken, penil hipospadias 1/1250, penoskrotal hipospadias tiplerinde ise 1/3330'dur (20-24).

Son 30 yıl içerisinde hipospadias insidansının yükseldiğini gösteren veriler olmasına rağmen, bunun gerçek bir artış olmadığı, sebebinin anomalinin daha fazla bilinmesinden ve daha iyi bir kayıt sistemine sahip olunmasından kaynakladığı bildirilmiştir (25-29).

Hipospadias ile ilgili ülkemizde geniş tabanlı ulusal veri tabanına ve doğum oranına paralel kapsamlı bir çalışma henüz yapılmamıştır. Çoğunlukla okul çağı çocuklarında yapılmış olan yerel, bölgesel çalışmalarla sınırlı kalmıştır (30-33). İstanbul'da bir bölge hastanesinde Akın ve ark. (5)'nin yaptığı bir çalışmada bir yıllık süreçte 1750 canlı erkek doğumda 34 hipospadias vakası belirlenmiştir ki bu da 1000 canlı erkek doğumda 19,4 oranını verir ve genel kabul gören oranlara göre yüksek bir değerdir (5).

1.1.2. Sınıflandırma

Popüler olan sınıflama Smith (20)'in çalışmasına dayanır. Bu sınıflamada, koronadan glansın ucuna kadar olan anormal meatus yerleşimleri 'birinci', subkoronal bölgeden penoskrotal birleşim yerine kadar penis gövdesi üzerindeki 'ikinci' ve penoskrotal birleşim yerinden perineye doğru daha aşağı yerleşimli olanlarda 'üçüncü' derece olarak adlandırılmıştır. Ancak, hipospadiasla birlikte kordinin de mevcut olması ve kordi düzeltilmesinin ardından meatus yer değiştireceğinden çocuk

cerrahlarının birçoğu üretral meatusun aldığı lokalizasyona göre hipospadiası sınıflayan 'Barcat' sınıflamasını kullanırlar (34).

Barcat Sınıflaması:

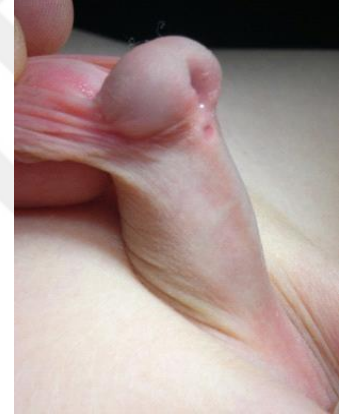
- Anterior hipospadias (% 49-73,4)
 - Glanüler hipospadias ve megameatus (Şekil 1)
 - Koronal hipospadias (Şekil 2)
 - Anterior penil veya subkoronal hipospadias (Şekil 3)
 - Midpenil hipospadias (% 7,1-21) (Şekil 4)
- Posterior hipospadias (% 17,5-30)
 - Posterior penil hipospadias
 - Penoskrotal hipospadias (Şekil 5)
 - Skrotal hipospadias
 - Perineal hipospadias



Şekil 1. Megameatus



Şekil 2. Koronal hipospadias görüntüsü



Şekil 3. Subkoronal hipospadias görüntüsü



Şekil 4. Midpenil hipospadias



Şekil 5. Penoskrotal hipospadias

Hipospadias anomalisinde üretral meatus, glanstan perineye kadar herhangi bir lokalizasyonda bulunabilir ve sınıflama bu lokalizasyona göre yapılır. Eksternal meatusun lokalizasyonuna dayalı hipospadias sınıflamasının en geniş şekli Hadidi tarafından yapılmıştır (Tablo 1). Hadidi hem klinik muayenede meatusun yerleşim yerine göre preoperatif değerlendirmeyi hem de kordi düzeltildikten sonraki meatusun yeni yerleşim yerine göre olan intraoperatif değerlendirmeyi esas almıştır (35).

Tablo 1. Penil şaft veya skrotum ile ilişkili olarak eksternal meatusun lokalizasyonuna göre hipospadiasın sınıflaması (35).

| Smith 1938 | Schaefer 1950 | Avellan 1975 | Browne 1938 | Duckett 1996 | Hadidi 2004 |
|---------------|------------------|----------------------|----------------|---------------------|----------------|
| 1.derece | Glanüler | Glanüler | Glanüler | Glanüler | Glanüler |
| 2.derece | Penil | Penil | Subkoronal | Subkoronal | Anterior |
| | | | Mid şaft | Mid şaft | Middle |
| 3.derece | Perineal | Penoperineal | Penoskrotal | Proksimal penil | Posterior |
| | | Perineal | Midskrotal | Penoskrotal | Proksimal |
| | | Perineal w/o Bulb | Perineal | Skrotal Perineal | |

1.1.3. Etiyoloji

Hipospadias etiyojisi tam olarak bilinmemekle beraber, multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. Hipospadias etyolojisinde hormonal, genetik ve çevresel faktörler rol oynar. Birçok vaka, sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (36-38).

Son yıllarda hipospadias insidansındaki artışın nedeni olarak çevresel faktörler suçlanmaktadır. Poliklorinlenmiş bileşikler gastrointestinal sistem tarafından emilerek karaciğer ve yağ dokusunda birikir. Bu maddeler plasentayı da geçebilir. Bunların çoğu lipofilik olduğundan vücutta yağ dokusunda birikir, anne sütü ve amniyotik sıvıdan yeniden elde edilebilirler. Örneğin antiandrojenik bir madde olan fetalat, testosteron sentezini azaltarak erkek üreme sisteminin gelişimini etkiler (36). Mesleki olarak maruz kalınan ve endokrin bozukluğuna neden olan tarım ilaçları, bifenoller, alkil fenoller, ağır metaller, organik solventler hipospadias gelişiminde rol oynar (36, 39, 40).

Fetal dönemde testosteron, 5 alfa redüktaz tip 2 tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüşür, DHT ligandı androjen reseptörüne bağlanır, androjen reseptörü aktive olur ve üretral kapanma gerçekleşir. Penis ve üretranın gelişiminde rol

oynayan östrojen ve androjen dengesindeki değişiklikler hipospadias gelişmesine neden olabilmektedir (41). 5 alfa redüktaz enziminin tip 2 eksikliği, 5 alfa redüktaz enzim inhibitörleri, androjen reseptör antagonistleri, androjen reseptör defektleri, penil intraselüler ve nükleer testosteron bağlama kapasitesindeki azalma, steroid hormon sentezinde görevli enzim inhibitörlerine deneysel maruz kalma, testosteron ve DHT düzeylerindeki düşüklük, yüksek östrojen ve progesteron düzeyleri hipospadias oluşumunda etkilidir (39, 42).

Testosteron plazmada taşıyıcısından ayrılır, hücre içine pasif difüzyonla girer, DNA üzerinde androjen reseptörlerine bağlanır ve androjen duyarlı elementlerle birleşerek bir kompleks oluşturur. Testosteronun androjen reseptörlerine bağlanması ile erkek dış genital sistemin oluşması için çok sayıda androjene duyarlı olaylar başlar. Antiandrojenler bu çok sayıda yolakta testosteronun uygun fonksiyonunu direkt olarak engeller. Antiandrojenlerin en iyi bilinen örneği diklordifeniltrikloroetan (DDT)'dir. DDT sivrisinek ile yayılan malaria, tifus ve diğer haşere kaynaklı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. DDT ve metabolitleri androjen reseptörlerini blokladığı için erkeklerde östrojenik etkilere sebep olur (36). DTT'nin lipofilik metabolitine in-utero maruz kalan erkek fare fetusunda; kadın tipi genitoüriner trakt, hipospadias, azalmış anogenital mesafe ve inmemiş testis gösterilmiştir (43).

Çok sayıda çalışmada hipospadiaslı çocukların human choironic gonadotropin (hCG) sitümülasyonuna testosteron cevabında azalma olduğu gösterilmiştir (36, 44).

Anne yaşının artması, annenin menarş yaşının geç olması, annenin obez olması ve ilk doğum yapan anne bebeklerinde hipospadias görülme riski artmıştır (36, 37, 40). İntrauterin büyüme geriliği ve düşük doğum ağırlığı hipospadias için risk faktörüdür (36, 45). Gatti ve ark. (46) gestasyonel yaş bakımından küçük olan infantlarda, normal infantlara göre hipospadiasın 10 kat daha sık görüldüğünü göstermişlerdir.

Valproik asit gibi antiepileptik ilaçlara hamilelikte maruz kalmanın hipospadias oluşum riskini artırdığı iddia edilmiştir. Valproik asit uzun dönemde antiandrojenik etki gösterir (39, 47).

Klip ve ark. (48) 8.934 erkek çocuk ve fertilité problemi nedeniyle takip edilen 16.284 bayan hasta ile yaptıkları çalışmalarında, annesi hamilelik sırasında

dietilstilbesterol (DES)'e maruz kalan 205 çocuktan 4 (% 1,9) tanesinde hipospadias görüldüğünü ortaya koymuşlardır. Aynı şekilde Pons ve ark. (49) DES'e maruz kaldığı bilinen annelerin çocuklarının % 1,2'sinde hipospadias saptamıştır. DES düşüğü önlemek için kullanılan bir ilaç olup alfa ve beta östrojen reseptörlerini bağlar (36, 50). Gebelikte DES'e maruz kalan annelerin erkek çocuklarında artmış feminizasyon riski ve 20 kat artmış hipospadias gelişimi bildirilmiştir (51, 52).

Oral kontraseptif kullanımı, hipospadias oluşumunda neden olarak gösterilmemesine rağmen, hamileliğin ilk aylarında östrojenik bileşenlere veya progesterine maruz kalmanın hipospadias oluşma riskini artırdığı iddia edilmektedir. Östrojenik aktivite, çevresel maddelerde, meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntılarında, verim artırıcı madde verilen inek sütlerinde, bazı bitki ve farmasötiklerde yaygın olarak bulunmaktadır (53). Birçok araştırmacı, vejeteryan beslenme sonucu alınan özellikle soya ürünlerinde bulunan fitoöstrojenlerin hipospadias insidansında artışa neden olduğunu iddia etmektedir (39). Hamile kadınların vejeteryan diyet yapması ve aynı zamanda ek demir almaları hipospadiasın tanımlanmış bir sebebidir. Vejeteryan olmayan kadınlarda da demir takviyesi hipospadias oluşumu için risk faktörüdür (36, 42, 44, 54). Maternal progesterin alımı ile hipospadias arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (29, 55). Ulusal doğum hasarlarını önleme çalışmasında, proksimal penil ve penoskrotal hipospadiaslı 502 çocuk ve 1286 normal çocuk (kontrol grubu) analiz edilmiş. Kırk iki (% 8,3) hipospadiaslı çocuk annesinin ve kontrol grubundaki 31 (% 2,4) annenin, hamileliklerinin 4 hafta öncesinden progesterin almaya başladığı ve hamileliklerinin ilk 14 haftasında progesterin alımına devam ettikleri belirlenmiştir (29). Düşük riski ve diğer komplikasyonlar için progesteron alan kadınların erkek çocuklarında hipospadias görülme riski 2 kat artmıştır. Ancak kontrasepsiyon amacıyla alınan progesteron ile hipospadias risk artışı arasında ilişki olduğu gösterilmemiştir (39). Bazı çalışmalarda, sentetik östrojen bileşiklerine maruz kalan gebe dişi farelerin hipospadiaslı çocuklar doğurduğu gösterilmiştir (56, 57).

Wang ve ark. (58) hipospadiaslı hastalardan elde edilen dokuların mikroarray analizlerinde, hem östrojen genlerinin hem de östrojene duyarlı genlerin up-regüle olduğunu göstermişlerdir. İnsan hipospadias sünnet derisinde bulunan ve östrojen varlığında up-regüle olduğu gösterilen genlerden biri de Activating transcription

factor3 (ATF3)'tür. ATF3, ATF/cAMP duyarlı element bağlayıcı grubun bir üyesidir. Hemostaz, yara iyileşmesi, hücre adhezyonu, kanser invazyonu ve apoptozis ile ilgili olduğu düşünülmektedir. ATF3 geninin fazla aktivasyonu, hücre büyümesini baskılamakta ve hücrelerin G1 fazından S fazına geçişini yavaşlatmaktadır (59). Böylece hücre siklusunun ilerlemesinde negatif rol oynamaktadır (60, 61). ATF3 östrojenik veya antiandrojenik yanıtlara neden olduğundan hipospadias gelişiminde önemlidir (62, 63). Liu ve ark. (64) 28 hipospadiaslı ve 20 normal çocuğun penis derisinde ATF3 gen ekspresyonunu incelemişler ve hastalığa sahip olanların % 86'sında ATF3 genini immüno-histokimyasal olarak pozitif bulurken, normal çocukların sadece % 13'ünde pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmalar, hipospadiaslı çocukların penis deri dokusunda ATF3 ekspresyonunun arttığını, dolayısıyla hipospadias patogenezisinde ATF3'ün rol oynayabileceğini düşündürmüştür (60, 61, 64).

Yapılan in-vivo çalışmalar; epidermal growth (EGF)'nin eksternal genitalyada parsiyel virilizasyona yol açtığını ve EGF'nin inhibe edilmesi ile seksüel farklılaşmanın durduğunu göstermiştir (65).

Dioksin bileşikleri içinde en zehirli olanı 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'dir. Dioksin, Lüteinizan hormon (LH) sekresyonunu azaltarak steroidogenik akut düzenleyici protein (StAR) ve sitokrom p450,17 (CYP17)'yi baskılar. Böcek ilacı olan Linuron antiandrojenik etkiye sahiptir ve LH reseptör salınımlarında rol oynayarak testosteron sentezini azaltır (36). Mantar öldürücü ilaç olarak kullanılan vinklozolin'e in-utero maruz kalan erkek yavruların tamamında kadın benzeri anogenital uzaklık, kaybolmuş meme başları, azalmış semen miktarı ve fertilité, atrofik üretra ile hipospadias oluştuğu gösterilmiştir (66, 67). Yine bir fungusid olan prosimidon'a gebelik süresince maruz kalan annelerin bütün yavrularında hipospadias gözlenmiştir (68).

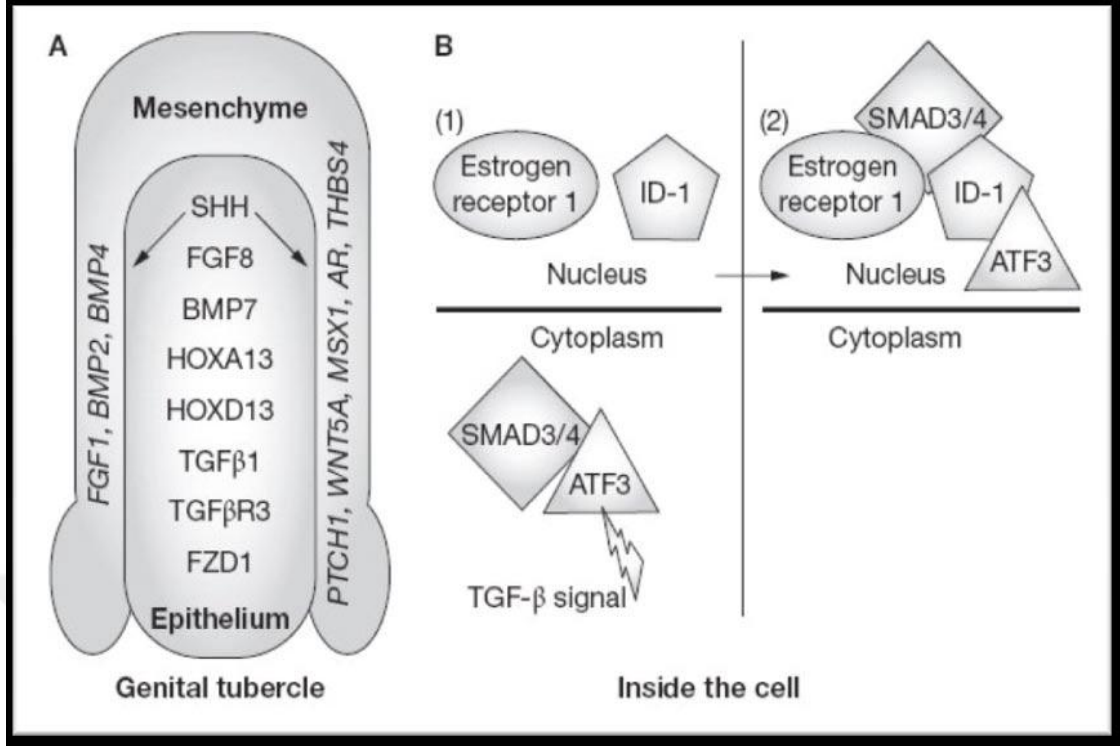
İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) veya invitro fertilizasyon (IVF) ile doğan çocuklarda hipospadias riskinin arttığı belirtilmiştir (36, 37, 39, 40). Ovulasyon indükleyici ajanlar ve progestinlerin hipospadias ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (40). Birçok çalışma annenin sigara kullanımının hipospadias oluşum riskindeki artma ile ilişkili olmadığını söylemektedir (48, 69).

Hipospadiasın etyolojisinde ailesel genetik yatkınlık da mümkündür (23). Bin üç yüz on dört vakalık bir dizi hastayı inceleyen Leung ve ark. (70) vakaların % 5,4 de ailelerinde en az bir tane hipospadiaslı birey olduğunu bildirmiştir. Hipospadiasın monozigot erkek ikizlerde topluma göre 8,5 kat daha sık görülmesi plasental hCG üretimine talebin artmasıyla açıklanmaktadır (60, 71, 72). Hipospadiaslı hastanın erkek kardeşinde hipospadias görülme sıklığı % 12-14 arasında değişmektedir. Babasında hipospadias olan çocuklarda hipospadias görülme ihtimali % 7-9 arasındadır (2, 44). Baba ve çocukta hipospadias var ise, ikinci çocukta görülme ihtimali % 26'dır (73).

Hipospadiasın, kromozom anomalisi nedeni ile oluşan bazı sendromlarla birlikteliğinin daha sık olduğu görülmüştür. Wolf-Hirschhorn (4p delesyonu), Cat-eye (5p delesyonu), Denys-Drash, Silver-Russell, Robinow Sendromu ve Klinifelter Sendromu bunlardan bazılarıdır (36, 45, 47). Ambigus genitalyada da sıklıkla hipospadias görülmektedir (74).

Östrojen reseptör 1 (ESR 1), Östrojen reseptör 2 (ESR 2) ve Steroid 5 alfa redüktaz gibi genlerinde hipospadias ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (37, 47). ESR 1 ve ESR 2 mRNA ekspresyonunun normal sünnet derisinde, hipospadiaslı sünnet derilerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (44, 53, 75).

Hipospadias oluşumuna yol açan moleküler olaylar büyük ölçüde bilinmezliğini korumaktadır. Ancak güncel çalışmalar SHH, fibroblast growth factor 8 (FGF 8), fibroblast growth factor 10 (FGF 10), homeobox A13 (HOXA13) ve homeobox D13 (HOXD13) gibi genlerin erken genital tüberkülün dışa büyümesi ve biçimlenmesindeki etkilerini ortaya çıkarmıştır (16, 17, 76) (Şekil 6).



Şekil 6. Hipospadias etiyolojisinde rol alan mekanizmalar (77)

A: Genital tüberkül ve gelişim sürecinde mezenkim ve epitelyumda onunla ilişkili up-regüle olan genler. B: TGF-β sinyal yolağı ve ilişkili genleri (hipospadias etyolojisinde kabul edilen role sahip olduğu kadar *in vivo* ve *in vitro* östrojen duyarlı olduğu gösterilen ATF3 gibi) içeren hipospadiasın potansiyel intraselüler mekanizması 1: TGF-β sinyalini alan hücreler; ATF3 ve SMAD protein 3, 4 heterodimerize oldukları sitoplazmada bulunurlar. 2: ATF3-SMAD3/4 heterodimer nükleusa geçer ve ortaya atılan hipotez şu ki; bu heterodimer komponenti ile östrojen reseptör-1 ve ID-1 arasında yeni etkileşimler oluşur. Bu etkileşimler, muhtemelen mezenkimal-epitelyal etkileşimler ile ilişkili hücresel cevaplar ortaya çıkarır. AR (androgen receptor), ATF3 (aktivating transcription factor 3), BMP (bone morphogenetic protein), FGF (fibroblast growth factor), FZD1 (frizzled homolog), HOX (homeobox), ID-1 (inhibitor of DNA binding 1), MSX1 (muscle segment homolog homeobox 1), PTCH1 (patched homolog 1), SHH (sonic hedgehog), SMAD (mothers against decapentaplegic homolog), TGF (transforming growth factor), THBS4 (thrombospondin 4), WNT5A (wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 5A).

1.1.4. Hipospadias Genetiği

Normal fenotipteki erkek cinsiyet gelişimi için ilk koşul Y kromozomu varlığıdır. 46 XY bireylerde Y kromozomu üzerinde yer alan sex determining region Y (SRY) geni, erkek cinsiyet gelişimini ve farklılaşmasını sağlayacak olayları başlatır. SRY'nin etkisiyle önce testis oluşur. Fetal testislerden androjen üretimi başlar ve erkek cinsiyet organlarının gelişimi uyarılır. Bu sürece maskülinizasyon adı verilir. Burada testosteron, dihidrotestosteron hormonları ve androjen reseptörleri görev alır. Böylece iç (epididimis, vas deferens, seminal veziküller ve prostat) ve dış (penis, skrotum, perineum) genityala erkek yönünde gelişir (78, 79). Bu süreç kesintiye uğrarsa maskülinizasyon yetersizliği gelişir. Fertilizasyon sonrası 4-5

haftadaki genital oluşumda rol oynayan genler Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (NR5A1), Wilm Tumor Supresor gen-1 (WT1), Empty Spiracles Homeobox2 (EMX2), Chromobox 2 (CBX2) ve PBX Homeobox 1 (PBX1) genleridir. Yedinci haftada GATA Binding Protein 4 (GATA4)/ Friend of GATA 2 (FOG2)/NR5A1/WT1 etkisiyle pre-sertoli hücrelerinde SRY ekspresyonu başlar. SRY ve NR5A1 birlikte SRY-Box 9 (SOX9) ekspresyonunu uyarırlar. Sonrasında FGF9 ve Prostaglandin D2 (PGD2) genleri aktiflenir ve sertoli hücre fonksiyonları uyarılır. Ovaryan gelişim genleri baskılanır. Anti-Müllerian Hormon (AMH) üretilir. Doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 (DMRT1) burada etkili genlerden birisidir. Sertoli hücreleri oluşuktan sonra DHH etkisiyle gelişimin 8-9. haftalarında fetal Leydig hücrelerinin gelişimi uyarılır. Androjenler ve İnsulin-like factor 3 (INSL3) üretilir. Testosteron ve AMH'nın etkisiyle Müllerian yapılar gerileyerek, Wolffian kanallar erkek iç genitalyayı oluşturmak üzere farklılaşır. INSL3, testislerin inişinde rol oynar. Testosteron, 5 alfa redüktaz enziminin etkisiyle DHT'a dönüştürülür. DHT'da erkek dış genitalyanın farklılaşmasını sağlar. İç ve dış genitalyadaki hormonların etkisi, bir nükleer transkripsiyon faktörü olan androgen reseptörü aracılığı ile olmaktadır (80).

1.1.5. Penil Gelişiminde Rol Oynayan Genler

Fallus gelişimi ve üretral kapanmada rol oynayan genlerdeki ya da sinyal yollarındaki bozukluklar hipospadiasa yol açabilir. Burada HH, WNT, FGF, BMP sinyal yolları ile HOX genleri görev almaktadır. İnsanda dış genitalyanın gelişimi 2 aşamalıdır:

- 1- Erken dönem hormon-bağımsız faz (5-8. gebelik haftaları).
- 2- Geç dönem hormon-bağımlı faz (8-12. gebelik haftaları).

Hedgehog genlerinden biri olan SHH, hormon-bağımsız fazda önemli bir görev alarak birçok hedef genin direkt ya da indirekt olarak ekspresyonuna sebep olur. Bunlar, genital tüberkülün distal üretral epitelyumunda FGF8, BMP7 ve mezenkiminde FGF10, BMP2, BMP4, HOXA13, HOXD13 genleridir. Fetal insan penisinde üretral kapanma zamanında SHH, Patched homolog (PTCH1), Smoothened (SMO) ve Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) genleri ifadenmektedir. Bu genlerde hipospadiasla ilişkili çeşitli single-nucleotide

polymorphism (SNP)'ler tanımlanmıştır. Bu genlerin bir kısmı riski arttırırken, bir kısmı riski azaltmaktadır (81, 82).

Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 5A (WNT5A) sinyal yolağı ise hem hormon bağımsız hem de hormon bağımlı süreçte rol oynar ve iki yolak birbiriyle bağlantılıdır. WNT5A, SHH sinyalinin transkripsiyonal hedefidir. Robinow Sendromlu hastalarda WNT5A mutasyonları bildirilmiştir. Robinow Sendromu'nun bulguları arasında hipospadias da yer almaktadır. WNT sinyalleri β -catenin üzerinden etkilidir. FGF8'in aktive edilmesi ve sürdürülmesi için gereklidir. FGF'ler ve BMP sinyal molekülleri epitelial mezenkimal etkileşimi uyararak genital tüberkülün büyümesini sağlar. BMP sinyalleri, apoptozisi kontrol ederek genital tüberkülün büyümesini sağlar. FGF8, FGF10, fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), BMP7 ve BMP4'deki mutasyonlar hipospadiasla ilişkilidir. BMP7'de saptanan SNP'lerin hipospadias riskini 2 kat arttırdığı bildirilmiştir. BMP4 ile SNP ilişkisi de gösterilmiştir. FGF8 ve BMP7'nin düzenleyicisi HOX genleridir. HOX genlerindeki mutasyonlar hem sendromik hem de izole hipospadiasta görülmüştür. Ayrıca WT1, Diacylglycerol kinase kappa (DGKK), NR5A1, Ephrin B 2 (EFNB2), Mitogen activated-protein 3 kinas 1 (MAP3K1), Mastermind like domain containing protein 1 (MAMLD1) genlerinin hipospadiasla ilgili olduğu görülmüştür (81, 82).

Steriojenik yolak üzerindeki mutasyonlar androjen sentezini etkileyerek hipospadias oluşmasına yol açarlar. Bu yolak hormon-bağımlı fazda görev alıp, kolesterolün cinsiyet hormonlarına dönüşümünü sağlar. Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 (CYP11A1), Hidroksy-delta-5-steroid dehidrogenase 3 beta-and steroid delta-isomeraz 1 (HSD3B1), HSD3B2, HSD17B2, HSD17B3 ve Steroid 5-alpha reductase deficiensy (SRD5A2) enzimleri burada görevlidir. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar yolakta son basamaktaki testosteron ve DHT eksikliğine sebep olarak hipospadias gelişiminde rol oynarlar. Testosteron ve DHT, AR'ye bağlanarak etki gösterirler (81). AR mutasyonları Androjen Duyarsızlık Sendromu'na yol açar. AR'nin yetmezliği durumunda 46 XY bireylerde kadın tipi fenotip görülür. Parsiyel duyarsızlık görülüyorsa hipospadias mutlaka düşünülmelidir (83).

Normal penil dokular ile hipospadiyak penil dokuların gen profilleri karşılaştırıldığında, 24 adet genin hipospadiyak penil dokularda etkili olduğu görülmüştür. Bunlar; ATF3, CYR61, BTG2, CD69, CD9, DUSP1, EGR1, EIF4A1, FOS, FOSB, HBEGF, HNRNPUL1, IER2, JUN, JUNB, KLF2, NR4A1, NR4A2, PTGS2, RGS1, RTN4, SLC25A25, SOCS3 ve ZFP36 genleridir (84). Hipospadiasla ilişkili olduğu gösterilen genler Tablo 2’de gösterilmiştir.



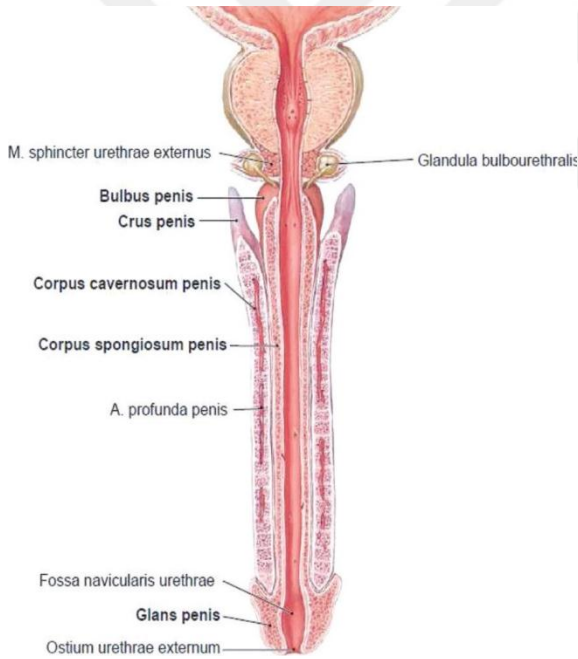
Tablo 2. Hipospadiasla ilişkili olduğu gösterilen genler (85)

| Gen | Etki Mekanizması | Genin defektif olduğu hayvan modellerinde (knockout) hipospadias ile birlikte izlenen ek patolojiler | Hipospadiaslı çocuk olgularda defektif genin tespit edildiği ve beraberinde izlenen ek patolojiler |
|--|--|--|--|
| ► Erken (hormondan bağımsız) genital gelişim döneminde etkili olan genler | | | |
| SRY SOX9 DMRT1 GATA4 | • Testiküler farklılaşmanın sağlanması | | Testiküler disgenezi |
| WT1 | • Testiküler farklılaşmanın sağlanması | Anorşi, bilateral renal agenezi, defektif genital tuberkül gelişimi | Sendromik hipospadias |
| SHH | • Üretranın şekillenmesi • Genital tuberkülün mezenkimi agenezi ve üreteli arasındaki hücre etkileşimlerinin düzenlenmesi | Penil ve klitoral persistan kloaka | Hipospadiaslı olgularda henüz mutasyonu bildirilmemiştir |
| FGFR2 | • Fibroblast büyüme faktör reseptörü 2 • Androjen reseptör transkripsiyonu ile ilişkili | | |
| FGF10 | • Fibroblast büyüme faktörü 10 | | |
| FGF8 | • Fibroblast büyüme faktörü 8 | | |
| BMP4 BMP7 | • Kemik matriks proteini • Genital tuberkülde epitelyum-mezenşim etkileşiminde etkili | Genital tuberkülün gelişmemesi | |
| HOXA HOXD | • Non-endokrin penil gelişim • FGF8 ve BMP7 proteinlerinin indüksiyonu • AR ekspresyonu | Defektif penil gelişim | El-ayak-genital sendromu |
| Wnt-beta catenin | • GT'nin gelişimi, hücre-hücre adhezyonları | Genital tuberkülün gelişmemesi | Proksimal hipospadias |
| ► Geç (Hormona bağımlı) genital gelişim döneminde etkili olan genler Androjene bağımlı genler | | | |
| 5 alfa redüktaz tip 2 | • Testosteronun dihidrotestosterona dönüştürülmesi | | Proksimal hipospadias ve diğer genital anomaliler |
| Androjen reseptörü (AR) | • Androjenin hücrelerde etki göstermesi | Hipoplazik glans penis ve korpus kavernozum | Proksimal hipospadias, inmemiş testis, mikropenis |
| HSD17B3 | • Androstenodionun testosterona dönüşümünü katalizleyen 17 β OH steroid dehidrogenaz enzimini kodlar | | |
| FKBP52 | • Androjen reseptörünün ko-şaperonudur. | | |
| MAMLD1 (CXorf6) | • Testiküler testosteron üretimi | | 46 XY cinsel gelişim bozukluğu, mikropenis, bifid skrotum |
| EfnB2 EphB2 | • Üretral kapanma ve skrotal gelişim | | |
| Östrojene bağımlı genler | | | |
| Östrojen Reseptör alfa | • Östrojenin hücrelerde etki göstermesi | | |
| Östrojen Reseptör beta | • Östrojenin hücrelerde etki göstermesi | | |
| ATF3 | • TGF-β sinyalizasyon yolağında etkili • Genital tuberkülde epitelyum-mezenkim etkileşimi | | |

1.1.6. Anatomi

1.1.6.1. Penis

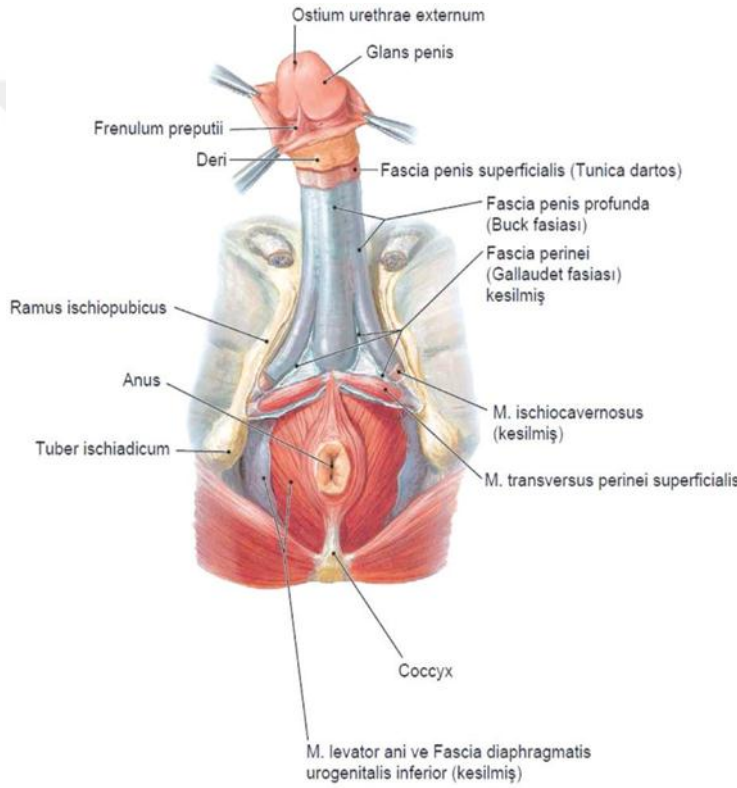
Penis korpus penis ve radiks penis olmak üzere iki bölümden oluşur. Penisin ucundan pubise kadar olan bölümüne korpus penis, perineumda bulunan sabit kısmına ise radiks penis denir. Normal pozisyondaki korpus penisin ön yüzüne dorsum penis arka yüzüne ise facies urethralis denir. Penis 3 adet silindir şeklinde erektil dokudan oluşur. Dorsalde bir çift korpus kavernozum penis, diğeri korpus spongiozum penis dir. Her iki cisim hem korpus peniste hem de radiks peniste bulunur. Radiks penisin oluşumuna katılan kavernöz cisimler birbirinden ayrılarak krus penisleri, spongioz cisim ise bulbus penisi oluşturur. Üretranın büyük kısmı korpus spongiozum penis içinde seyredir. Üç silindirik cismin üzeri elastik liflerden zengin, düzensiz yapıda gevşek konnektif bir faysa ile örtülüdür (86).



Şekil 7. Penis üst yarısından kesitin üst-ön taraftan görünüşü (87)

Penis derisi diğer bölge derilerine oranla daha koyu renkli ve incedir. Derindeki yapılara gevşek olarak bağlandığı için kolay hareket edebilir. Deri altında yağ dokusu bulunmaz. Bu nedenle de kişi şişmanlarsa dahi penisin kalınlığı değişmez. Arka yüzde uzunlamasına seyreden kaynaşma çizgisine raphe penis denilir. Penis derisi uç kısımda kendi üzerine kıvrılarak prepüsyum penisi (sünet derisi) oluşturur (88).

Fascia penis superficialis ve Fascia penis profunda olmak üzere iki fasyası vardır. Fascia penis superficialis'e Tunika dartos da denir. Altteki fasyaya (profunda) gevşek olarak bağlıdır. Fascia penis profunda (Buck fasyası) Tunika albuginea ile Fascia penis superficialis arasında bulunur. Korpus penisi sarar ve glans penise kadar uzanır. Bulbus penis ve krus penisi saran bölümü ürogenital diyafram fasyasına yapışıktır. Buna ek olarak penis iki adet bağ ile sabitlenmiştir. Scarpa fasyası, lig. Fundiforme penis adıyla penis kökünün dorsal ve yan taraflarına, fascia profunda'dan ayrılan lig. Suspensorium penis ise kısa ve üçgen bir şekilde penis kökünün dorsoline bağlanır (89).



Şekil 8. Erkek perineumu ve penisin fasyaları (87)

Herbir korpus kavernozum, sağlam bir kapsül ya da kollagen liflerinin oluşturduğu tunika albuginea ile örtülüdür. Kavernoza lar arası kapsül median septum ile birleşir. İki adet korpus kavernozum arasında geçişe izin veren çok sayıda yarıklar vardır. Küçük venlerin oluşturduğu düzensiz pleksus, albugineanın hemen altındadır. İki adet korpus kavernozumun inferiorunda endotel ile çevrili lakünler ya da geniş boşlukların oluşturduğu bir ağ yapısı vardır. Organ gevşek olduğunda, lakünler trabeküler kasların tonusu ile kapalı tutulur ve yarık şeklinde görünürler. Korpus kavernozum penis de benzer yapıdadır, ancak albuginea incedir ve çok sayıda elastik

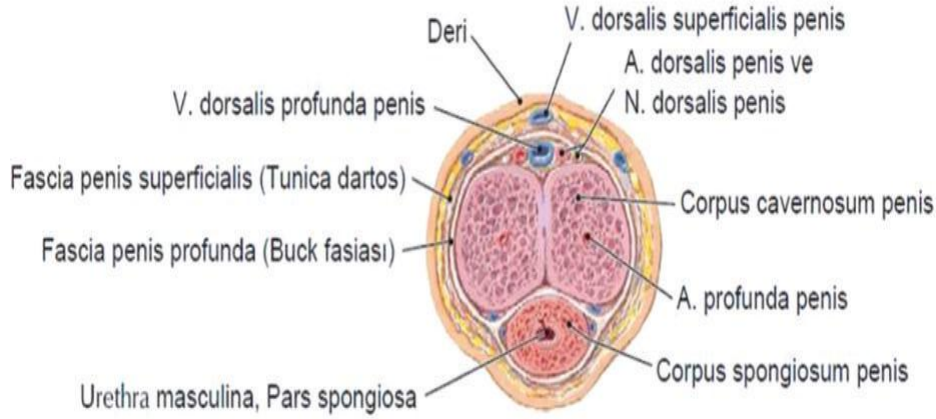
lif içerir. Üretral lakünler mukozal pleksus venleri ile devam eder ve periferde albugineanın venöz ağı ile birleşirler (86).

Hipospadiaslı penisin anatomisinde; sünnet derisi, üretra ve üretral spongiozumun görüldüğü kısımlar normal penise göre farklılık gösterir (85).

Hipospadiasta üretral tabakanın, üretral spongiozumun sinuzoidleriyle birlikte skarsız bir şekilde çok iyi vaskülarize olduğu görülmüştür (90). Bu özellikler, hipospadias tedavisinde üretral plak ve anormal korpus spongiozumun birlikte başarılı bir şekilde kullanımını açıklayabilir (91, 92).

1.1.6.2. Kan damarları

Penisin arteriyel kanlanması a. pudentalis internanın dalları olan a. dorsalis penis, a. profunda penis ve a. bulboüretralis tarafından sağlanmaktadır. A. pudentalis externanın yüzeysel ve derin dalları a. pudentalis internanın dalları ile anastomozlar oluşturup küçük dallar vererek penis cildini besler. Penisin venöz kanlanması üç şekilde olur. Dartosun altındaki yüzeysel ven ağıdır; v. dorsalis penis superfisialis ile v. saphena magna'ya drene olur. Buck fasyası derinindeki ven ağının yanı sıra korpus kavernozumlarından çıkan lateral, inferior ve superior emisser venler ile çok sayıda circumfleks penil ven v. dorsalis penis profunda'ya drene olur. Son olarak korpus kavernozumları ve korpus spongiozumu drene eden bir grup derin venler pudental pleksusa boşalır. Korpus spongiozum ise bulber ve üretral venlerden oluşan derin bir ven ağı aracılığı ile drene olur. Distal üretrayı ön ve arka üretral venler drene eder. Arka venler birleşerek pudental pleksusa veya bulber venlere boşalır. Üretral venlerin ön grubu sirkumfleks venöz sistemi oluşturmak üzere, sonradan posterior emisser venler ile birleşen birçok dala ayrılır (93).



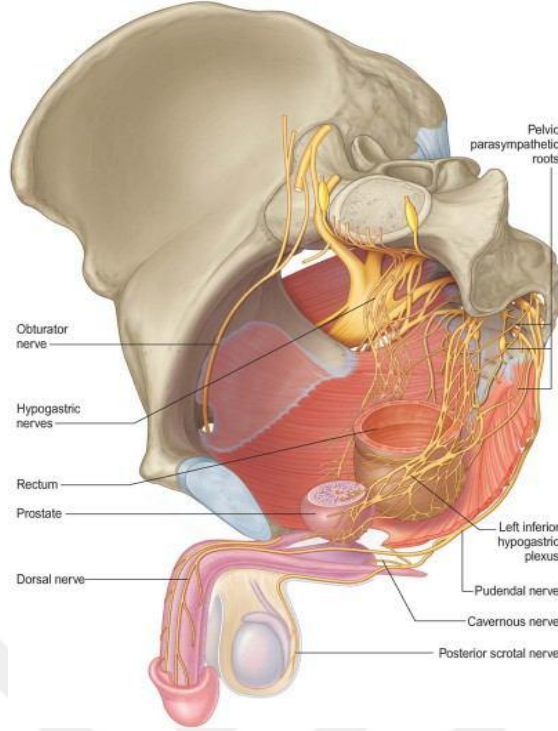
Şekil 9. Penisin korpus kavernozum, korpus spongiozum, arter ve ven görüntüsü (87)

1.1.6.3. Lenfatikler

Penil cildin lenfatik drenajı superfisiyal inguinal lenf bezlerine, glans ve distal üretranın lenfatik drenajı ise derin inguinal ve eksternal iliak lenf bezlerine boşalmaktadır. Korpus kavernozum ve proksimal üretra ise internal iliak lenf bezlerine drene olmaktadır (94).

1.1.6.4. Sinirler

Hipospadiası olan penisteki sinirler ve normal penisteki sinirler benzerdir. Pudental sinirden çıkan dorsal sinir iki demet halinde süperior ve lateralde üretra boyunca devam eder. Glans penis ve perigenital cildin afferent lifleri pudental sinir üzerinden gelir ve penisin ana duyusal sinirini oluşturur. Her iki krural cismi takip ederek ayrı ayrı gelen bu sinirler korpus kavernozum etrafında üretranın spongioz cisimle birleştiği noktaya kadar ilerler. Korpus kavernozumlar, kavernöz sinir üzerinden hem sempatik hem de parasempatik inervasyon alır. T11–12'den köken alan sempatik sinirlerin stimülasyonunda vazokonstrüksiyon, vezika seminalis ve prostat bezinde kontraksiyon oluşur. Parasempatik lifler ise S2–4'den köken alır ve pelvik pleksus üzerinden vazodilatasyon oluşturur (95).



Şekil 10. Penis innervasyonu (96)

1.1.6.5. Üretra

Dişi üretrasından birçok yönden farklı olan erkek üretrası, rölatif olarak daha uzun olmakla birlikte hem idrar hem de seminal sıvının dışarıya atılımını sağlayan ürogenital duktus yapısındadır (90).

1.1.6.5.1. Erkek üretrası

Erkek üretrası prostatik, membranöz ve kavernöz olmak üzere 3 bölümden oluşur. Prostatik bölüm, prostat bezi tarafından çevrelenir ve bu parçanın dorsal duvarından çıkan verumontanum ya da kollikulus seminalis lümen içine doğru genişler. Kollikulusun apeksinde kör bir açılım olan utrikulus prostatikus, embriyonik mülleriye duktusun kalıntısıdır. Duktus deferensin terminal parçası olan ejakulatuar duktuslar utrikülün her iki yanına açılır (90, 97).

Membranöz kısım en dar ve en kısa parçasıdır. Kavernöz parça penis boyunca devam edip glansın ucuna açılır. Başladığı noktada lümen genişler, daha sonra glansa kadar sabit çapta devam eder. Bu bölgede dorsoventral yönde tekrar genişler ve ‘fossa navikularis’ adını alır (97).

Prostatik üretra mesane ile benzer olarak transizyonel epitel ile döşelidir. Membranöz ve kavernöz parçalar fossa navikularisin üst kısmına kadar epitel

stratifkiye squamöz ya da psödostratifkiye epitelle döşelidir. Eksternal üretranın açıldığı noktada stratifiye squamöz epitel cildin epidermisi ile devam eder (90).

Prostatik üretra, üretral lümeni kapalı tutan prostatın fibromüsküler dokusu tarafından sarılıdır. Membranöz parça, derin transvers perineal çizgili kas liflerinin oluşturduğu sfinkter ile çevrelenir. Kavernöz parça, korpus kavernozum üretra tarafından sarılır (97).

Üretra lümeninin derinlerinde çok sayıda lakünler görülür. Lakünler tüp şeklinde dalları ile glandların içerisine girerler ve bu glandlar Littre glandlarıdır. Bunlar korpus spongiosumu da penetre edebilirler. Müköz sekresyon yaparlar (89).

1.1.6.5.1.1. Hipospadiyak üretra

Üretral orifis, normal üretral psödostratifkiye kolumnar epitelle döşelidir ve bu bölge mesanenin transizyonel epiteliyle benzemektedir. Üretral orifis distalindeki deltada non-kornifiye stratifiye squamöz epitel azalmıştır. Merkezi glikojenden zengindir ve merkezin lateralinde eozinofilik stratifiye squamöz epitel artmıştır. Üretral orifis distalindeki delta epitelinin altında küçük lenf damarları ve kan damarlarından zengin, ince fibrillerden oluşan konnektif doku yoğun olarak bulunur (98).

1.1.7. Embriyoloji

Erkeklerde dış genital organların oluşumu, genetik programları, hücre farklılaşmalarını, hormonal sinyal iletimini, enzim aktivitelerini ve dokunun yeniden yapılanmasını içeren karmaşık bir gelişim sürecidir (99, 100). Primitif çizgiden köken alan mezenşim hücreleri intrauterin gelişimin 3. haftasında kloakal katlantı (fold) oluşturmak üzere kloakal membranın etrafına doğru göç ederler. Bu katlantılar, kloakal membranın kranialinde orta hatta birleşerek 6. haftaya doğru genital tüberkülü (fallus) oluştururlar (101-106) (Şekil 11).

Homeobox A13 ve HOXD13 genital tüberkülün gelişimini kontrol eder. HOXA13 ekspresyon defekti insanda, bacaklarda malformasyon ve hipospadias ile ortaya çıkan El-Ayak-Genital Sendromu (Hand-Foot-Genital Syndrome)'na neden olur (107, 108).

Sonic Hedgehog, FGF8, FGF10, BMP4, BMP7 ile WNT5A sinyal molekülleri embriyon gelişiminin erken safhasında genital tüberküle eksprese olurlar (16, 105).

Sonic Hedgehog ürogenital plak ve kloaka membranının endoderminde eksprese edilir. SHH yoksun farelerde gelişimin başında genital tüberkül gelişiminin durduğu gösterilmiştir. SHH, mezenşimal hücre proliferasyonu oluşturarak yüzey ektodermine etki eder ve genital tüberkülün büyümesini sağlar. Farelerde SHH sinyalinin olmaması, genital tüberkül mezenşimal hücre siklusunun G1 fazını uzatarak genital gelişimde % 75 azalmaya yol açar (105).

Genital tüberküle SHH olmadan da BMP4, BMP7 ve WNT5A'nın ilk ekspresyonları olabilir. Ancak ürogenital plağın uzaması ve genital büyümenin olduğu dönemde bu genlerin ekspresyonları için SHH varlığı gerekmektedir (16, 105).

Embriyonda hücrelerin ne zaman apoptoza gireceğini BMP4 belirler. BMP4 reseptörü olan BMP1A'nın yıkımı ya da BMP antagonisti Noggin'in aşırı ekspresyonu hipospadias neden olur (103, 108).

Ürogenital plağın uzaması ve üretral kapanmada mezenşimal BMP7 ekspresyonu rol oynar. FGF ve Ephrinde üretral kapanmada rol oynayan sinyal molekülleri (105).

Sonic Hedgehog genital tüberkül gelişiminin erken safhalarında rol oynadığı gibi, penil üretranın oluşumunda da görev alır. FGF10 olmayan farelerde, başlangıçta genital tüberkül gelişimi normal olsa bile, ciddi glans disgenezisi ve üretra hasarı görülür. FGF10, üretra katlantısı mezenşiminde SHH eksprese eden ürogenital plağa komşu bölgede eksprese olur. SHH'a karşı yönlendirilen antikorlar genital tüberkül mezenşimindeki FGF10 ekspresyonunu değiştirebilir. Bu durum SHH'un erken dönem genital tüberkül gelişimindeki rolünün yanı sıra, FGF10 ekspresyonunun düzenlenmesinde de görevli olduğunu göstermektedir. Farelerde yapılan çalışmalarla fallusun ventralinde orta hat ektodermdeki SHH sinyalinin penil üretranın erken dönemdeki oluşumunu sağlamak için de gerektiği aksi takdirde hipospadias geliştiği gösterilmiştir (105).

Böylece eksternal genital gelişim genital tüberkülün ortaya çıkması ile başlar. Altıncı haftada kloakal membran, ürogenital membran (ürogenital sinüs) ve anal

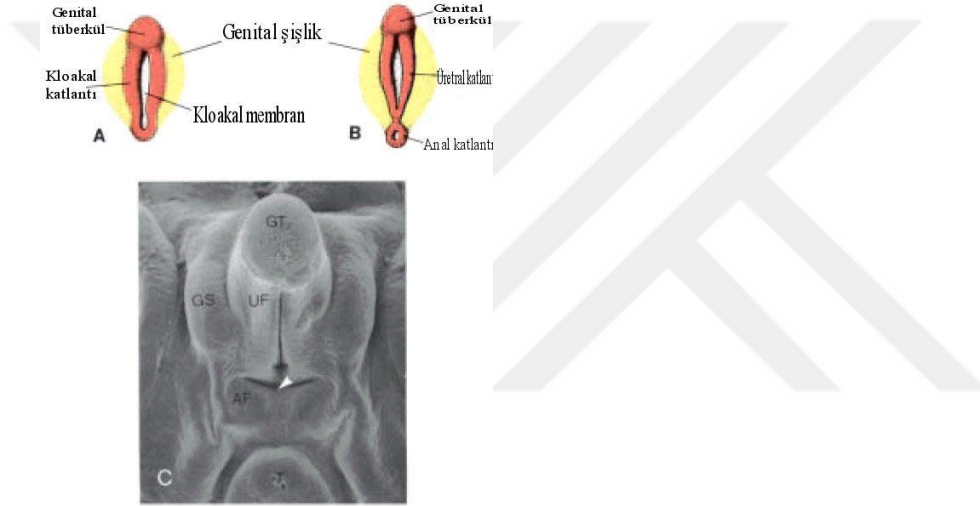
membranlara ayrılırken, kloakal katlantılar da önde üretral (ürogenital) katlantı arkada anal katlantılara bölünür. Ürogenital sinüsün üst ve en büyük parçasından mesane gelişirken, pelvik parçasından fallik parçanın da katkısıyla posterior ve membranöz üretra gelişir. Son parça ürogenital sinüsün fallik parçası penil üretra gelişiminde rol oynar. Sekizinci gestasyonal haftaya kadar üretral katlantıların her iki yanında genital şişlik (genital swellings) adı verilen bir başka çift yükselti de belirmeye başlar. Bunlar erkekte skrotal şişkinliği (scrotal swellings), kadınlarda ise labia majoru oluşturur (105). Ürogenital sinüsün (ürogenital membran) dışa, yani ventral fallik yüzey içine doğru uzamasıyla primer üretral oluk (urethral groove) oluşur. Ürogenital sinüsün anterior duvarları endodermal üretral plağı (urethral plate) oluşturmak üzere birleşirler. Daha sonra ürogenital sinüs üretral oluğu tamamlamak için üretral katlantılardan ayrışır. Onikinci haftaya kadar erkek ve kadın embriyonunda dış genital organlar benzerdir ve dış genital organlara bakarak cinsiyet ayrımı yapmak çok zordur. Bu döneme farklanmamış evre adı verilir (101-106).

Üçüncü ayın sonunda penil üretrayı oluşturmak için her iki üretral katlantı üretral plağın üzerini örterek birleşirler (99, 103) (Şekil 12).

Erkeklerde dış genital organların gelişimi, fetal testislerden salgılanan androjenlerin etkisi altındadır ve gestasyonel 9–12. haftalarda artık fallus (fetal penis) adını almış olan genital tüberkülün hızlı uzamasıyla karakterizedir (104, 109). Bu uzama sırasında, fallus üretral katlantıları öne doğru çekerek üretral oluğun uzayan fallusun kaudal kısmına, koronaya kadar gelmesi sağlanır. Ancak, glans olarak bilinen en uç noktasına ulaşamaz. Bu oluğun epitelyal yüzeyi endodermal kökenlidir. Üretral oluğun endodermal kenarlarının birleşmesiyle üretral plak oluşur. (Şekil 13). Üçüncü ayın sonunda, iki üretral katlantı bu üretral plak üzerinde kapanarak penil üretrayı kanalize eder (99, 103). Oluğun ektodermal kenarlarının birleşmesi de skrotal ve penil median raphe'yi oluşturur (102). Bu kanal fallusun ucuna kadar uzanmaz. Üretranın en distal kısmı glanüler üretra, muhtemelen hormonal ve lokal faktörlerin etkisiyle içe doğru penetre olarak, kısa bir epitelyal kordon veya ek (epithelial tag) oluşturularak tamamlanır. Bu kordonun içinde daha sonra kanal oluşumuyla glans penis ventral olarak yarıılır ve eksternal üretral meatus meydana gelir. Bunun fossa navikülariste proksimal üretrayla birleşmesiyle tam bir üretra oluşmuş olur (99, 103). Bu sürece ektodermal içe büyüme teorisi (ectodermal

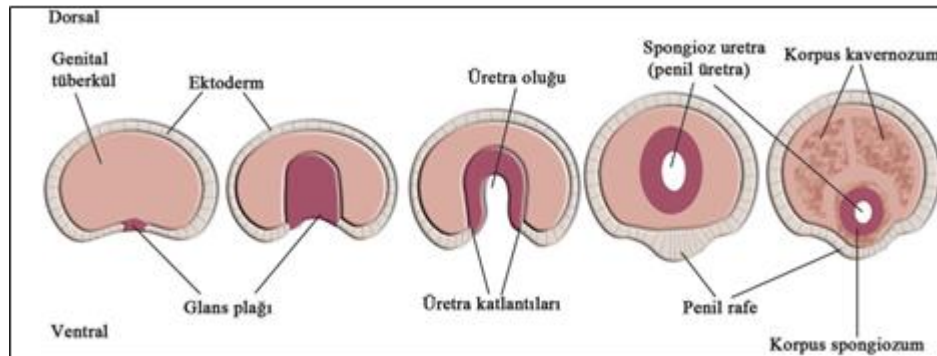
ingrowth theory) denir. Skuamöz epitelyumla örtülü glanüler üretranın oluşumu tartışmalıdır. Diğer bir teoriye göre glanüler üretra da, bulber ve penil üretranın gelişimine benzer şekilde gelişir. Ürogenital sinüs epitelyumunun yayılımı ile oluşan glanüler üretra, skuamöz epitelyuma differansiye olur. Bu teoriye, endodermal hücresel farklılaşma (endodermal differentiation theory) denir (110) (Şekil 14).

Prepüsyum, üretral plağın ektodermal parçasından oluşur. Gestasyonun 8. haftasında penis şaftının her iki tarafında prepüsyal katlantılar görülmeye başlar. Bu yapılar üretra ile beraber büyüyerek penis şaftını sarar. Ancak hipospadiyak peniste üretra ventral yüzde inkomplet olduğundan kesintiye uğrar. Prepüsyal dokular ventral yüzde gelişmezken dorsal yüzde normalden daha fazla gelişir (1).

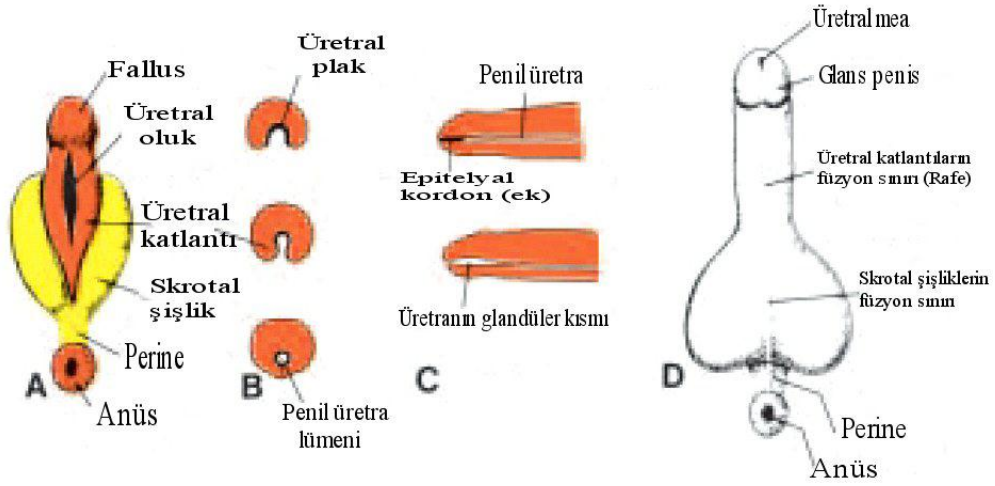


Şekil 11. Gelişimin 3-7. haftaları. Farklanmamış evre (104)

A; 3. hafta B; 6. hafta C; 7. hafta. İnsan embriyosunun scan elektron mikrofafisi. AF; Anal katlantı, GS; Genital şişlik, GT; Genital tüberkül, UF; Üretral katlantı.

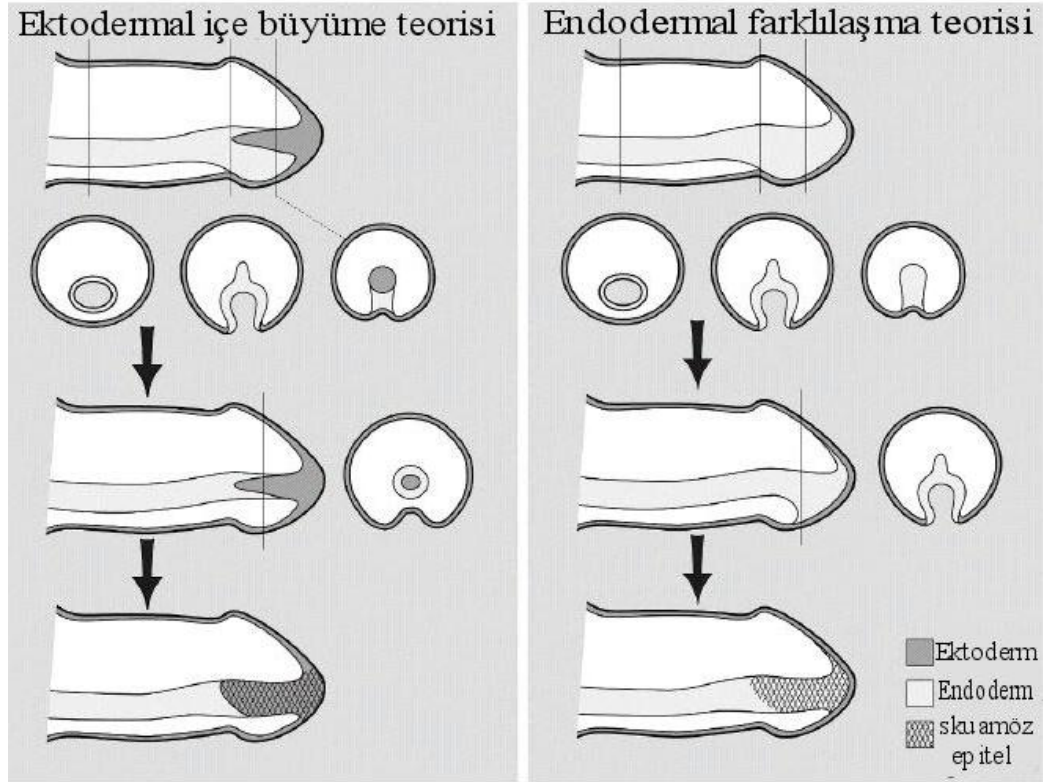


Şekil 12. Gelişimin 4-12. haftaları. Penil (spongioz) üretranın transvers kesitlerinin görünümü (86, 87)



Şekil 13. Gelişimin 9-12. haftaları

A: Dokuz-onuncu haftada erkek dış genital organlarının gelişimi; üretral oluğun her iki yanında üretral katlantılar yer almaktadır. B: Penil üretranın oluşumu; üretral plate üzerinde üretral katlantılar birleşmektedir. C: Glanüler üretranın gelişimi ve fossa navikulariste proksimal üretrayla birleşmesi. D: Yenidoğanda dış genital organlar (104).



Şekil 14. İnsan penil üretra gelişim teorisi (104)

Ektodermal içe büyüme teorisi eski olandır; glanüler üretranın, ektodermal epidermisin içeri doğru kanalize olmasını anlatır. Endodermal farklılaşma teorisi yakın zamanda tanımlanmış olandır.

1.1.8. Kordi Deformitesi

Kordi deformitesi, ventral yüzde mezodermal kökenli dokuların gelişim aksaklığı sonucu oluşur. Penisteki eğriliğin dört nedenden kaynaklandığı ileri sürülmektedir.

- 1- Hipoplastik distal üretranın deri ve deri altına fibrotik yapışıklığı,
- 2- Tunika albuginea ve dolayısıyla korpus kavernozumların, penisin ventral ve dorsal yüzlerinde farklı hızlarda büyümesi,
- 3- Üretranın kısa ve fibrotik olması (hipospadias olmadan kordi olması),
- 4- Buck's fasyası ve Dartos fasyasının fibrozisi (gerçek kordi).

İlk iki nedene bağlı oluşan kordiler hafif iken diğer iki nedenden dolayı oluşan kordiler daha ağırdır. Kordi sıklığı hipospadiasın ağırlığına göre değişmektedir. Distal hipospadiasların yaklaşık % 10'unda 30 derecenin altında eğrilik saptanmıştır (110). Proksimal hipospadiaslı olgularda % 20'ye yakın bir oranda kordi görülmezken % 50'den fazla oranda 30 dereceden fazla eğrilik görülmektedir (111). Kaplan ve ark. (112)'nin yaptığı bir çalışmada fetal hayatta kordinin normal penil gelişim sırasında görülen bir durum olduğu gösterilmiş ve penil gelişimin duraksaması ile kordi arasında bağlantı kurulmuştur.

1.1.9. Penil Torsiyon

Korpus kavernozumların ya da sadece glansın vertikal ekseninde rotasyonuna denir. Çoğunlukla saat yönünün tersine doğru rotasyon mevcuttur (113). Sıklıkla kordi ve hipospadiasla birlikte görülmektedir. Sıklığı farklı oranlarda bildirilse de izole penil torsiyon çok nadirdir (114).

1.1.10. Hipospadiasa Eşlik Eden Ek Anomaliler

Hipospadiasa en sık eşlik eden patolojiler % 7-13 ile inmemiş testis, % 4-15 ile inguinal hernidir (115-117). Khuri ve ark. (115) yaptıkları 1070 vakalık araştırmalarında, inmemiş testisin % 9,3 inguinal herninin ise % 9,1 oranında hipospadias birlikteliğini ortaya koymuşlardır. Eksternal üretral meatus ne kadar proksimal yerleşimli ise hipospadiasla birlikte inmemiş testis ve inguinal herni görülme birlikteliği de o kadar yükselir. Proksimal hipospadias vakalarında hem doğumsal inmemiş testis hem de edinsel inmemiş testis sıklığı artmıştır (118).

Hipospadiasta üretral açıklık ne kadar proksimalde ise cinsiyet gelişim bozukluklarının eşlik etme olasılığı da o kadar artmıştır. Hipospadiasla birlikte inmemiş testis de mevcut ise bu oran daha da yükselir (119). Hipospadiasa eşlik edebilecek cinsiyet gelişim bozuklukları gonadal disgenezi (miks, salt) ve gerçek hermafroditizmdir (120).

Sekaran ve ark. (121) prematurite ve intrauterin gelişme geriliği (İUGG) nin hipospadiaslı olgularda görüldüğünü göstermişlerdir. Prematürite ve İUGG sıklığının özellikle proksimal hipospadias ile inmemiş testis varlığının birlikte görüldüğü olgularda yalnızca proksimal hipospadias olan olgulara göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Hipospadiaslı olgularda hafif-orta derecede vezikoüretral reflü (VUR) , hafif-orta derecede hidronefroz (üreteropelvikbileşke darlığı) ve minör rotasyon anomalileri (malrotasyon, pelvik böbrek) görülmektedir (122-124). Hipospadiasın derecesi ile eşlik eden anomali sıklığı arasında ilişki yoktur (125). Fakat penoskrotal ve perineal hipospadiaslar, başka organ sistemleriyle ilgili anomalilerle birlikte görüldüğünde, üst üriner sistem anomalilerinin sıklığı % 50'lere çıkmaktadır (115).

Prostatik utrikül, Müller kanalının embriyonik kalıntısı olup yenidoğanda % 4 yetişkinlerde % 1 sıklıkta görülür (126). Prostatik Utrikül üretra ile bağlantılı halde ve genişlemiş prostatik utrikül şeklinde olabilir. Doğumsaldır ve sıklıkla hipospadias, inmemiş testis ve böbrek agenezisi ile birlikte görülür. Hipospadias ve cinsel gelişim bozukluğu olan olgularda % 11-14 kadarında prostatik utrikül görülebilmektedir. Perineal hipospadiasla birlikte görülme sıklığı % 50 dir (127).

Hipospadiasla birlikte kalp-dolaşım sistemi anomalileri (% 0,7), kas-iskelet sistemi anomalileri (% 5,6), mide barsak kanalı anomalileri (% 3,9) ve nörolojik anomalilerinde (% 2,8) görüldüğü bildirilmiştir (116).

1.1.11. Hipospadias Anomalisinin Kliniği

Distal hipospadiaslı çocukların aileleri sıklıkla çocuklarının iki idrar deliğine sahip olduklarını sanırlar. Aileye glans üzerinde idrar deliği izlenimi veren görünümün kör bir çukurluktan ibaret olduğu açıklanmalıdır. Penisin sırtında toplanmış ve ventral yüzde defektif olan sünnet derisi yukarı çekildiğinde idrar deliği kolayca görülür. Sünnet derisinin normal gelişimini tamamlayarak penisi tümüyle örttüğü ve doğal olarak anormal üretral meatusu sünnete kadar gizleyen hipospadias

olgularında vardır. Bu tip olgular genellikle glanüler veya subkoronal tiptedirler ve üretral meatus normalden çok geniştir (megameatus) (128-130).

Fizik muayenede üretral meatusun yerinin saptanması dışında dikkat edilmesi gereken diğer noktalar: kordi deformitesinin varlığı ve derecesi, üretral meatusun distalindeki derinin özellikleri (mobilitesi ve kalınlığı), penil torsiyonun olup olmadığı, penisin ve glansın büyüklüğü, testislerin büyüklüğü ve yerleşimidir. Hipospadiaslı çocuklar üretral meatusun anormal yerleşimi nedeniyle ayakta işerken, idrarın çocuğun paçalarını ıslatması, idrarın ince bir kalibreyle akması veya fiskiye tarzında olması gibi sorunlar yaşarlar. Kordi mevcutsa penis öne doğru kıvrık olduğundan, çocuğun ayakta işerken bacaklarını ıslatmadan işemesi zaten mümkün değildir. İleri derecede kordisi olan çocuklar ereksiyon sırasında ağrı duyduklarını belirtirler. Kordi deformitesi düzeltilmediği takdirde erişkin yaşlarda cinsel ilişki ve inseminasyonla ilgili sorunlar da yaşanır. Penisin sırtında toplanmış bir sünnet derisi, yassı bir glans ve kordi nedeniyle öne doğru bükülmüş bir penisin yarattığı olumsuz kozmetik görünüm, çocuğun psikoseksüel yaşamını olumsuz biçimde etkileyecek ve bu aktiviteden uzak durmasına yol açacak bir etken oluşturmaktadır (128-130).

Cerrah ilk muayenede, penisin ventralindeki derinin kalitesini, eksternal meatusun lokalizasyonunu, kordi olup olmadığını, penisin uzunluğunu ve sünnet derisini inceleyerek tedaviye yönelik bir plan oluşturmalıdır. Operasyon öncesinde testosteron (intramüsküler veya topikal) veya hCG kullanılması penisin boyunun uzamasını ve penil derinin artmasını sağlamakta ve meydana gelen bu değişiklikler ameliyatı kolaylaştırmaktadır. Hipospadiaslı çocukların, üretral meatuslarına normal bir yerleşim kazandırılana kadar sünnet edilmemeleri çok önemlidir. Meatusu normal lokalizasyonda ancak 'yarım sünnetli' veya 'peygamber sünnetli' doğan bebekler kordi deformitesi açısından değerlendirilmek üzere mutlaka bir çocuk cerrahına danışılmalıdırlar (128-130).

1.1.12. Cerrahi Tedavi Zamanı

Cerrahi zamanlama planlanırken; penis boyutu, hipospadiasın tipi, kordinin varlığı, çocuğun cerrahiye tepkisi, anestezi riski, tuvalet eğitimi, yaş, genital cerrahinin psikolojik etkileri göz önünde bulundurulmalıdır (131, 132).

Penis boyutu genellikle erken cerrahi onarım için bir engel değildir. Penis boyutu bir yaşında iken ortalama olarak okul öncesi çocuğun penis boyutundan yalnızca 0,8 cm kısadır (131).

Hayatın ilk 6. ayından sonra cerrahi ve anestezi riski yönünden daha büyük çocuklarla fark olmadığı gösterilmiştir (131).

Çocuğun tuvalet eğitimi genelde 18. aydan sonra başlar. Bu nedenle hipospadias onarımı için en uygun yaşın 6-18 ay arası olacağı, eğer bu dönem geçmişse uygun zamanın 3-4 yaş olacağı bildirilmiştir (131).

Psikolojik açıdan bakıldığında 6-15. aylar arası dönem eğer ebeveyn refakati sağlanırsa daha uygun görülmüştür (133).

Mümkün olduğunca erken yapılan hipospadias onarımı psikolojik olarak çocukta sağlıklı bir vücut algısı oluşmasını sağlar. Okul çağında hipospadiaslı çocukların atipik cinsiyet davranışı gösterdikleri bildirilmiştir (134).

Otuzuncu aydan 5,5 yaşına kadar olan çocuklar cerrahi sırasında fiziksel zarar verileceğini, cinsel organının tamamen kesileceğini, işlev görmeyeceğini, cinsiyetlerinin değiştirileceğini düşünerek kaygı yaşarlar. Bu nedenle 30. aydan önce hipospadias onarımı yapılması önemlidir (133).

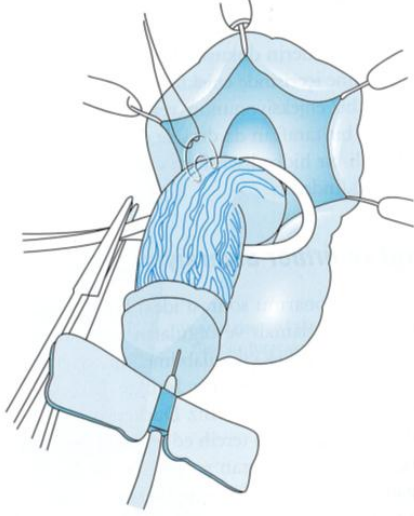
Operasyon sonrası fistül gelişmesi halinde veya ikinci bir onarım gerektiren ağır vakalarda ikinci operasyon en erken 6 ay sonra yapılmalıdır (135).

Erken yaşta yapılan cerrahinin avantajları; kateterin daha kısa sürede çıkartılması, hijyenin kolay sağlanabilmesi, postop bakım kolaylığı, analjezi gereksiniminin az olması, çocuktaki anksiyetenin azalması dolayısıyla anne ile çocuk arasındaki ilişkinin daha iyi olması olarak sıralanabilir (136-138).

1.1.13. Cerrahi Tedavi

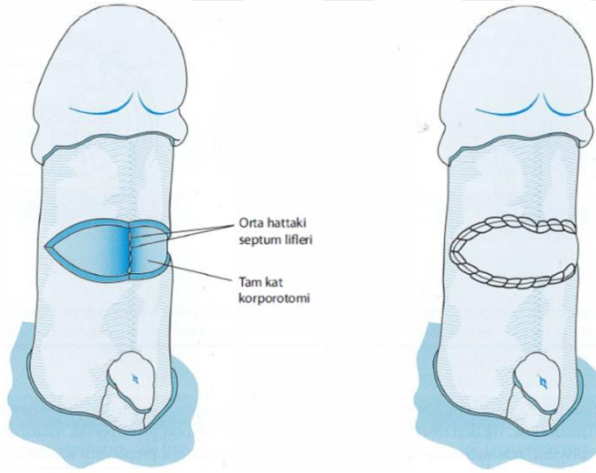
Hipospadias onarımının aşamaları; birlikte olan ventral eğriliğin düzeltilmesi, üretroplasti, neoüretra ile üzerini örten deri arasına bir doku getirilmesi, prepüsyumun çıkarılması veya rekonstrüksiyonunu içerir.

1.1.13.1. Penis eğriliğinin düzeltilmesi



Şekil 15. Penis düzleştirmede dorsal plikasyon (139)

Buck's fasyası eğriliğin en fazla olduğu bölgenin karşısına gelen yerde orta hattın kesilir. Resimde görüldüğü gibi bir 6/0 Polydioksanone (PDS) dikiş yerleştirilir. Ereksiyon tekrarlanarak eğriliğin kaybolduğu doğrulanır.



Şekil 16. Penis düzleştirmede ventral korpus kavernozumun kesilerek greftlenmesi (139)

Eğriliğin olduğu saat 3 ve 9 pozisyonundan tunika albugineaya transvers bir kesi yapılır. Alttaki spongiöz dokuya dokunulmaz. Greft yara kenarı boyunca ventral korpus yüzeyini genişletecek şekilde dikilir (139).

1.1.13.2. Penil Torsiyonun Düzeltilmesi

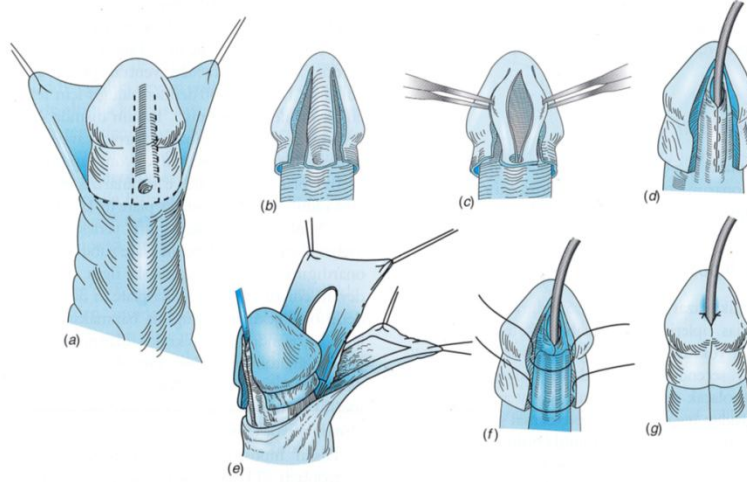
Yapılan bir çalışmada penis “deglove” edildikten sonra sünnet dikişleri penisi düzelterek şekilde yerleştirilmiş ve penisi karşı yönde dönderecek dartos flebi yerleştirilmiştir (110). Hsiesh ve ark. (113)’nin uyguladığı bir diğer tedavi şekli korpusun iki ayrı noktadan plikasyonudur.

1.1.13.3. Üretroplasti

Distal Üretroplasti: Tüm hipospadias tiplerine uygulanabilecek tek bir onarım yöntemi yoktur ve cerrahlar geleneksel olarak üretroplasti seçeneklerini distal ve proksimal defekte yönelik olarak sınıflandırır.

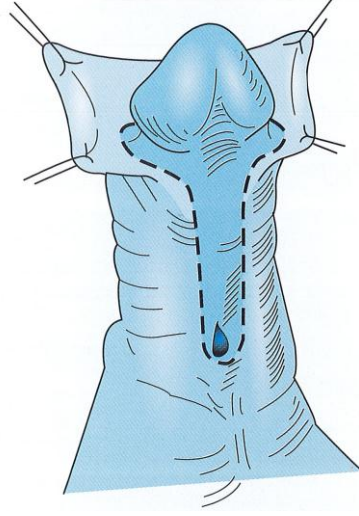
Distal hipospadias için tübularize insize plate üretroplasti (TIPU)’nin önemli adımları Şekil 17’de gösterilmiştir.

Meatal advancement and glanuloplasti incorporated (MAGPI); Glanüler ve seçilmiş bazı koronal meatuslu olgulara uygulandığında uzun süreli başarı ve güvenli kozmetik sonuç sağlar.



Şekil 17. Tubularize insize plate üretroplasti (TIPU) (139)

Proksimal Üretroplasti Tübularize insize plate üretroplasti hipospadias onarımının avantajları deri flepleri kullanmadan meatoplastinin yapılması, normal kozmetik görünümlü vertikal yarık şeklinde güvenilir bir neomeatus oluşturulabilmesidir (Şekil 18).



Şekil 18. Proksimal tubularize insize plate üretroplasti (TIPU) (139)

Evreli Üretroplasti: Üretral platein tübularize edilemediği durumlarda (penis eğriliğinin fazla olması, insize edilen platein sağlıklı olması) durumlarında uygulanır. Dorsal prepüsyumdan ventrale transfer edilen prepüsyum, deri flepleri ve buccal greftler ile gerçekleştirilir (139).

1.1.14. Hipospadias Ameliyatları Sonrası Görülen Komplikasyonlar

1.1.14.1. Erken Dönem Komplikasyonlar (140-144)

Ameliyat sonrası ilk 7-10 günde görülen komplikasyonlardır.

- 1- Kanama ve hematom
- 2- Ödem
- 3- Yara yeri enfeksiyonu
- 4- Cilt nekrozu
- 5- Flep veya greft nekrozu
- 6- Yara ayrılması
- 7- Fistül oluşumu
- 8- Kateter ile ilgili sorunlar
- 9- Diğer (penil ereksiyon ve mesane spazmları)

1.1.14.2. Geç Dönem Komplikasyonlar (145)

- 1- Ürokütanöz fistül oluşumu
- 2- Üretral darlık
- 3- Üretral divertikül
- 4- Kılılı üretra
- 5- Meatal darlık
- 6- Kordi ve şekil bozuklukları
- 7- Psikoseksüel sorunlar

En sık görülen geç dönem komplikasyonu fistül gelişimidir (145, 146). Bakal ve ark. (145)'nin yaptığı bir çalışmada proksimal hipospadias olgularında geç dönem komplikasyonlarının daha sık görüldüğü gösterilmiştir. Hipospadias ne kadar proksimal ise fistül görülme ihtimalinin arttığı ve bu oranın % 33'lere kadar çıktığı vurgulanmıştır.

1.2. Hedgehog Sinyal Yolağı

Günümüzde embriyonik gelişimin temel düzenleyicilerinin HH genleri olduğu kabul edilmektedir. HH proteinleri, doku paterninin oluşumunu, hücre proliferasyonunu ve diferansiasyonunu yönetmektedir. Sineklerde HH sinyali, doğru segmentleşmeyi ve kanatların gelişimini kontrol ederken vertebralılarda sol-sağ asimetrisini, ekstremitelerin, iskelet sisteminin, kas yapılarının, gözlerin, akciğerlerin, dişlerin, sinir sisteminin ve barsakların doğru biçimde gelişimini, sperm ve kıkırdak diferansiasyonunu indüklemektedir. HH sinyal yolağındaki defektler sonucunda fetusta beyin, yüz ve diğer orta hat anomalileri meydana gelebilir (147-149).

Christiane Nusslein-Volhard ve Eric F. Wieschaus 1970'lerin sonlarında, Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda *Drosophila melanogaster*'deki (meyve sineği) mutasyonları araştırırken embriyogenik gelişim üzerine doğrudan etkili 50'den fazla farklı gen göstermişlerdir. Bu genlerden birisi mutasyona uğradığında, larva, kirpidekilere benzer dikensi çıkıntılar gösteren bir örtü geliştirmiş ve Hedgehog (kirpi) terimi buradan köken almıştır (150, 151).

1993 yılında vertebralılarda 3 paralog HH geni bulunduğu belirlenmiş, SHH (o zamanki, Sega firmasının video oyun kahramanından esinlenilerek), IHH ve DHH

olarak isimlendirilmiştir. Sonic hedgehog, hedgehoglar içinde embriyo ve erişkin dokularında en güçlü ve en sık eksprese olandır (152).

Hedgehog sinyalleri farklı işlevlere sahiptir. Morfogen etkileri bir hedef alanda, doza bağımlı olarak, hücrelerin farklı olabilen kaderlerinin belirlenmesinde etkilidir. Mitogen etkileri ise organ gelişimini sağlayan hücre proliferasyonunu düzenlerken ortaya çıkmaktadır (150-153).

Erişkin hayatta HH yolağı aktif kalarak stem cell (SC) işlevinin sürmesinde, doku onarımı ve regenerasyonunda görev alır. Böylece doku homeostazının sağlanmasında HH sinyal yolağı kritik bir rol oynamaktadır (154).

Çalışmalarda, HH yolağındaki PTCH1 geninin tümör süpresör özelliği, SMO geninin de onkogen özellikleri olduğu gösterilmiştir. Düzensiz HH sinyal aktivitesinin memelilerde bazal hücreli karsinoma, medulloblastoma, pankreas, meme, prostat ve akciğer kanserlerinin etiolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir. HH yolağı aktivitesinin çeşitli moleküllerle inhibisyonu yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu yolağın stimülasyonunun ise anjiogenez ve yara iyileşmesinin uyarılmasında faydalı olabileceği görülmektedir (154, 155).

Vertebralılarda olgun HH proteinleri, hücre membranına bağlı reseptörler olan PTCH1 ve PTCH2'nin ligandlarıdır ve bu reseptörlere bağlandıklarında HH sinyal yolağı aktifleşmektedir. HH proteini başlangıçta C-terminal proteaz bölgesi ve N-terminal sinyal ünitesi olan prekürsör molekül biçimindedir. Daha sonra ayrışarak HHNp olarak isimlendirilen aktif sinyal bölgesi salınmaktadır. C-terminal bölümü molekül içi kolesterol transferi oluşturmakta, C-terminal kolesterol ile modifiye N-terminal sinyal bölgesi oluşmaktadır. Bu kolesterol modifikasyonu HH'un hücre membranına tutunmasını sağlamakta, ayrıca son adım olan ve asilasyon olarak isimlendirilen, N-terminal bölgesine palmitoil eklenmesini tetiklemekte, tam aktif HHN meydana gelmektedir. HH asilasyonu ve aktif HH oluşumu için gerekli enzim endoplazmik retikulumda bulunan Rasp geni tarafından kodlanmaktadır. HH daha sonra, Dispatched olarak isimlendirilen transmembran taşıyıcı proteini aracılığıyla hücreden salınmaktadır. Embriyonik yaşamda HH proteinlerini (ligandlarını) sentezleyen hücreler hedef hücrelerden farklı hücrelerdir. Bu hedef hücreler HH proteinlerini sentezleyen hücelere komşu olabileceği gibi uzak lokalizasyonda da bulunabilmektedirler (155-157).

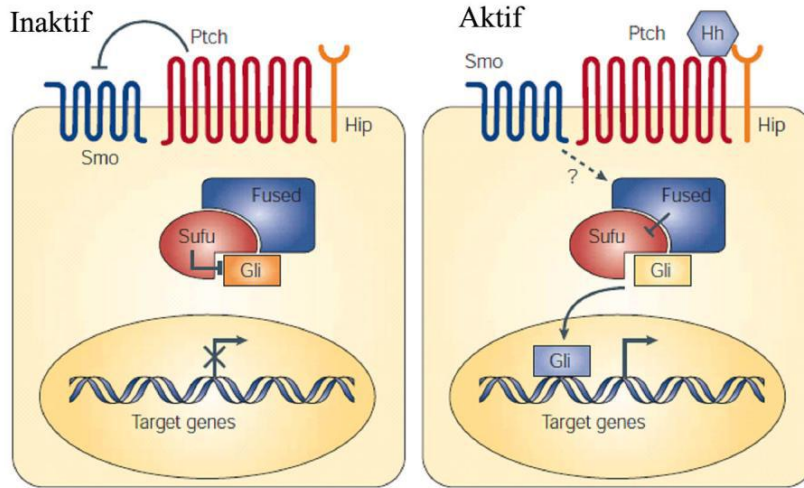
İnsanda HH sinyal yolağı, HH ligandının hedef hücrede PTCH1'e bağlanmasıyla aktifleşmektedir. PTCH1, ligand olmadığında silyumların (hücre membranının kuyruk benzeri çıkıntıları) alt kısmında bulunmaktadır. Silyumlar ökaryotik hücrelerde bulunmakta, hücre diferansiyasyonu ve polaritesini kontrol eden sinyalleri taşıyan bir yapı olarak işlev görmektedir. (158-160). HH ligandının yokluğunda PTCH reseptör benzeri bir başka protein olan SMO'u baskılamaktadır. SMO hücrede 3 farklı şekilde yer almaktadır: İnaktif form (SMOA), inaktif ve silyuma bağlı form (SMOB) ve SMOB'den köken alan aktif form (SMOC). PTCH, SMO agonisti olan endojen intraselüler bir küçük molekülün SMO'ya bağlanmasını engellemekte ve bu molekülü hücre dışına taşımaktadır. HH proteinin PTCH'ye bağlanmasıyla PTCH aktivitesi kaybolmakta, PTCH'nin SMO üzerindeki supresor etkisi ortadan kalkmakta, SMO aktifleşmekte ve HH sinyalini sitoplazmaya iletmektedir (150-161). HH sinyali Cubitus interruptus (Ci) /GLI "zinc-finger" ailesi transkripsiyon faktörlerinin aktivatör ve represör formlarının arasındaki dengedeki değişiklikler aracılığıyla iletilmektedir. Drosophila'da Costal 2 (COS2), Fused (FU), Suppressor of Fused (SUFU) ve Ci transkripsiyon faktöründen oluşan bir protein kompleksi aracılığıyla iletilmektedir. Daha yüksek organizmalarda COS2 ve FU bulunmamakta ancak SUFU sinyal iletiminde önemli rol oynamaya devam etmektedir. GLI transkripsiyon faktörleri; transkripsiyon aktivatörleri olan GLI1 ve GLI2 ile transkripsiyon represörü olan GLI3' den meydana gelmektedir. Aktif HH sinyali ile GLI1 ekspresyonu arasında güçlü bir bağımlılık olduğundan GLI1 bu yolağın aktivasyonunda en önemli gösterge olarak kabul edilmektedir (162-164).

Paralog HH ligandı yoksa PTCH, SMO aktivitesini bloke etmekte, GLI proteinleri proteolize uğrayarak büyük oranda GLI3'den olmak üzere represör GLI oluşmaktadır. Bu da HH hedef genlerini baskılamaktadır. HH proteininin (ligandının) PTCH'e bağlanması ise PTCH'nin SMO üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırmaktadır. Aktifleşen SMOC silyum membranına bağlanmaktadır. SMOC, protein kinaz A (PKA)'yı baskılamakta, böylelikle GLI proteinleri yolak aktif değilken kompleks oluşturdukları SUFU kompleksinden ayrılmakta ve aktifleşmektedir. GLI aktivasyonu çeşitli düzeylerde SUFU, renin (REN), PKA, glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) gibi inhibitörler ve dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1 (DYRK1), raspberry (RAS) ve serin/treonin

protein kinaz (AKT) gibi aktivatörlerin oluşturduğu fosforilasyon aracılığıyla düzenlenmektedir (155, 165).

Aktif GLI transkripsiyon faktörleri hücre nükleusuna bağlanarak HH'a yanıt verecek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır (159, 160, 162, 166-168).

Memelilerdeki HH hedef genleri GLI1, PTCH1, Hedgehog interacting protein (HHip) ve diğer Cyclin D, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC), B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BMI1), B cell lymphoma 2 (BCL2), vasküler endothelial growth factor (VEGF) ve Snail gibi farklı hücelere özgü genlerdir. Paralog HH sinyal yolağı; doku morfogenezi ve homeostazı, organogenez ve erişkinlerde kök hücre yenilenmesinde önemli rol oynayan Wnt/ β -catenin, TGF- β /BMP, Notch ve FGF yolakları gibi birçok sinyalle sıkı bir ilişki içerisinde (165, 169).



Şekil 19. HH sinyal yolağı (170)

Hedgehog proteinleri salgılandıktan sonra hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır. HH ligandının yokluğunda, yolak inaktiftir; transmembran reseptör olan PTCH, SMO ve diğer transmembran proteinlerinin aktivitesini inhibe eder. Bu durumda, GLI transkripsiyon faktörlerinin nükleusa girmesi FU ve SUFU tarafından önlenir. Sonuç olarak HH hedef genlerinin transkripsiyonu engellenir. Yolağın aktivasyonu HH ligandının PTCH reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Ligand bağlanmasıyla SMO aktifleşir ve hücre içindeki diğer sinyal yolaklarını uyararak GLI1'in nükleusa geçmesini ve transkripsiyonu bağlamasını uyarır (170).

1.2.1. Embriyogenezde Hedgehog Sinyalinin Rolü

Hedgehog sinyal yolağı, embriyonik gelişimin pek çok aşamasında görev almaktadır. Drosophila larvasında mutant HH proteini, vücut ekseninin gelişimini bozmaktadır. Bu keşiften sonra, HH'ların hücre büyümesi ve şekillenmesindeki rolü daha fazla anlaşılmaya başlamış ve özellikle uzuv gelişimindeki rolü çokça çalışılmıştır (171).

Hedgehog proteinleri doku organizasyonu ve diğer farklı gelişimsel olaylarda önemli rol oynamaktadır. Üç HH geninin her biri, gelişimsel olarak düzenlenmekte ve çeşitli dokuların oluşumuna katılmaktadır. Sonic hedgehog, farede en yüksek miktarda eksprese olan HH ailesi üyesidir. Gelişmekte olan fare embriyosunda, SHH mRNA'sı notokord, nöral tüp ve uzuv tomurcukları gibi yapılarda lokalizedir (172). SHH ayrıca, diş, saç, yanak, barsak, mesane, duktus deferens, üretra, akciğer ve prostat gibi dokularda da bulunmaktadır (14). SHH genindeki mutasyonlar, hem insanlar hem de farelerde önbeyin yarıklanmasının tamamlanamaması, yüz defektleri, göz defektleri ile karakterize olan holoprosencephaliye neden olmaktadır. SHH -/- fare embriyoları birçok büyüme geriliği de göstermektedir ve vahşi tiplerdeki gibi ön ve arka ekstremiteler bulunmamaktadır (13). Bu farelerde, spinal kord ve aksiyal iskelet şekillenmesinde de defektler bulunmaktadır. Ayrıca, akciğerleri yeterince büyümemekte ve dallanamamaktadır (173).

1.2.2. Testiste Hedgehog Sinyal Yolağı

Gonadlar, prostat, uterus ve meme bezi gibi üreme organlarında HH sinyalinin rolü olduğu bilinmektedir. HH sinyalinin, özellikle memeli spermatogenezinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (14).

Hedgehog yolağında görevli olan elemanların, testisteki ekspresyonu ile ilgili yeterince bilgi bulunamamıştır. İzole edilen fare Tip A ve Tip B spermatogoniyalarda, GLI1 ve GLI3 mRNA ekspresyonu, Northern Blot yöntemi ile gösterilmiştir (174). GLI1 proteini, yetişkin fare testisinde pakiten spermatositlerin çekirdeğinde bulunmaktadır ve yuvarlak spermatid basamağına kadar varlığını sürdürmektedir. Uzamış spermatidlerde ise GLI1 proteini sitoplazmaya geçmektedir. Bu durum, GLI1 proteininin spermatogenezdeki etkisinin, uzamış spermatid aşamasında olmadığını göstermektedir (175).

Fare germ hücrelerinde insan GLI1 geni, deneysel olarak aşırı eksprese edildiği zaman, bu hayvanlarda spermatogenez, pakiten spermatosit basamağında durmaktadır. Bu transgenik hayvanlardaki seminifer tübüllerde, vahşi tip farelerdeki seminifer tübüllerle karşılaştırıldığında yüksek oranda bozukluk görülmektedir (175).

Testisteki PTCH1 mRNA sentezi, Leydig ve peritübüler hücrelerde dir. DHH/PTCH1 sinyali özellikle fetal Leydig hücrelerinin farklılaşması için gereklidir (172, 176). Radyoaktif insitu yöntemi kullanılarak da PTCH2 ve FU mRNA'lar spermatositlerde gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında, HH sinyalinin önemi ve normal spermatogenezde rolü olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, bu yolağın ne zaman ve hangi hücrelerde eksprese olduğu ile ilgili henüz yeterince bilgi bulunmamaktadır (177).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi insanlar üzerinde yapılacak araştırma için Etik Kurul Başkanlığı'nın 26.01.2017 tarihli 02 toplantı sayısı ve 08 karar nolu onam alınmıştır.

Bu çalışmaya Haziran 2007 ile Haziran 2017 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'nda hipospadias (ICD Kodu: Q54) tanısıyla ameliyat edilen, takip ve tedavileri sürdürülen 0-16 yaş arası 200 hasta alındı. Kontrol grubu olarak; Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'na sünnet talebi ile başvuran sağlıklı ve fizik muayenesinde ek patoloji saptanmayan 0-16 yaş arası 200 çocuk alındı. Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında opere olan ve kan örneğinde alınan 48 hipospadias hastasının penil doku örneği ve sünnet olan 48 sağlıklı çocuktan da penil doku örnekleri alındı.

Bu çalışmada Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kontrol gen olarak kullanıldı. SUFU, SHH, PTCH1, PTCH2, GLI1, GLI2, GLI3, GLI4, SMO, serin/threonin-protein kinase 36 (STK36) genlerinin ekspresyonları araştırıldı.

Tüm hastaların yaşları nedeniyle (0-16 yaş arası) aileye genetik testler ve hipospadias hakkında sözel bilgi verildi ve ailelerden araştırma detaylarını anlatan hasta bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak izinleri alındı (Ek 1).

Haziran 2016-Haziran 2017 tarihleri arasında 48 hipospadias hastasından elektif cerrahi sırasında artık doku örnekleri toplandı. 48 kontrol grubundan da yine elektif sünnet sırasında artık doku örnekleri toplandı. Hipospadias hastaları distal (Grup 1) ve proksimal (Grup 2) olarak ayrıldı. Distal hipospadias grubu (Grup 1); glanüler, koronal, subkoronal hipospadiaslı hastalar idi. Proksimal hipospadias grubu (Grup 2); midpenil, penil, skrotal, penoskrotal ve perineal hipospadiaslı hastalar idi.

Ailelere her olgunun demografik özelliklerini ve klinik öykülerini içeren detaylı anket yapıldı (Ek 2). Hipospadiasın tipi kayıtlara geçirildi ve ailede başka bireylerde hipospadias olup olmadığı, anne yaşı sorgulandı. Olası teratojen nedenleri ortaya çıkarmak için annelerin hamilelik süresince ilaç kullanımını sorgulandı. Olguların yaşı, kaçınıcı çocuk oldukları sorgulandı. Hastalar ayrıntılı muayene edilerek ek patolojiler kayıt edildi.

Çalışma ve kontrol grubunda SUFU, SHH, PTCH1, PTCH2, GLI1, GLI2, GLI3, GLI4, SMO, STK36 gen polimorfizmleri araştırmak üzere alınan doku örneklerinde genetik çalışmalar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

2.1. Hasta Seçim Kriterleri

2.1.1. Hasta Grubu

Haziran 2007 ile Haziran 2017 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'nda hipospadias (ICD Kodu: Q54) tanısıyla ameliyat edilen, takip ve tedavileri sürdürülen 0-16 yaş arası 200 hastadan kan örnekleri alındı. Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında opere olan ve kan örneğinde alınan 48 hipospadias hastasının penil doku örneği alındı.

2.1.2. Çalışmaya Alınma Kriterleri ve Grupların Oluşturulması

Hipospadias tanısı, klinik semptom ve bulguların varlığında kabul sırasında elde edilen fizik muayene dikkate alınarak konuldu. Hastalarda;

- 1- Yaş, penil kordi, penil torsiyon olup olmadığı, hipospadiasla birlikte ek inguinal bölge patolojilerinin (inguinal herni, inmemiş testis) olup olmadığına bakıldı.
- 2- Birinci ve 2. derece akrabalarda hipospadias varlığı sorgulandı.
- 3- Hipospadiaslı hastanın annesinin çocuğu doğurduğu yaş ve hastanın kaçınıcı çocuk olduğu sorgulandı.
- 4- Hipospadiaslı hastaya anne hamile iken ilaç kullanım öyküsü soruldu.
- 5- Operasyon kararı alınan hipospadias hastalarının ailelerinden operasyon öncesi onam alınarak operasyon sırasında artık prepüsyum alındı.
- 6- Hastalar distal ve proksimal hipospadias olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Distal hipospadias (Grup 1) grubuna; glanüler, koronal ve subkoronal düzeydeki hipospadiaslar, proksimal hipospadias (Grup 2) grubuna; penil, skrotal, penoskrotal ve perineal düzeydeki hipospadiaslar dahil edildi.

2.1.3. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- 1- Hipospadias onarımı için uygun yaşta olmayanlar,
- 2- Önemlilik arz eden ek anomali varlığı,

3- Onam alınmayan aileler

2.1.4. Kontrol Grubu Seçim Kriterleri

Kontrol grubu herhangi bir ek hastalığı olmayan aile tarafından sünnet istemi olan bireylerden seçildi. Operasyon öncesi onam alınarak operasyon sırasında artık prepüsyum alındı. Hasta ve kontrol grubu doku örneklerine aşağıdaki yöntemler uygulandı.

2.2. Moleküler Genetik Analizler

Hastalardan rutin EDTA'lı biyokimya tüplerine 3ml kan örneği alındı ve kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. DNA izolasyonu öncesi kanlar oda ısısına gelinceye kadar çözdürüldükten sonra aşağıda detayları verilmiş olan manuel DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

2.2.1. DNA İzolasyon Protokol

1. DNA izolasyonu için Genomik DNA izolasyonu WIZARD Genomic DNA Purification Kit (Katalog No: A1125, Promega, MA, USA) kullanıldı.
2. 5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 900 µl hücre parçalayıcı (Cell lysis buffer) solüsyon eklendi.
3. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan, hücre parçalayıcı solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
4. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. Daha sonra 13 000-16 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
6. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
7. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale gelmesi gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çöktüleri görünenler çözülene kadar 37 °C de inkübe edildi.

8. 1.5 µl RNase solüsyonu eklenen tüpler 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
9. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu (10M amonyum asetat) eklendi, 30 saniye vorteksledi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
10. Tüpler 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
11. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak kuvvetlice alt üst edildi.
12. İşleme ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar devam edildi.
13. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA dipte küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
14. Süpernatant atıldı, 300 µl % 70 lik etanol eklendi ve kullanılıncaya kadar 20 °C'de saklandı.

2.2.2. DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin ölçülmesi

Her bir hastanın DNA konsantrasyonu nanodrop cihazında (Maestrogen, MaestroNanodrop, USA) ölçüldükten sonra saflık derecesinin belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapıldı. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı (A_{260nm}/ A_{280nm}) 1,8'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1,8 'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1,8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1,8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir. Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1,8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA'ları tekrar izole edildi.

2.2.3. Varyantların Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genotiplendirilmesi

2.2.3.1. TaqMan Probları ile Genotiplendirme

Hasta ve kontrol örneklerinde aşağıda detayları verilmiş olan GLI2, SHH, PTCH1 genlerine ait rs735557, rs12711538, rs4848632, rs104894049, rs4131332

polimorfizmleri TaqMan problemleri kullanılarak ABI 7500 Fast Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında çalıştırıldı.

Tablo 3. GLI2 genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve nükleotit dizileri

| GLI2 | VIC/FAM |
|------------|--|
| rs735557 | AGGGCTGGCTGAGTTTCTGCATTTCC[C/T]GTTGGGTGCCAAGATGATGCTGGGG |
| rs12711538 | TCGCCACAGGGAAGCTTGGGGTCCCC[A/G]ATTCAGCCCTGGCTGGAGTGCCACC |
| rs4848632 | GTAGTGGTCACTACTTCTGGCTACC[A/G]TGGAAGTAAGCGAGACAAGGTCTGC |

Tablo 4. SHH genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve nükleotit dizileri

| SHH | VIC/FAM |
|-------------|---|
| rs104894049 | CCTGGCCACTGGTTCATCACCGAGA[T/A]GGCCAAAGCGTTCAACTTGTCCTTA |

Tablo 5. PTCH1 genindeki polimorfizimlere ait referans numaraları ve nükleotit dizileri

| PTCH1 | VIC/FAM |
|------------|---|
| rs41313327 | CACGCCGTCTTACCCTGAAGCCAGT[C/T]TCTGAAGTAGTGCAGCCACATTTTG |

Tablo 6. Gen polimorfizimlerinin katalog numaraları (Applied Biosystems, Foster City, CA)

| Test adı | Katalog numarası |
|--------------|------------------|
| GLI2 | |
| rs735557 | 4351379 |
| rs12711538 | 4351379 |
| rs4848632 | 4351379 |
| SHH | |
| rs104894049 | 4351379 |
| PTCH1 | |
| rs41313327 | 4351379 |

Tablo 7. Polimorfizimlerin ankestral ve polimorfik varyantlarının gösterimi

| GLI2 | Genotipler | | |
|--------------|------------|----|----|
| rs735557 | AA | AG | GG |
| rs12711538 | AA | AG | GG |
| rs4848632 | AA | AG | GG |
| SHH | | | |
| rs104894049 | AA | AT | TT |
| PTCH1 | | | |
| rs41313327 | CC | CT | TT |

Elde edilen DNA konsantrasyonları 1-10 ng olacak şekilde sulandırıldı. PZR reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. Tablo 3’de RT-PZR reaksiyonu için kullanılan malzeme miktarları detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 8. RT-PZR reaksiyon karışım

| | Bileşik Hacim (µl) | Katalog No: |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------|
| TaqMan Genotyping Master Miks | 5 µl | 4351379 |
| TaqMan genotyping assay (20 X) | 0,25 µl | 4351379 |
| Nükleaz içermeyen H2O | 1.0µl | 4351379 |
| Örnek | 2.5µl | 4351379 |
| Reaksiyon toplamı | 10.0µl | 4351379 |

2.2.4. RT-PZR

96 kuyucuklu plate’in her bir kuyucuğuna sırasıyla her örnekten 2,5 µl DNA konuldu. DNA’ların üzerine, hazırlanan PZR reaksiyon miksinden 7,5 µl ilave edilip toplamda 10 µl’lik reaksiyon hacmi oluşturuldu. Plate’in üzeri optical film ile kapatılıp santrifüj yapıldı. Plate, 7500 Fast Real Time PZR cihazına yerleştirildikten sonra aşağıda Tablo 6’ da verilen programa göre 40 döngü olacak şekilde PZR programı çalıştırıldı.

Tablo 9. Genotipleme için uygulanan RT-PZR programı

| RT-PZR X 40 Döngü | | | | | |
|-------------------|-------|-------|-------|------|-------|
| | adım | adım | adım | adım | adım |
| Sıcaklık | 60 °C | 95 °C | 95°C | 60°C | 60°C |
| Zaman | 30 sn | 10 dk | 15 sn | 1 dk | 30 sn |

PZR sonrası cihazın software sistemi kullanılarak allel 1 ve allel 2 ayırımına göre homozigot mutant, heterozigot ve homozigot normal genotipler belirlendi.

2.2.1. Total RNA İzolasyonu

Hipospadiaslı hastaların penil dokularından RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kiti kullanıldı. Çalışma prosedürü: Kit içerisindeki lizis buffer’dan 1 ml ve 2-merkaptotanol’dan 10 µl falkon tüpüne alınıp karıştırılarak Lizis tampon çözeltisi elde edildi. Hipospadiyak dokusu, doku ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltiden 600 µl alınarak kilitli eppendorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 3 dk 8. hızda parçalama işlemi yapıldı. Örnekler 12.000 xg’de 2 dakika (dk) oda sıcaklığında santrifüj edildi. RNA içeren sıvı fazın hepsi

yeni bir eppendorfa alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Örneklerden 700 µl alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarıldı ve 12.000xg'de 15 saniye (sn) oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kalan örneklerde kolonlara aktarılarak aynı şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı boşaltıldı. Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II ile yapıldı. Örneklerle 700 µl Wash I eklenerek 12.000 xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örneklerle 500 µl Wash II eklenerek 12.000 xg'de 15 sn santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000 xg'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar alınarak yeni eppendorf tüplere bırakıldı ve üstüne 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve 12.000 xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Eppendorf tüpün dibindeki sıvı kısım bu aşamadan sonra RNA içermektedir. RNA örnekleri kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı.

2.2.2. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

İşleme geçmeden önce DNAaz-RNAaz içermeyen steril su ile kör ölçüm yapıldı. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Bu işlem her bir örnek için tekrarlandı.

2.2.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

500 µl hacimli eppendorf tüplerde toplamda 20 µl hacimde gerçekleştirilen cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanılırken 2 µl 10xRT Buffer, 0,8 µl 25xdNTP mix, 2 µl 10xRT Random Primers, 1 µl Multiscribe™ Reverse Transcriptase ve 4,2 µl nükleaz-free su kullanıldı. Termal döngü cihazına yerleştirilen örnekler; 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletilerek sonunda oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 10. cDNA karışım miktarı

| Bileşik | Hacim (µl) |
|------------------------------------|------------|
| 10x RT Tamponu | 2.0 |
| 25x dNTP Karışımı (100mM) | 0.8 |
| Multiscribe™ Reverse Transkriptaz | 1.0 |
| 10x RT Random Primer | 2.0 |
| Nükleaz İçermeyen H ₂ O | 4.2 |
| Karışımın Toplamı | 10.0 |

Tablo 11. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

| | 1. Basamak | 2. Basamak | 3. Basamak | 4. Basamak |
|----------|------------|------------|------------|------------|
| Sıcaklık | 25 °C | 37 °C | 85 °C | 4 °C |
| Süre | 10 dk | 120 dk | 5 dk | ∞ |

2.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle cDNA Çoğaltımı

Revers transkripsiyon sonucunda elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltıldı. SUFU, SHH, PTCH1, PTCH2, GLI1, GLI2, GLI3, GLI4, SMO, STK36 gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen RT-PZR yönteminde plate hazırlanırken her bir kuyucuğa 1 µl cDNA örneği koyuldu. Her bir örnek için 2 µl qPCR mix, 1 µl primer ve 6 µl DNAaz ve RNAaz içermeyen steril su ilave edildi.

Tablo 12. RT-PZR için her bir kuyucuğa koyulan bileşikler

| BİLEŞİKLER | HACİM (µl) x ÖRNEK SAYISI |
|---------------|---------------------------|
| cDNA | 1.0 |
| qPCR Mix | 2.0 |
| Primer | 1.0 |
| Su | 6.0 |
| Toplam | 10 |

Gen ekspresyon düzeyleri Applied Biosystems 7500 Real Time PCR sistemi ile belirlendi. Çalışmada kontrol gen (housekeeping) olarak GAPDH ve beta-aktin kullanıldı. Isı koşulları 1 kez 95°C'de 15 dk ve 40 kez 95°C'de 15 sn -60°C'de 30 sn-72°C'de 30 sn olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 13. Uygulanan RT-PZR programı

| Döngü basamağı | Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|-----------------------|-----------------|-------------|---------------------|
| Başlangıç aktivasyonu | 95 °C | 15 dk | 1 |
| Denatürasyon | 95 °C | 15 sn | |
| Annealing | 60-65 °C | 30 sn | 40 |
| Uzama | 72 °C | 30 sn | |

2.3. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics programı 22. sürüm paket programı (SPSS inc. Chicago, IL, USA) kullanıldı. Hücre sağkalım verilerinin gruplar arasındaki karşılaştırılmasında ki-kare, RT-PCR parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması için t testi kullanıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmaya, Fırat Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'na hipospadias nedeniyle başvuran 200 hasta, kontrol grubu olarak da Fırat Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'na sünnet istemiyle başvuran ek patolojisi olmayan 200 sağlıklı birey alındı.

Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında elektif operasyona alınan; 48 hipospadias hastasından doku örnekleri, 48 kontrol grubundan da yine doku örnekleri toplandı. Hipospadias hastaları distal ve proksimal hipospadias olarak 2 gruba ayrıldı. Toplam 48 hipospadiyak doku örneğinden 28'i distal 20'si proksimal hipospadiaslı hastalara aitti. İki yüz hipospadiyak kan örneğinden 118'i distal 82'si proksimal hipospadiaslı hastalara aitti.

Doku örnekleri alınan hasta grubunun yaş ortalaması $5,58\pm 3,26$ yıl idi. Grup 1 hastaların yaş ortalaması $4,93\pm 3,17$ yıl, Grup 2 hastaların yaş ortalaması $6,23\pm 3,35$ yıl, doku örnekleri alınan kontrol grubunun yaş ortalaması ise $5,35\pm 3,12$ yıl idi.

Anne doğum yaşlarına baktığımızda doku örnekleri alınan çalışma grubunun anne doğum yaşları ortalaması $28,14\pm 5,43$ yıl idi. Grup 1 hastaların anne yaşı ortalaması $28,14\pm 5,44$ yıl, Grup 2 hastaların anne yaşı ortalaması $27,70\pm 5,48$ yıl, kontrol grubundaki anne yaşlarının ortalaması ise $27,25\pm 5,42$ yıl idi.

Tablo 14. Doku örnekleri alınan hastaların ve annelerinin yaş dağılımı

| | Grup 1 | | | | Grup 2 | | | |
|-----------------------|--------|------|------------------|-----------|--------|------|------------------|-----------|
| | n | % | Ort. \pm SD | (min-max) | n | % | Ort. \pm SD | (min-max) |
| Hasta Yaşı (yıl) | 28 | 59,0 | 4,93 \pm 3,17 | 1-12 | 20 | 41,0 | 6,23 \pm 3,35 | 1-16 |
| Anne Doğum Yaşı (yıl) | 28 | 59,0 | 28,14 \pm 5,43 | 17-40 | 20 | 41,0 | 27,70 \pm 5,48 | 20-38 |

Doku örnekleri alınan 48 hipospadias hastasından 28 tanesinde ek inguinal bölge patolojileri mevcuttu. Grup 1'de 17 (%61,0) hastada ek inguinal bölge patolojileri görülürken, Grup 2'de ise 11 (%39,0) hastada inguinal bölge patolojileri görüldü. Gruplara göre ek inguinal bölge patolojisi görülme açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$).

Tablo 15. Doku örnekleri alınan hastaların gruplara göre ek inguinal bölge patolojilerinin dağılımı

| | Grup 1 | | Grup 2 | | <i>p</i> |
|--------------------------------|--------|------|--------|------|----------|
| | n | % | n | % | |
| Ek İnguinal Bölge Patolojileri | 17 | 61,0 | 11 | 39,0 | 0,460 |

Grup 1’de 5 hastanın; 2 tanesinde 1. derece, 3 tanesinde 2. derece aile öyküsünde hipospadias mevcuttu. Grup 2’de ise 4 hastanın 1 tanesinde 1. derece, 3 tanesinde 2. derece aile öyküsü mevcuttu. Gruplar arasında aile öyküsü açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

Tablo 16. Doku örnekleri alınan hastaların gruplara göre ailede başka hipospadiaslı birey dağılımı

| | Grup 1 | | Grup 2 | | <i>p</i> |
|----------------------------------|--------|------|--------|------|----------|
| | n | % | n | % | |
| Ailede Başka Hipospadiaslı Birey | 5 | 17,8 | 4 | 20,0 | 0,876 |
| 1. Derece | 2 | 7,1 | 1 | 5,0 | |
| 2. Derece | 3 | 10,7 | 3 | 15,0 | |

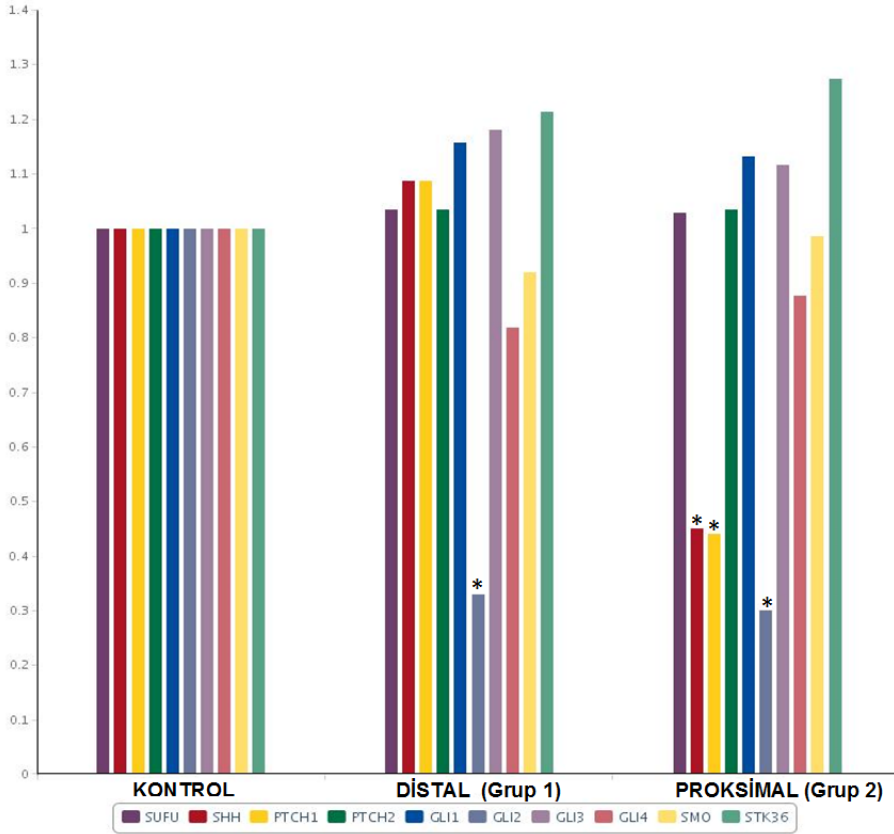
Annelerin hamilelikte ilaç kullanım öyküsü sorgulandığında, 48 hipospadias hasta annesinden sadece 1’i tiroid ilacı kullandığı, 5 hasta annesinde demir ilacı kullandığını söyledi.

Grup 1’de 28 hastadan 12 tanesi 1. doğum, 10 tanesi 2. doğum 6 tanesi 3. doğum idi. Grup 2’de 20 hastadan 6 tanesi 1. doğum, 5 tanesi 2. doğum, 8 tanesi 3. doğum, 1 tanesi de 5. doğum idi.

Yapılan gen analizinde toplam 48 hipospadiyak doku örneğinin tamamında kontrole göre mRNA kat değişimi gözlemlendi. SUFU geninde her iki grupta kontrole kıyasla istatistiki olarak anlamlı bir değişim görülmedi. SHH geninde Grup 1’de kontrole kıyasla mRNA kat değişiminde istatistiki olarak anlamlı bir değişim görülmezken Grup 2’de kontrole kıyasla mRNA kat değişiminde anlamlı bir düşüş izlendi ($p<0,05$). PTCH1 geninde Grup 1’de kontrole kıyasla istatistiki olarak anlamlı bir değişim görülmezken Grup 2’de kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş izlendi ($p<0,05$). PTCH2 geninde her iki grupta da kontrole kıyasla mRNA kat

değişiminde istatistiki olarak anlamlı bir değişim görülmedi. GLI1 geninde her iki grupta da kontrole kıyasla mRNA kat değişiminde istatistiki olarak anlamlı bir değişim görülmedi. GLI2 geninde her iki grupta da kontrole kıyasla mRNA kat değişiminde anlamlı bir düşüş izlendi ($p<0,05$). GLI2 her iki grupta da kontrole kıyasla mRNA kat değişiminde anlamlı bir düşüş izlenen tek geni. GLI3, GLI4, SMO ve STK36 genlerinde kontrole kıyasla mRNA kat değişiminde istatistiki olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

Kontrol grubuna kıyasla SHH geninde mRNA kat değişimi Grup 1’de 1,0867 kat, Grup 2’de 0,4506 kat gözlemlendi. İki grubu karşılaştırmak için yapılan istatistiksel analizde Grup 2’de mRNA kat değişiminde anlamlı ölçüde farklılık saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 20).



* $p<0,05$

Şekil 20. Kontrol grubu ile Grup 1 ve Grup 2 arasındaki mRNA kat değişimi ilişkisi

Tablo 17. Penil dokularda Grup 1 ve Grup 2 arasında genlerin mRNA kat değişimi

| No | GEN ADI | Distal Hipospadias (Grup 1) | | Proksimal Hipospadias (Grup 2) | |
|----|---------|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| | | mRNA Kat Değişimi | <i>p</i> -değeri | mRNA Kat Değişimi | <i>p</i> -değeri |
| 1 | SUFU | 1.0353 | 0.897841 | 1.0281 | 0.922226 |
| 2 | SHH | 1.0867 | 0.75385 | 0.4506 | 0.043832 |
| 3 | PTCH1 | 1.0867 | 0.75385 | 0.4414 | 0.04136 |
| 4 | PTCH2 | 1.0353 | 0.897841 | 1.0353 | 0.900805 |
| 5 | GLI1 | 1.1567 | 0.586497 | 1.1329 | 0.638963 |
| 6 | GLI2 | 0.3299 | 0.02145 | 0.3015 | 0.018122 |
| 7 | GLI3 | 1.181 | 0.536613 | 1.1173 | 0.676429 |
| 8 | GLI4 | 0.8179 | 0.457008 | 0.8766 | 0.608764 |
| 9 | SMO | 0.9202 | 0.746456 | 0.9862 | 0.948431 |
| 10 | STK36 | 1.2142 | 0.475184 | 1.2746 | 0.378232 |

Tablo 18. SHH geni mRNA kat değişimi Grup 1 ve Grup 2 ilişkisi

| | SHH Geni mRNA Kat Değişimi | <i>p</i> değeri |
|--------|----------------------------|-----------------|
| Grup 1 | 1.0867 | > 0,05 |
| Grup 2 | 0.4506 | < 0,05 |

Dokularda çalışılan genlerden mRNA kat değişiminde anlamlı dūřuř izlenen GLI2, SHH, PTCH1 genlerinin hasta ve kontrol kanlarında DNA polimorfizmlerine bakıldı.

Kan rnekleri alınan hasta grubunun yaş ortalaması 5,62±3,50 yıl idi. Grup 1 hastaların yaş ortalaması 5,66±3,52 yıl, Grup 2 hastaların yaş ortalaması 5,55±3,48 yıl, kan örnekleri alınan kontrol grubunun yaş ortalaması ise 4,77±3,73 yıl idi.

Anne doğum yaşlarına baktığımızda kan örnekleri alınan çalışma grubunun anne doğum yaşları ortalaması 27,28±5,39 yıl idi. Grup 1 hastaların anne yaşı ortalaması 27,44±5,64 yıl, Grup 2 hastaların anne yaşı ortalaması 27,03±5,01 yıl, kontrol grubundaki anne yaşlarının ortalaması ise 28,22±5,69 yıl idi.

Tablo 19. Kan rnekleri alınan hastaların ve annelerinin yaş dağılımı

| | Grup 1 | | | | Grup 2 | | | |
|-----------------------|--------|----|------------|-----------|--------|----|------------|-----------|
| | n | % | Ort.±SD | (min-max) | n | % | Ort.±SD | (min-max) |
| Hasta Yaşı (yıl) | 118 | 59 | 5,66±3,52 | 1-17 | 82 | 41 | 5,55±3,48 | 1-16 |
| Anne Doğum Yaşı (yıl) | 118 | 59 | 27,44±5,64 | 17-44 | 82 | 41 | 27,03±5,01 | 18-40 |

Kan örnekleri alınan 200 hipospadias hastasından 101 tanesinde ek inguinal bölge patolojileri mevcuttu. Grup 1’de 40 (%39,0) hastada ek inguinal bölge patolojileri görülürken, Grup 2’de ise 61 (%61,0) hastada inguinal bölge patolojileri görüldü. Gruplara göre ek inguinal bölge patolojisi görülme açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık görüldü ($p<0,05$).

Tablo 20. Kan örneği bakılan hastalarda ek inguinal bölge patolojilerinin dağılımı

| | Grup 1 | | Grup 2 | | p |
|--------------------------------|--------|------|--------|------|---------|
| | n | % | n | % | |
| Ek İnguinal Bölge Patolojileri | 40 | 39,0 | 61 | 61,0 | 0,00001 |

Grup 1’de 10 hastanın; 2 tanesinde 1. derece, 8 tanesinde 2. derece aile öyküsünde hipospadias mevcuttu. Grup 2’de ise 20 hastanın 7 tanesinde 1. derece, 13 tanesinde 2. derece aile öyküsü mevcuttu. Gruplar arasında aile öyküsü açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark görüldü ($p<0,05$).

Tablo 21. Kan örneği bakılan hastaların Gruplara göre ailesinde başka hipospadiaslı birey dağılımı

| | Grup 1 | | Grup 2 | | p |
|----------------------------------|--------|-----|--------|------|--------|
| | n | % | n | % | |
| Ailede Başka Hipospadiaslı Birey | 10 | 8,0 | 20 | 24,3 | 0,0064 |
| 1. Derece | 2 | 1,5 | 7 | 8,5 | |
| 2. Derece | 8 | 6,5 | 13 | 15,8 | |

Tablo 22. Hipospadias ve kontrol kan örneklerinde GLI2, SHH ve PTCH1’in tek nükleotit polimorfizmlerinin dağılımı

| SNP (tek nükleotit polimorfizmi) | Majör/minör allel | Hasta (n:200) | | Kontrol (n:200) | | minör allel için AO (%95 GA) | minör allel için p değeri | Genotip için AO (%95 GA) | Genotip için p değeri |
|----------------------------------|-------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | | minör allel Frk. | Genotip sayısı | minör allel Frk. | Genotip sayısı | | | | |
| rs735557 | AG | 0.70 | 104/74/22 | 0.70 | 104/75/21 | 1.01(0.74,1.37) | 0.99 | 1.05(0.54,2.02) | 0.985 |
| rs12711538 | AG | 0.56 | 64/97/39 | 0.51 | 46/112/42 | 0.80(0.61,1.06) | 0.156 | 0.67(0.37,1.19) | 0.127 |
| rs4848632 | AG | 0.39 | 40/78/82 | 0.36 | 26/92/82 | 0.86(0.64,1.14) | 0.34 | 0.65(0.36,1.16) | 0.127 |
| rs104894049 | AT | | | | | | | | |
| rs41313327 | CT | | | | | | | | |

Ki kare ve Fischer exact testleri uygulandı. GA: Güvenlik Aralığı, AO: Acayıplık Oranı.

Hastalarda bakılan genotip ve allel sıklıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında rs735557, rs12711538, rs4848632, rs104894049, rs41313327 polimorfizmlerine ait varyant genotip ve allel sıklıklarında anlamlı bir değişiklik bulunmadı ($p>0.05$)



4. TARTIŞMA

Hipospadias etiolojisinde SHH yolağının rolü son yıllarda araştırma konusu olmuştur. Embriyogenez boyunca, SHH penis ve prostatdan köken alan ürogenital sinüsten ortaya çıkmaktadır (16). SHH ekspresyonu genital kabartının büyümesi ve farklılaşması için gereklidir (17). SHH delesyonlu farelerde dış genital organlarda gelişim kusuru gösterilmiştir (18). SHH penisin postnatal gelişiminin tüm periyodu boyunca eksprese olmaktadır. Pubertede artarak yetişkin peniste en yüksek seviyesine ulaşır. Erişkinlerde devam eden fonksiyonları desteklemektedir. SHH, primer olarak korpus kavernozumdaki düz kasda yer almaktadır. Ancak tunikanın, sinirlerin ve üretranın altındaki poliferatif bölgede de bulunmaktadır. Penisde SHH'nin inhibisyonu ile SHH'nin penisin sinüzoid morfolojisinin meydana gelmesinde esas rol oynadığı gösterilmiştir (19).

Bu çalışmada gen analizi kullanılarak, distal hipospadiaslı (Grup 1) ve proksimal hipospadiaslı (Grup 2) hastalarda SHH gen ekspresyonu ve SHH yolağında görevli genlerin ekspresyonu araştırılmıştır. Hipospadiaslı hastaların penil dokularında SHH gen ekspresyonunun kontrole göre anlamlı derecede azaldığı görüldü. Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında Grup 2'deki SHH gen ekspresyonunun Grup 1'e göre daha düşük olduğu görüldü. Bu bulgular SHH geninin ifadesinin azalmasının hipospadiasla ilişkili olduğunu göstermesine rağmen, embriyonik dönem ve devam eden süreçlerde ifadenin nasıl etkilendiğini göstermemektedir.

GLI ailesinden, GLI1, GLI2, GLI3 HH sinyalinin çevirim cevabını içerir. Mutant fare analizleri GLI1 ve GLI2'nin ilk olarak işlev gösterdiğini ama bazı durumlarda GLI proteinlerinin örtüşen rolleri rapor edilmiştir. GLI2 ve GLI3 yokluğunda embriyonik hasar oluşurken GLI1 normal gelişme için gereklidir. GLI1 HH sinyalinin hedefi olmasına rağmen, HH yolunda pozitif feedback döngüsünde de yerini almaktadır. HH yolunun birçok büyüme sürecini kontrol ettiği kabul edilmektedir. Bununla beraber, SHH ve GLI proteinlerinin seksüel gelişimdeki payı tam olarak açıklanamamıştır (178). Seksüel gelişimde hormonal (androjen) kontrolü tanımlanmış olmasına rağmen cinsiyet bezleriyle ilgili olmayan ve lokal olarak üretilen erkeklik faktörlerinin görevi henüz bilinmemektedir. SHH yolunun erkek dış üreme organının erkekleşme sürecinde gerekli olduğu kanıtlandı. HH sinyalinin genetik yarılması hipospadias benzeri fenotipe yol açar. Bununla ilgili olarak,

seksüel farklılaşma evresinde, SHH'nin gen inaktivasyonu erkek dış genital organlarının dişiye benzer yapıya bürünmesine neden olur. Bu durum embriyogenez sırasında seksüel dimorfik gelişim için yeni tanımlanmış SHH-GLI sinyalleşme fonksiyonlarına sebep olur. Embriyogenez esnasında cinsel dimorfik organogenez, gonad içinde üretilmiş hormonlar sayesinde gerçekleşir. Dış genital organlar tek bir primordium ve genital kabartıdan, androjen uyarısına bağlı olarak maskülinize oluşur. Ek olarak gonad dışı hormonal uyarıları ve lokal olarak üretilen maskülanizasyon faktörleri belirsizdir. Dış genital organların cinsel dimorfik gelişiminin mekanizmasını aydınlatmak için bir grup mutasyonlu fare analizinde farklı mutant alleller üzerinde çalışılmış; bu taslakta özellikle HH uyarı yolağı üzerinde odaklanılmıştır. SHH üretral plak epitelinden başlayıp GLI2'ye doğru sinyal iletiminde bulunmaktadır. Glioblastomalı mutant embriyolarda, cinsel dimorfik genlerin ekspresyon seviyeleri azalmıştır, bu durum HH uyarı yolağının androjen cevabını etkilemek suretiyle maskülinizasyon sürecini kolaylaştırdığını desteklemektedir. Ek olarak, cinsel farklılaşma aşamasında SHH'nin mutasyon durumu, anormal erkek eksternal genitaliyasının gelişimine sebep olmaktadır. Son çalışmalar tanımlanmış HH uyarı yolağının sadece gelişimin başlangıcı için değil ayrıca androjen uyarısı ile eksternal genitalyanın cinsel dimorfik gelişiminin koordinasyonu içinde kilit rol oynadığını göstermektedir (178).

Çalışmamızda GLI2'nin özellikle Grup 2'de kontrole göre anlamlı olarak azalmış olması bu genin önemini artırmaktadır. GLI2 HH yolağı maskülinizasyon sürecini kolaylaştırmaktadır. Bu anlamda bu bireylerin ileriki süreçlerde de daha dikkatli takip edilmeleri maskülinizasyon açısından da değerlendirilmeleri gerekli olabilir.

Li ve ark. (179)'nın yaptığı bir çalışmada GLI1 polimorfizminin kronik lenfositer lösemi (KLL) ile ilişkisi gösterilmiştir. HH ligand yokluğunda, PTCH üzerinden SMO aktivitesini inhibe ettiğini ve GLI tarafından transkripsiyonel regresyona yol açan hücre içi sinyal yolunun tetiklendiğini göstermişlerdir. Değişken GLI1 proteini (glutaminden glutamik asit dönüşümü) KLL'de olumsuz prognostik gösterge olarak bulunmuştur. Ayrıca GLI1 enflamatuvar bağırsak hastalığı için bir risk faktörü olarak gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada hipospadiaslı

hastalarda kontrol grubuna göre, Grup 1 ve Grup 2’de GLI1 değerlerinde anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Chen ve ark. (180)’nın SHH yolundaki varyasyonların mesane kanseri üzerindeki etkilerine dair fare üzerinde yapmış oldukları çalışmada riskle ilişkili olarak GLI3’ün; sağ kalma üzerine ise GLI2’nin incelenmesi sonucunda yapılan çoklu karşılaştırmalarda anlamsız oldukları bulunmuştur. Rollerini hala tartışmalı olsada SHH’nin kontrolsüz harekete geçmesinin kanseri tetiklediği; PTCH1’in ise tümör supresor rolü olduğunu düşünmektedirler. GLI2 insan hastalıklarında daha az çalışılmış olup farelerde yapılan birçok çalışmada GLI2’nin aşırı sentezlenmesinin veya mutasyonunun bazal hücreli karsinom ve iskelet anomalileri ile ilişkili olduğunu ancak insanda tam öneminin anlaşamadığını bildirmişlerdir. GLI3 ise yüksek arsenik maruziyetinde SHH aktivitesinin yüksek seviyelere ulaşması ile ilişkili bulunmuştur. Bizim hipospadiaslı hastalarda yaptığımız çalışmada hem Grup 1 hem de Grup 2’de GLI2 mRNA kat değişimlerinde kontrole göre anlamlı bir düşüş bulunmuştur. Chen ve ark. yaptığı çalışmada GLI 2 de çalışılan rs735557 ve rs4848632 allellerinde mesane kanserinde anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da GLI 2 de çalıştığımız rs735557 ve rs4848632 allellerinde anlamlı bir değişikliğe rastlamadık.

Haddad-Tovoli ve ark. (181)’nin farelerde yapmış oldukları çalışmada bazal hipotalamusda GLI2A aracılığıyla harekette SHH yolu gerektiğini; SHH varlığında GLI3R fonksiyonunun gereksiz olduğunu; GLI2’nin preoptik bölge için gerekli ve GLI2 ve GLI3’deki eksikliğin alar hipotalamusu etkilemediği bildirilmiştir. Omurilik ve hipotalamusda GLI2 ve SHH’ninde etkisiyle ana glial fonksiyonlar yerine getirilir. Hipotalamusda GLI3R aktivitesi Paired box transcription factor 7 (PAX7)’de baskılanmaya neden olduğu ve sonuç olarak GLI3A fonksiyonunun memelilerde nörojenik fazda poliferasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, Grup 2’de, SHH ve GLI2 arasında anlamlı bir ilişki mevcutken, GLI3’ün bunlardan bağımsız olarak davrandığı görülmüştür.

Sonic hedgehog penil düz kasın regülasyonunda kritik rol oynamaktadır. Erişkin rat penislerinde SHH ve PTCH1 bağlanmasının engellenmesiyle, apopitozun 12 kat arttığı gözlemlenmiştir (182, 183). SHH inhibisyonu kaldırıldığında oluşan morfolojik değişimler geri dönüşümlüdür (184). Ratlar üzerinde yapılan birçok

çalışmada SHH'nın apoptozisi önlediği ve penil kavernöz sinir tamirinde etkili olduğu bulunmuştur (185, 186). Bu sonuçlar, SHH'nın prostatektomi sonrası apoptozisi baskılamak için önemli bir potansiyele sahip olduğu, bu yüzden klinik uygulamalarda buna önem verilmesi gerektiği, periferik sinir rejenerasyon sürecini hızlandırdığından rejeneratif bir terapi olarak kullanılabileceğini düşündürmelidir. Hipospadias hastalarının penis derisinin normal çocuklardaki penis derisine göre daha ince ve gelişmemiş olduğu görülmektedir. Hipospadiasın günümüzde tek tedavisi cerrahidir. Belki de bu çalışmalar doğumdan hemen sonra rastlanan hipospadiaslı hastalarda operasyon dışında bir tedavinin varlığını da doğuracaktır. Operasyona alınan hipospadias hastalarında da doku bütünlüğünü sağlamak için lokal SHH uygulamaları da araştırılmalıdır.

Carmichael ve ark. (187)'nin Amerikan toplumu üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, genital tüberkül ve erken üretral gelişimde SHH ve GLI transkripyon faktörlerinin hipospadiasta rol oynadığı bulunmuştur. SHH, epitelyal mezenkimal bütünlüğünün sağlanmasında ve genital tüberkülün gelişiminde rol oynamaktadır. GLI transkripsiyon faktörleri, 3 genden kodlanmakta (GLI1-2-3) ve bunlar SHH tarafından düzenlenmektedir. GLI genleri ekstremit ve kraniofasiyal gelişimle de alakalı olup üretral gelişimi sağlayan doku örüntüsünde de görev almaktadır. Bu çalışmanın sonucunda fenotipler, ırk-etnisite arasında tutarsız olmasına karşın bazı seçilmiş genlerdeki varyantların hipospadiasla ilişkili olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır. Fakat Carmichael ve ark. (187)'nin yaptığı çalışmada SHH, GLI1-2-3 genlerinin tekli nükleotid polimorfizmlerinin hipospadias riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Glioma-Associated Oncogene Homolog 2 mutant farelerde üretral formasyonda defekt tespit edilmiştir (188, 189). Bizim çalışmamızda hem Grup 1 hem de Grup 2'de GLI2 kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır ve bu çalışmaları desteklemektedir.

Choudhry ve ark. (190)'na göre SHH lokal kısa mesafeli sinyal molekülü olmasının yanı sıra nöral tüpün ventral oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. SHH sinyal proteinin PTCH'ya bağlanması SMO'nun aktivitesini düzenlemektedir. PTCH'in SMO'nun aktivitesini dolaylı yoldan inhibe ettiğine inanılmaktadır. PTCH ve SHH bağlanması sonucu SMO aktive olmakta ve stabilize edilmektedir. Aktive

olan SMO G protein reseptörleri gibi membran proteinlerince kodlanan SHH sinyal kaskadını başlatmaktadır. SMO'nun SHH sinyalindeki reseptörü kodladığına inanılmaktadır. Bunun hücre içi sinyalleri üreten bazı proteinkinaz türevlerinden GLI proteinlerinin regülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Bizim hipospadiaslı hastalar üzerinde yapmış olduğumuz çalışmada SHH, PTCH1 ve GLI proteinleri arasındaki ilişki ve 3'ününde anlamlı düşüşleri kontrole göre Grup 2'de izlenmiş olmasına rağmen, Grup 1'de kontrole göre 3'ünün birlikte düşüşüne rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada SMO'nun ise bunlardan bağımsız olarak anlamlı ilişkisi bulunmamıştır.

Seifert ve ark. (191) hamile farelere intraperitoneal tamoksifen uygulamışlar. Tamoksifen, SHH sinyalini direkt inhibe etmektedir. Tamoksifen uygulamasından sonra erken dönemde SHH sinyalinin inhibisyonu sonucu glans ve fallusun oluşumu engellenmiş ve dış genital bölgede hipospadias oluşumu görülmüştür. Erken dönemde fallus ve üretral gelişim için SHH aktivitesinin gerekli olduğunu ancak kloakal septasyon için SHH aktivitesinin gerekli olmadığını ortaya koymuşlardır. Bazı vakalarda SHH kaybı; üretral açıklığın anormal gelişimine neden olurken bazı vakalarda dış genitalya üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştı. Bunun sebebinin SHH yolağının inaktive edildiği zamana bağlı olarak değiştiği düşünüldü. SHH'nın geç dönemde aksaması ventral genital ektodermal dejenerasyona bağlı hipospadias geliştiği yönünde yorumlanmıştır. SHH eksprese eden kloaka ve üretranın endodermal hücreleri SHH'ya karşı cevapsız olup, PTCH1 genital mezenkim ve ektodermden eksprese edilmekte ve bu hücre grupları SHH'a direk cevap vermekteydi. PTCH1'i kloakal ve üretral endodermden tespit edememişler ve bunun SHH mutasyonuna bağlı olarak mı yoksa SHH'nın kendi otoregülasyonundan veya ikincil yolak kaybından mı kaynaklandığını tespit edememişlerdir. Ancak sonuç olarak, SHH anorektal ve genitalya gelişiminde komşu mezoderm ve ventral ektodermi işaret eden parakrin bir şekilde işlem görmektedir. SHH'ya tepki veren hücrelerin sırayla endodermal morfogenezini düzenleyen ikincil sinyal yolağının gerektiğini ortaya koymaktadır. SHH inhibisyonundan sonra nedenini ortaya koyamalarda PTCH1'inde inhibe olduğunu görmüşlerdir. Çalışmamızda SHH ve PTCH1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre Grup 2'de birlikte azaldığı görüldü ve bu çalışmayı destekler nitelikteydi.

Shehata ve ark. (192)'nin yaptığı çalışmada ilk defa insan embriyolarına bakılmıştır. Gestasyonel yaşı 12-29 haftalık olan 10 erkeğin genital örnekleri kullanılmış olup, insan penil üretra gelişiminin SHH ve sinyal bileşenlerini (PTCH, GLI ve SMO), lokalizasyonlarını ve gelişimini araştırmışlardır. SHH ekspresyonunun üretral epitelde yaklaşık 14. hafta gebelik içinde en yüksek olduğu bulunmuştur. Bu üretral tübularizasyonun tamamlandığı zaman ile korelasyon göstermiştir. İlginç olan SHH membran reseptörü PTCH1 ve bunun sinyal transduseri SMO'nun yanı sıra hedef transkripsiyon faktörü GLI1'in erken genital gelişim sırasında üretral epitelde oldukça yüksek oranda eksprese edilmesiydi. Bu durum otokrin sinyalizasyonun ve zamansal bir şekilde parakrin sinyalizasyona geçişin insan erkek genital gelişiminden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. SHH'nin diğer organ sistemlerinin aksel modellemesinde rol oynadığı bilinmektedir, bu nedenle üretranın aksel modellemesinde de rol oynayabileceği makuldür. Aynı zamanda üretral epitelyumun normal üretral oluşum ve tübularizasyon için bir sinyal merkezi olarak işlev gördüğünü öne süren Periton'nun çalışması da bu çalışmayı desteklemektedir (193). Üretral kapanma zamanında PTCH1, SMO ve GLI1 için üretral epiteldeki yoğun şekilde boyanma ve buna bağlı olarak da yüksek seviyelerdeki SHH ekspresyonu, insan erkek üretra gelişiminde SHH sinyal yolağının rolü için daha fazla destek sağlamıştır ve hipospadias gelişimi için SHH yolağının bozulması ile ilişkilendirilebilir. Bizim çalışmamızda embriyonik dokular çalışılmamasına rağmen çocuk hipospadiyak derilerinde SHH ekspresyonunun Grup 2'de kontrole göre düşük bulunması bu çalışmanın devamı olarak önem kazanmaktadır.

Miyagawa ve ark. (194)'nin fareler üzerine yapmış oldukları çalışmada GLI2 mutant erkeklerde daha şiddetli genital kusur, açık üretral oluk ve sünnet füzyon defektleri beklenirken) GLI2 mutant erkeklerde herhangi bir anormal dış genital oluşumu gözlemlenmemiştir. Ancak GLI2 ve SHH'nin birlikte mutasyonu olan farelerde anormal erkek dış genital oluşumu gösterilmiştir. GLI2 VE GLI3 fonksiyonlarının üreme organında inhibe edilmesinin anormal sonuç doğurmadığını gösteren ilk çalışmadır. Normalde SHH aracılı GLI2 transkripsiyonu ile androjen üretimi azalmakta ve testis gelişiminde birinci aktivatör olduğu öne sürülmüş olan GLI2'den yoksun mutant embriyolar bu çalışmada normal gelişim göstermiştir.

Bizim çalışmamızda bakılan hipospadias genlerinden özellikle GLI2’de hem Grup 1 hem de Grup 2’de kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüklük tespit edildi.

Tadı ve ark. (195)’nin yapmış oldukları çalışmada SHH sinyal yolu için terapötiklerin geliştirilmesi için öncelikle SMO ve GLI1 hedeflenmiştir. Doğal ve sentetik antagonistler hem SMO hem de GLI1 için geliştirilmiş olup birçoğu çeşitli derecelerde başarı ile klinik araştırmalara tabi tutulmuştur. GLI1 antagonistlerinin toplamı SMO antagonistleri kadar geniş değilse de SHH hedef genlerinin aktivasyonu ile ilişkili en az karakterize edilmiş GLI transkripsiyon faktörü olduğu için bu çalışmada terapötik hedef olarak seçilmiştir. GLI1 transkripsiyon faktörleri SHH-SMO sinyal yolağının terminal efektörleridir ve diğer önemli moleküler yollarla SHH ve SMO’dan bağımsız olarak da aktive edilebilmektedir. Bizim çalışmamızda bakılan hipospadiaslı hastalarda GLI1’in, SHH ve GLI2 ile beraber düşüş göstermediği saptanmıştır. Eğer bu yolda hipospadias oluşumunu önleyecek bir tedavi bulunmak isteniyorsa bu bileşenlerin her birinin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaştık.

Sonic Hedgehog tomurcuklanmanın başlangıcından önce kloakal endoderimde eksprese edilir ve SHH genital tüberkülün gelişimi için önem arz etmektedir. Şuan genital tüberkülün gelişiminin doğasına ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır. Genital tüberkülün endoderm, ektoderm ve mezoderm hücrelerinden oluştuğu göz önüne alınarak bu hücrelerin doğrudan SHH’ya cevapları aranmıştır. SMO’nun genital mezenkim ve ektodermden çıkarılması diğer taraftan SMO’nun üretral epitelden çıkarılmasının dış genital morfoloji üzerinde yaptıkları incelemede hiçbir etkisinin olmadığını göstermiş birçok çalışma bulunmaktadır (195). Bizim çalışmamızda hipospadiaslı hastalarda önceki çalışmalarla uyumlu olarak SMO’nun anlamlı bir değişikliğine rastlanmamıştır.

Rafijul ve ark. (196) SUFU supresyonuna ilişkin bir çalışma yapmışlardır. SUFU, SHH yolağının bilinen bir represördür. Embriyonik gelişim sırasında klasik bir morfojen gibi davranmaktadır. SUFU, SHH sinyallenmesinin hücre içi çekirdek negatif düzenleyicisidir, protein yapımı, stabilizasyon ve subsellüler dağılımı kontrol etmek için doğrudan GLI ile etkileşime girmektedir (182-186). Ancak bizim hipospadiaslı hastalarda yapmış olduğumuz çalışmamızda gösterilen SUFU geni ile GLI ekspresyonu arasında bir bağlantı kurulamamıştır.

Lesiak ve ark. nın (197) SHH yolağı gen polimorfizmleri ile bazal hücreli karsinom gelişimini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada GLI2'de 12711538, SHH'da 104894049, PTCH1'de rs41313327 gen polimorfizmlerinde anlamlı bir değişikliğe rastlanmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada aynı gen polimorfizmlerinde hipospadias ile ilişkili anlamlı bir değişikliğe rastlamadık.

Khuri ve ark. (115) yaptıkları 1070 vakalık araştırmalarında, inmemiş testisin % 9,3, inguinal herninin ise % 9,1 oranında hipospadias birlikteliğini ortaya koymuşlardır. Itesako ve ark. (118)'na göre eksternal üretral meatus ne kadar proksimal yerleşimli ise hipospadiasla birlikte inmemiş testis ve inguinal herni görülme birlikteliği de o kadar yükselir. Proksimal hipospadias vakalarında hem doğumsal inmemiş testis hem de edinsel inmemiş testis sıklığı artmıştır. Bizim alışmamızda doku örnekleri alınan 48 hipospadias hastasından 28 tanesinde ek inguinal bölge patolojileri mevcuttu. Grup 1'de 17 (%61,0) hastada ek inguinal bölge patolojileri görülürken, Grup 2'de ise 11 (%39,0) hastada inguinal bölge patolojileri görüldü. Gruplara göre ek inguinal bölge patolojisi görülme açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Kan rnekleri alınan 200 hipospadias hastasından 101 tanesinde ek inguinal bölge patolojileri mevcuttu. Grup 1'de 40 (%39,0) hastada ek inguinal bölge patolojileri görülürken, Grup 2'de ise 61 (%61,0) hastada inguinal bölge patolojileri görüldü. Gruplara göre ek inguinal bölge patolojisi görülme açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık görüldü ($p<0,05$). Itesako ve ark.'nı destekler yönde bulgularımız oldu.

Hamile kadınların vejeteryan diyet yapması ve aynı zamanda ek demir almaları hipospadiasın tanımlanmış bir sebebidir. Vejeteryan olmayan kadınlarda da demir takviyesi hipospadias oluşumu için risk faktörüdür (36, 42, 44, 54). Çalışmamızda 48 hipospadiak dokusu çalışılan hasta annesinden sadece 1'i tiroid ilacı kullandığını, 5 hasta annesinde demir ilacı kullandığını söyledi.

Maternal progesterin alımı hipospadias arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (29, 55). Düşük riski ve diğer komplikasyonlar için progesteron alan kadınların erkek çocuklarında hipospadias görülme riski 2 kat artmıştır (39). Bazı çalışmalarda, sentetik östrojen bileşiklerine maruz kalan gebe dişi farelerin hipospadiaslı çocuklar doğurduğu gösterilmiştir (56, 57). Valproik asit gibi antiepileptik ilaçlara hamilelikte maruz kalmanın hipospadias oluşum riskini artırdığı iddia edilmiştir. Valproik asit

uzun dönemde antiandrojenik etki gösterir (39, 47). Bizim çalışmamızda; 48 hipospadiak dokusu çalışılan hasta annesinden gebelik öncesi ve gebelikte östrojen, progesteron ve epileptik ilaç kullanım öyküsü yoktu.

Anne yaşının artması, annenin menarş yaşının geç olması, annenin obez olması ve ilk doğum yapan anne bebeklerinde hipospadias görülme riski artmıştır (36, 37, 40).

Doku örnekleri alınan hasta grubunun yaş ortalaması $5,58\pm 3,26$ yıl idi. Grup 1 hastaların yaş ortalaması $4,93\pm 3,17$ yıl, Grup 2 hastaların yaş ortalaması $6,23\pm 3,35$ yıl, doku örnekleri alınan kontrol grubunun yaş ortalaması ise $5,35\pm 3,12$ yıl idi. Hasta yaşları bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Kan örnekleri alınan hasta grubunun yaş ortalaması $5,62\pm 3,50$ yıl idi. Grup 1 hastaların yaş ortalaması $5,66\pm 3,52$ yıl, Grup 2 hastaların yaş ortalaması $5,55\pm 3,48$ yıl, kan örnekleri alınan kontrol grubunun yaş ortalaması ise $4,77\pm 3,73$ yıl idi. Hasta yaşları bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

Doku örnekleri alınan çalışma grubunun anne doğum yaşları ortalaması Grup 1'de ortalama $28,14\pm 5,43$ yıl, Grup 2'de ortalama $27,70\pm 5,48$ idi. Kontrol grubunda anne doğum yaşı $27,25\pm 5,42$ idi. Grup 1 ve Grup 2'de anne yaşları açısından anlamlı bir farklılık görmedik. Grup 1'de 28 hastadan 12 tanesi 1. doğum, 10 tanesi 2. doğum 6 tanesi 3. doğum idi. Grup 2'de 20 hastadan 6 tanesi 1. doğum, 5 tanesi 2. doğum, 8 tanesi 3. doğum, 1 tanesi de 5. doğum idi. Kan örnekleri alınan çalışma grubunun anne doğum yaşları ortalaması $27,28\pm 5,39$ yıl idi. Grup 1 hastaların anne yaşı ortalaması $27,44\pm 5,64$ yıl, Grup 2 hastaların anne yaşı ortalaması $27,03\pm 5,01$ yıl, kan örnekleri alınan kontrol grubundaki anne yaşlarının ortalaması ise $28,22\pm 5,69$ yıl idi. Grup 1 ve Grup 2'de anne yaşları açısından anlamlı bir farklılık görmedik.

Hipospadiasın etyolojisinde ailesel genetik yatkınlık da mümkündür (23). Bin üç yüz on dört vakalık bir dizi hastayı inceleyen Leung ve ark. (70) vakaların % 5,4'ünde ailelerinde en az bir tane hipospadiaslı birey olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada doku çalışılan Grup 1'deki 28 hastadan 2'sinde 1. derece aile yakınında 3'ünde 2. derece aile yakınında hipospadias mevcuttu. Grup 2'deki 20 hastadan 1'inde 1.derece aile yakınında, 3 hastada 2. derece aile yakınında hipospadias mevcuttu. Grup 1'de ailesel genetik yatkınlık %10,7 iken Grup 2'de

%15 idi. Gruplar arasında aile öyküsü açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). Kan örnekleri alınan çalışma grubunda Grup 1’de 10 hastanın; 2 tanesinde 1. derece, 8 tanesinde 2. derece aile öyküsünde hipospadias mevcuttu. Grup 2’de ise 20 hastanın 7 tanesinde 1. derece, 13 tanesinde 2. derece aile öyküsü mevcuttu. Gruplar arasında aile öyküsü açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark görüldü ($p<0,05$).

Sonuç olarak;

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniği’nde yapılan çalışma, Türkiye’nin Doğu Anadolu Bölgesi’nde hipospadiasda SHH yolağındaki genlerin rolü bulunduğu bilgisini desteklemektedir. Bu çalışmada normal prepüsyuma kıyasla hipospadiaslı hastaların penil derilerinde SHH proteininin ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ile birlikte SHH geninin hipospadias gelişiminde önemli ve kritik bir rolü olabileceği söylenebilir. Farklı çalışmalar değerlendirildiğinde bütün bulgular; SHH yolağında görevli genlerin hipospadias etyolojisinde rol alabileceğine işaret etmekte ve bu bileşiklerdeki azalmaların hipospadias anomalisindeki artışlarla korele olduğunu göstermektedir. Bu hastalıktan etkilenen hastalarda endokrin çevre bozuculara maruziyet sorgulaması dahil olmak üzere çok sıkı değerlendirmeye izole edilen hipospadiaslılarda SHH yolağının daha fazla araştırılması, SHH ile hipospadias arasındaki nedensel ilişkiyi ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır. Fetal genital tüberkülda SHH’nın in-vitro ekspresyonu, in-vivo regülasyonu ve doku dağılımını araştıran başka çalışmalar, SHH’nın hipospadias gelişimine nasıl katkıda bulunduğunu aydınlatmada yararlı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

1. Baskin LS, Ebbers MB. Hypospadias: anatomy, etiology, and technique. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 463–472.
2. Bauer SB, Retik AB, Colodny AH. Genetic aspects of hypospadias. *Urol Clin North Am* 1981; 8: 559–564.
3. Belman AB. Hypospadias. Welch KJ, Randolph JG, Ravitch MM, O'Neill JA and Rowe MI (editors). *Pediatric Surgery*, Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc, 1986: 1286.
4. Carmichael SL, Shaw GM, Nelson V, Selvin S, Torfs CP, Curry CJ. Hypospadias in California. Trends and descriptive epidemiology. *Epidemiology* 2003; 14: 701–706.
5. Akin Y, Ercan O, Telatar B, Tarhan F, Comert S. Hypospadias in İstanbul. *Pediatr Int* 2011; 53: 754–760.
6. Kurahashi N, Murakumo M, Kakizaki H, Nonomura K, Koyanagi T, Kasai S, et al. The estimated prevalence of hypospadias in Hokkaido, Japan. *J Epidemiol* 2004; 14: 73–77.
7. Morera A, Valmalle A, Asensio M, Durand P. A study of risk factors for hypospadias in the Rhone–Alpes region (France). *Journal of Ped Urology* 2006; 2: 169–177.
8. Barry B, Lowell R, Stephen KA. *Clinical Pediatric Urology*. Fourth Edition; Chapter 32, Hypospadias and chordee 2010: 1061–1092.
9. Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeneij LA, de Gier RP, Roeleveld N. Risk factors for hypospadias. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 671–678.
10. Silver RI. What is the etiology of hypospadias? A review of recent research. *Del Med J* 2000; 72: 343–347.
11. Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. Inhibin, activin, follistatin and follicle stimulating hormone serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 2008; 136: 345–359.

12. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996; 6: 298–304.
13. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 383: 407–413.
14. Walterhouse DO, Lamm ML, Villavicencio E, Iannaccone PM. Emerging roles for hedgehog–patched–Gli signal transduction in reproduction. *Biol Reprod* 2003; 69: 8–14.
15. Podlasek CA, Baniett DH, Clemens Bak PM, Bushman W. Prostate Development Requires Sonic Hedgehog Expressed by the Urogenital Sinus Epithelium. *Dev Biology* 1999; 209: 28–39.
16. Haraguchi R, Mo R, Hui C, Motoyama J, Makino S, Shiroishi T, et al. Unique Functions of Sonic Hedgehog Signaling During External Genitalia Development. *Development* 2001; 128: 4241–4250.
17. Perriton CL, Powles N, Chiang C, Maconochie MK, Cohn MJ. Sonic Hedgehog Signaling From the Urethral Epithelium Controls External Genital Development. *Dev Biol* 2002; 247: 26–46.
18. Podlasek CA, Zeiner DJ, Jiang HB, Tang Y, Houston J, McKenna KE, et al. SHH Cascade is Required for Penile Postnatal Morphogenesis, Differentiation and Adult Homeostasis. *Biol Reprod* 2003; 68: 423–438.
19. Baskin LS, Colborn T, Himes K. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection? *Environ Health Perspect* 2001; 109: 1175–1183.
20. Smith ED: Hypospadias. Ascraft KW (editor). *Pediatric Urology*. Philadelphia; WB Saunders Company, 1990: 353–395.
21. Duckett JW. Hypospadias *pediatr Review* 1989; 1137–1142.
22. Sweet RA, Schrott HG, Kurland R. Study of the incidence of hypospadias in Rochester, Minesota 1940–1970 and a case control comparison of possible etiology factors. *Mayo Clin Proc* 1974; 49: 52–58.

23. Gallentine ML, Morey AF, Thomson IM. Hypospadias. A contemporary epidemiologic assessment. *Urology* 2001; 57: 877–790.
24. Paulozzi LJ, Erickson D, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 1997; 100: 831–834.
25. Kalen B, Winberg J. An epidemiologic study of hypospadias in Sweden. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1982; 293: 1–52.
26. Frydman M, Greiber C, Cohen HA. Uncomplicated familial hypospadias: evidence for autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet* 1985; 21: 51–60.
27. Hacker V. Zur operativen Behandlung der hypospadias glandis. *Beitr Klin Chir* 1998; 22; 271–276.
28. Bevan AD. A new operation for hypospadias. *JAMA* 1917; 68: 1032–1034.
29. Carmichael SL, Shaw GM, Laurent C, Croughan MS, Olney RS, Lammer EJ. Maternal progestine intake and risk of hypospadias. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159; 957–962.
30. Babuçu O, Hoşnüter M, Kargı E. Congenital anomaly screening among 2785 school-age children in Zonguldak city. *J Clin Sci Dr* 2004; 10: 424–427.
31. Karaman İM, Kaya C, Özkuvancı U. The hypospadias profile in Turkey: A multicentric study. *Turk J Urol* 2007; 33: 471–475.
32. Kayıkçı MA, Cam K, Akman RY. The ratio of external genital anomalies in male children attending primary school in Düzce. *Turk J Urol* 2005; 31: 79–81.
33. Çakmak A, Çağlayan F, Çakmak M, Erdoğan A, Ulusoy S, Saygun M. Kırıkkale ili ilköğretim birinci sınıf çocuklarında ürogenital sistem patolojileri. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 4: 23–25.
34. Büyükuşal SNC. Evolution of hypospadias surgery: Historical Perspective. In Hadidi AT, Azmy AF (editors). *Hypospadias Surgery*, Berlin: Springer 2004: 3–15.
35. Hadidi AT, Azmy AF. Classification of hypospadias. *Hypospadias Surgery, an Illustrative Guide*. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag; 2004: 79–82.

36. Marrocco G, Grammatico P, Vallasciani S, Gulia C, Zangari A, Marrocco F, et al. Environmental, parental and gestational factors that influence the occurrence of hypospadias in male patients. *J Pediatr Urol* 2015; 11: 12–19.
37. Van der Zanden LF, Galesloot TE, Feitz WF, Brouwers MM, Shi M, Knoers NV, et al. Exploration of gene environment interactions, maternal effects and parent of origin effects in the etiology of hypospadias. *J Urol* 2012; 188: 2354–2360.
38. Huang G, Shan W, Zeng L, Huang L. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and risk of isolated hypospadias: results from a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2015; 14: 1580–1588.
39. Carmichael SL, Shaw GM, Lammer EJ. Environmental and genetic contributors to hypospadias: a review of the epidemiologic evidence. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012; 94: 499–510.
40. Brouwers MM, van der Zanden LF, de Gier RP, Barten EJ, Zielhuis GA, Feitz WF, et al. Hypospadias: risk factor patterns and different phenotypes. *BJU Int* 2010; 105: 254–262.
41. Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard MO, Daures JP, Sultan C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil Steril* 2011; 95: 2574–2577.
42. Carmichael SL, Witte JS, Ma C, Lammer EJ, Shaw GM. Hypospadias and variants in genes related to sex hormone biosynthesis and metabolism. *Andrology* 2014; 2: 130–137.
43. Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 1995; 35: 581–585.
44. Shih EM, Graham JM Jr. Review of genetic and environmental factors leading to hypospadias. *Eur J Med Genet* 2014; 57: 453–463.
45. Chen MJ, Macias CG, Gunn SK, Dietrich JE, Roth DR, Schlomer BJ, et al. Intrauterine growth restriction and hypospadias: is there a connection? *Int J Pediatr Endocrinol* 2014; 2014: 20–21.

46. Gatti JM, Kirsch AJ, Troyer WA, Perez–Brayfield MR, Smith EA, Scherz HC. Increased incidence of hypospadias in small for gestational age infants in a neonatal intensive–care unit. *BJU Int* 2001; 87: 548–550.
47. Yang Q, Qu WY, Yang L, Wang K, Tu HY, Wang J. Literature on the aetiology of hypospadias in the last 5 years: molecular mechanism and environmental factors. *Andrologia* 2014; 46: 583–591.
48. Klip H, Verloop J, Van Gool JD, Koster ME, Burger CW. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero; a cohort study. *Lanset* 2002; 359: 1102–1107.
49. Pons JC, Papiernik E, Billon A, Hesabi M, Duyme M: Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Prenat Diagn* 2005; 25: 418–419.
50. Huisma F, Thomas M, Armstrong L. Severe hypospadias and its association with maternal–placental factors. *Am J Med Genet A* 2013; 161: 2183–2187.
51. Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeny LA, de Gier RP, Roeleveld N. Hypospadias: a transgenerational effect of diethyl–stilbestrol? *Hum Reprod* 2006; 21: 666–669.
52. Qiao L, Rodriguez E, Weiss DA, Ferretti M, Risbridger G, Cunha GR, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta is dec–reased in hypospadias. *J Urol* 2012; 187: 1427–1433.
53. Carmichael SL, Shaw GM, Laurent C, Lammer EJ, Olney RS. The National Birth Defectrs Prevention Study. *Pediatr Perinat Epidemiol* 2005; 19: 406–413.
54. De Kort CA, Nieuwenhuijsen MJ, Mendez MA. Relationship between maternal dietary patterns and hypospadias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011; 25: 255–264.
55. Mau G: Progestins during pregnancy and hypospadias. *Teratology* 198; 24: 285–287.
56. Kim KS, Baskin LS. Induction of hypospadias in a murine model by maternal exposure to synthetic estrogens. *Environ Res* 2004; 94: 267–275.
57. Willingham E, Agras K, Vilela M, Baskin LS. Loratadine exerts estrogen–like effects and disrupts penile development in the mouse. *J Urol* 2006; 175: 723–726.

58. Wang Z, Chun B, Lina GT, Lina CS, Lue TF, Willingham E, et al. Upregulation of estrogen-responsive genes in hypospadias, a urethral abnormality. *J Urol* 2007; 177: 1939–1946.
59. Gurbuz C, Demir S, Zemheri E. Is activating Transcription factor 3 upregulated in patients with hypospadias? *Korean J Urol* 2010; 51: 561–564.
60. Baskin LS. Hypospadias and urethral development. *J Urol* 2000; 163: 951–956.
61. Yin X, Deville JW, Hai T. A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive response gene, in cancer development. *Oncogene* 2008; 28: 2118–2127.
62. Kramer SA, Aydın G, Kelalis P. Chordee without hypospadias in children. *J Urol* 1982; 128: 559–561.
63. Thompson MR, Xu D, Williams BR. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med* 2009; 87: 1053–1060.
64. Liu B, Wang Z, Lin G, Agras K, Ebbers M, Willingham E. ATF3 is up-regulated in patients with hypospadias. *Pediatr Res* 2005; 58: 1280–1283.
65. Gupta C, Chandorkar A, Nguyen AP. Activation of androgen receptor in epidermal growth factor modulation of fetal mouse sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 123: 89–95.
66. Kim KS, Torres CR, Yucel S, Raimondo K, Cunha GR, Baskin LS. Induction of hypospadias in a murine model by maternal exposure to synthetic estrogens. *Environ Res* 2004; 94: 267–275.
67. Buckley J, Willingham E, Agras K, Baskin LS. Embryonic exposure to the fungicide vinclozolin causes virilization of females and alteration of progesterone receptor expression in vivo: an experimental study in mice. *Environ Health* 2006; 21: 4–5.
68. Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P, Gray LE. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol and Health* 1999; 15: 80–93.

69. North K, Golding J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon longitudinal study of pregnancy and childhood, *BJU Int* 2000; 85: 107–113.
70. Leung TJ, Baird PA, Mc Gillivray B, Hypospadias in British Columbia. *Am J Med Genet* 1985; 21: 39–50.
71. Duckett JW. Hypospadias. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED (editors). *Campbell's Urology*. Philadelphia: WB Saunders, 1998: 2093–2119.
72. Bellman, AB. Hypospadias and other urethral abnormalities. *Clinical Pediatric Urology*. Kelalis PP, King LR, Belman AB (editors). Third edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 619–663.
73. Smith EP, Wacksman J, Evaluation of severe hypospadias. *J Pediatr* 1997; 131: 344–346.
74. Stokowski LA, Hypospadias in the neonate. *Adv Neonatal Care* 2004; 4: 206–215.
75. Van der Zanden LF, Van Rooij IA, Feitz WF, Vermeulen SH, Kiemeneij LA, Knoers NV, et al. Genetics of hypospadias: are single-nucleotide polymorphisms in SRDA5, ESR1, ESR2 and ATF3 really associated with the malformation? *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2384–2390.
76. Morgan EA, Nguyen SB, Scott V, Stadler HS. Loss of Bmp7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development* 2003; 30: 3095–3109.
77. Demir S. Hipospadias Etiyolojisinde Activating Transcription Factor 3 (ATF3) Genin Rolü. *Tıpta Uzmanlık Tezi*. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2. Üroloji Kliniği, 2009.
78. Svechnikov K, Stukenborg JB, Savchuck I, Söder O. Similar causes of reproductive disorders in early life. *Asian J Androl* 2014; 16: 50–59.
79. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editors). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2016: 87–102.
80. Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, Mc Elreavey K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *Br Med Bull* 2013; 106: 67–89.

81. Thorup J, Nordenskjöld A, Hutson JM. Genetic and environmental origins of hypospadias. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; 21: 227–232.
82. Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. The genetic and environmental factors underlying hypospadias. *Sex Dev* 2015; 9: 239–259.
83. Topcu V, Ilgin–Ruhi H, Siklar Z, Karabulut HG, Berberoglu M, Hacıhamdioglu B, et al. Investigation of androgen receptor gene mutations in a series of 21 patients with 46 XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 28: 1257–1263.
84. Karabulut R, Turkyılmaz Z, Sonmez K, Kumas G, Ergun SG, Ergun MA, et al. Twenty–Four Genes are Up Regulated in Patients with Hypospadias. *Balkan J Med Genet* 2013; 16: 39–44.
85. Ağras K, Uncugil A. Hipospadiasın etiyolojisi ve epidemiyolojisi. *Turk Urol Sem* 2011; 2: 173–180.
86. Arıncı K, Alaittin E. *Anatomi. 1. Cilt.* Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2014: 46–52.
87. Netter FH. *Atlas of Human Anatomy.* Philadelphia: Saunders, 2011: 174–186.
88. Arifoğlu Y. *Her Yönüyle Anatomi.* İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi, 2016: 196–210.
89. Waschke J, Paulsen F. *Sobotta İnsan Anatomisi Atlası.* (Elhan A, Karahan ST, (çeviren) s. 342–366. İstanbul: Beta Basım Yayım, 2014.
90. Douglas E, Kelly D, Richard W, Allen C (editors). *Microscopic Anatomy.* Philadelphia: Chapter 2008; 19: 687–722.
91. Snodgrass W. Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias. *J Urol* 1994; 151: 464–465.
92. Cheng EY, Vemulapalli SN, Kropp BP, Pope JC, Furness PD, Kaplan WE, et al. Snodgrass hypospadias repair with vascularized dartos flap: the perfect repair for virgin cases of hypospadias? *J Urol* 2002; 168: 1723–1726.
93. Fritsch H, Kuehnel W. *Color Atlas of Human Anatomy (Cilt 2).* Kopuz C, (çeviren) s. 141–152. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi, 2013.
94. Standing S. *Gray's Anatomy.* London: Churchill Livingstone; 2008: 126–138.

95. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999: 212–285.
96. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER. Integration of the nongenomic and genomic actions of estrogen. Membrane–initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem* 2002; 277: 50768–50775.
97. Stephen S. Stenberg MD. Histology for Pathologists. Barreta J, Caballero C (editors). 2. Baski. Lippincott–Raven, 1997: 1039–1050.
98. Van der Putte SC. Hypospadias and associated penile anomalies: a histopathological study and a reconstruction of the pathogenesis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; 60: 48–60.
99. Baskin LS, Erol A, Li Y. Urethral seam formation and hypospadias. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 379–387.
100. Cunha G, Baskin L, Development of the penileurethra. Baskin LS, (editors), Hypospadias and genital development. Philadelphia: Kluwer Academic/Plenum, 2004: 87–100.
101. Carlson BM (editors). Urogenital System, External Genitalia. Human Embryology and Developmental Biology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014: 399–403.
102. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (editors). Urogenital System, Development of external genitalia. Before We Are Born. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013: 177–184.
103. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (editors). The Urogenital system, development of external genitalia. The developing human. Clinically Oriented Embryology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016: 267–269.
104. Sadler TW (editors). Urogenital System, External genitalia. Langman’s Medical Embryology. 13th ed. Philadelphia: Walters Kluwer Health, 2015: 270–272.
105. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Braver PR, Francis–West P (editors). Development of the reproductive system, development of external genitalia. Larsen’s Human Embryology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2015: 415–418.

106. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 221–238.
107. Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand– foot–genital syndrome. *Nat Genet* 1997; 15: 179–180.
108. Podlasek C, Houston C, McKenna KE, McVary KT. Posterior Hox gene expression in developing genitalia. *Evol Dev* 2002; 4: 142–163.
109. Snodgrass WT. *Pediatric Urology Evidence for Optimal Patient Management*. New York: Springer Science Business Media 2013: 218–236.
110. Snodgrass W. The Urethral Plate. Introduction Embryology and Practical Anatomy for the Surgeon. Instructional/Postgraduate and AM/PM Course Handouts. H0043 PG (Current hypospadias techniques and complications of hypospadias surgery), 96th California: Annual Meeting, Anaheim, 2002: 13–16.
111. Snodgrass W, Prieto J. Straightening ventral curvature while preserving the urethral plate in proximal hypospadias repair. *J Urol* 2009; 182: 1720–1755.
112. Kaplan GW, Lamm DL. Embryogenesis of chordee. *J Urol* 1975; 114: 769–772.
113. Hsieh JT, Wong WY, Chen J, Chang HJ, Liu SP. Congenital isolated penile torsion in adults: untwist with plication. *Urology* 2002; 59: 438–440.
114. Sarkis PE, Sadasivam M. Incidence and predictive factors of isolated neonatal penile glanular torsion. *J Pediatr Urol* 2007; 3: 495–499.
115. Khuri FJ, Hardy BE, Churchill BM. Urologic anomalies associated with hypospadias. *Urol Clin North Am* 1981; 8: 565–571.
116. Huang WY, Chen YF, Guo YJ, Lan CF, Chang HC, Chen SC, et al. Epidemiology of hypospadias and treatment trends in Taiwan: a nationwide study. *J Urol* 2011; 185: 1449–1454.
117. Kajbafzadeh AM, Sabetkish S, Mahboubi AM, Sabetkish N. Single incisional approach for reconstruction of hypospadias and concomitant inguinal hernia. *J Pediatr Urol* 2014; 10: 45–51.

118. Itesako T, Nara K, Matsui F, Matsumoto F. Acquired undescended testes in boys with hypospadias. *J Urol* 2011; 185: 2440–2443.
119. Kraft KH, Shukla AR, Canning DA. Proximal hypospadias. *Scientific World Journal* 2011; 11: 894–906.
120. Kırılı EA, Karnak İ, Çiftçi AO, Kandemir N, Tanyel FC, Şenocak ME. An unexpected diagnosis in children with male phenotype and bilateral nonpalpable gonad: Congenital adrenal hyperplasia with female genotype. *Pediatr Surg Int* 2013; 29: 719–724.
121. Sekaran P, O’Toole S, Flett M, Cascio S. Increased occurrence of disorders of sex development, prematurity and intrauterine growth restriction in children with proximal hypospadias associated with undescended testes. *J Urol* 2013; 189: 1892–1896.
122. Hannula A, Venhola M, Renko M, Pokka T, Huttunen NP, Uhari M. Vesicoureteral reflux in children with suspected and proven urinary tract infection. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 1463–1469.
123. Montini G, Rigon L, Zucchetta P, Fregonese F, Toffolo A, Gobber D, et al. IRIS Group. Prophylaxis after first febrile urinary tract infection in children? A multicenter, randomized, controlled, noninferiority trial. *Pediatrics* 2008; 122: 1064–1071.
124. Roussey–Kesler G, Gradjos V, Idres N, Horen B, Ichay L, Leclair MD, et al. Antibiotic prophylaxis for the prevention of recurrent urinary tract infection in children with low grade vesicoureteral reflux: Results from a prospective randomized study. *J Urol* 2008; 179: 674–679.
125. Chariatte V, Ramseyer P, Cachat F. Uroradiological screening for upper and lower urinary tract anomalies in patients with hypospadias: a systematic literature review. *Evid Based Med* 2013; 18: 11–20.
126. Desautel MG, Stock J, Hanna MK. Müllerian duct remnants: Surgical management and fertility issues. *J Urol* 1999; 162: 1008–1013.
127. Coppens L, Bonnet P, Andrianne R, de Leval J. Adult müllerian duct or utricle cyst: clinical significance and therapeutic management of 65 cases. *J Urol* 2002; 167: 1740–1744.

128. Cilento BG, Atala A. Proximal hypospadias. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 311–328.
129. Gearhart JP, Jeffs RD. The use of parenteral testosterone therapy in genital reconstructive surgery. *J Urol* 1987; 138: 1077–1078.
130. Decter RM, Franzoni D. Distal hypospadias repair by the modified Thierch–Duplay technique with or without hinging the urethral plate: Near ideal way to correct distal hypospadias. *J Urol* 1999; 162: 1156–1158.
131. Manzoni G, Bracka A, Palminteri E, Marrocco G. Hypospadias surgery: when, what and by whom? *BJU Int* 2004; 94: 1188–1195.
132. Kelalis PP. The timing of elective surgery on the genitalia of male children with particular reference to undescended testes and hypospadias. *Pediatrics* 1975; 56: 479–483.
133. Zavitsanakis A, Gougoudi E. Timing of elective hypospadias repair. Hadidi AT, Azmy AF, (editors). *Hypospadias Surgery, an Illustrative Guide*. 1st ed. Berlin: Springer–Verlag, 2004: 83–85.
134. Sandberg DE, Meyer–Bahlburg HF, Aranoff GS, Sconzo JM, Hensle TW. Boys with hypospadias: a survey of behavioral difficulties. *J Pediatr Psychol* 1989; 14: 491–514.
135. Baskin LS, Hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 2004; 545: 3–22.
136. Belman AB. Hypospadias update. *Urology* 1997; 49: 166–172.
137. American Academy of Pediatrics, Section on Urology. Timing of elective surgery on the genitalia of male children with particular reference to the risks, benefits, and psychological effects of surgery and anesthesia. *Pediatrics* 1996; 97: 590–594.
138. Leung AK. Hypospadias. *Core Content Rev Fam Med* 2004; 35: 17–18.
139. Docima SG, Canning DA, Khoury AE. Kelalis–King–Belman *Pediatric Üroloji*. Kilciler M, Dayanç M (Çevirenler), s.1138–1142. 1. Ed. Habitat, 2010.
140. Retik AB, Atala A. Complications of hypospadias repair. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 329–339.

141. Schneuer FJ, Holland AJ, Pereira G, Bower C, Nassar N. Prevalence, repairs and complications of hypospadias: an Australian population-based study. *Arch Dis Child* 2015; 100: 1038–1043.
142. Bhat A, Mandal AK. Acute postoperative complications of hypospadias repair. *Indian J Urol* 2008; 24: 241–248.
143. Wilkinson DJ, Farrelly P, Kenny SE. Outcomes in distal hypospadias: asystematic review of the Mathieu and tubularized incised plate repairs. *J Pediatr Urol* 2012; 8: 307–312.
144. Aigrain Y, Cheikhelard A, Lottmann H, Lortat-Jacob S. Hypospadias: surgery and complications. *Horm Res Paediatr* 2010; 74: 218–222.
145. Bakal Ü, Kazez A. Hipospadias geç dönem komplikasyonları. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Surg Special Tropic* 2017; 7: 321–324.
146. Aulagne MB, Harper L, de Napoli-Cocci S, Bondonny JM, Dobremez E. Long-term outcome of severe hypospadias. *J Pediatr Urol* 2010; 6: 469–472.
147. Rubin LL, Sauvage FJ. Targeting the hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 1026–1033.
148. Belloni E, Muenke M, Roessler E. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 1996; 14: 353–356.
149. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K. Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 1996; 14: 357–360.
150. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 6613–6624.
151. Gupta S, Takebe N, LoRusso P. Targeting the hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2010; 2: 237–250.
152. Daya-Grosjean L, Couve-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 225: 181–192.
153. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15: 3059–3087.

154. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 306–317.
155. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 2008; 22: 2454–2472.
156. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996; 274: 255–259.
157. Micchelli CA, The I, Selva E. Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development* 2002; 129: 843–851.
158. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 331–344.
159. Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN. Cell cycle–dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 2058–2061.
160. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 2007; 317: 372–376.
161. Taipale J, Beachy, PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; 411: 349–354.
162. Corbit KC, Aanstad P, Singla V. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 2005; 437: 1018–1021.
163. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 11325–11330.
164. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 2003; 426: 83–87.
165. Ferretti E, De Smaele E, Di Marcotullio L, Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. *Trends Mol Med* 2005; 11: 537–545.
166. Kim J, Kato M, Beachy PA. Gli2 trafficking links hedgehog–dependent activation of smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 21666–21671.

167. Zhao Y, Tong C, Jiang J. Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* 2007; 450: 252–258.
168. Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 303–312.
169. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85: 841–851.
170. Di Magliano MP, Lee J, Wu X, Peters EC, Wang Y, Hong J, Schultz PG. A small-molecule antagonist of the Hedgehog signaling pathway. *Chem Bio Chem* 2007; 8: 1916–1919.
171. Capdevila J, Johnson RL. Hedgehog signaling in vertebrate and invertebrate limb patterning. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1682–1694.
172. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell–cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 1995; 172: 126–138.
173. Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* 1998; 8: 1083–1086.
174. Persengiev SP, Kondova, II, Millette CF, Kilpatrick DL. Gli family members are differentially expressed during the mitotic phase of spermatogenesis. *Oncogene* 1997; 14: 2259–2264.
175. Kroft TL, Patterson J, Won Yoon J, Doglio L, Walterhouse DO, Iannaccone PM, et al. GLI-1 localization in the germinal epithelial cells alternates between cytoplasm and nucleus: upregulation in transgenic mice blocks spermatogenesis in pachytene. *Biol Reprod* 2001; 65: 1663–1671.
176. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 2002; 16: 1433–1440.
177. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, et al. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13630–13634.

178. Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, et al. The Role of Sonic Hedgehog–Gli2 Pathway in the Masculinization of External Genitalia *Endocrinology* 2011; 152: 2894–2903.
179. Li YY, Tian T, Zhang R, Wang L, Xu J, Fan L, et al. Association between polymorphism of GLI1 gene SNP rs2228226 and chronic lymphocytic leukemia in Chinese population. *Med Oncol* 2014; 31: 294–295.
180. Chen M, Hildebrandt MA, Clague J, Kamat AM, Picornell A, Chang J, et al. Genetic variations in the sonic hedgehog pathway affect clinical outcomes in non–muscle–invasive bladder cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 1235–1245.
181. Haddad–Tóvulli R, Paul FA, Zhang Y, Zhou X, Theil T, Puelles L, et al. Differential requirements for Gli2 and Gli3 in the regional specification of the mouse hypothalamus front neuroanat *Cell* 2015; 25: 9: 34–35.
182. Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. Two critical periods of long–range sonic hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996; 87: 661–673.
183. Pepinsky RB, Rayhorn P, Day ES, Dergay A, Williams KP, Galdes A, et al. Mapping Sonic Hedgehog–receptor Interactions by Steric Interference. *J Biol Chem* 2000; 275: 10995–11001.
184. Podlasek CA, Meroz CL, Tang Y, McKenna KE, McVary KT. Regulation of Cavernous Nerve Injury Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. *Biol Reprod* 2007; 76: 19–28.
185. Byers MR, O’Neill PC, Fink BR. Lidocaine (Without Epinephrine) Does not affect the fine structure or microtubules of the trigeminal nerve in vivo. *Anesthesiology* 1979; 51: 55–57.
186. Fink BR, Kish SJ. Reversible inhibition of rapid axonal transport in vivo by lidocaine hydrochloride. *Anesthesiology* 1976; 44: 139–146.
187. Carmichael SL, Ma C, Edward S. Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development. *J Urol* 2013; 190: 1884–1892.

188. Haraguchi R, Mo R, Hui C. Unique functions of sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* 2001; 128: 4241.
189. Yamada G, Satoh Y, Baskin LS. Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation* 2003; 71: 445–446.
190. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci* 2014; 21: 28–31.
191. Seifert AW, Bouldin CM, Choi KS, Harfe BD, Cohn MJ. Multiphasic and tissue-specific roles of sonic hedgehog in cloacal septation and external genitalia development. *Development* 2009; 136: 3949–3957.
192. Shehata BM, Elmore JM, Bootwala Y, Steelman CK, Bare JB, Shoffeitt CJ, Immunohistochemical characterization of sonic hedgehog and its downstream signaling molecules during human penile development. *Fetal Pediatr Pathol* 2011; 30: 244–251.
193. Periton CL, Powles N, Chiang C, Moconochie MK, Cohn MJ. Sonic hedgehog signaling from the urethral epithelium controls external genital development. *Dev Biol* 2002; 247: 26–46.
194. Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R. The role of sonic hedgehog–gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology* 2011; 152: 2894–2903.
195. Tadi KR, Carponter R, Qasem S. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothed and GLI inhibitors. *Cancers* 2016; 8: 22–23.
196. Bari R, Hartford C, Chan WK, Vong Q, Li Y, Gan K, et al. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis revealed SUFU suppression of acute graft-versus-host disease through downregulation of HLA-DR expression in recipient dendritic cells. *Sci Rep* 2015; 5: 10981–10982.
197. Lesiak A, Sobolewska-Sztychny D, Danilewicz M, Rogowski-Tylman M, Sysa-Jedrzejowska A, Sobjanek M, et al. Sonic hedgehog pathway dysregulation in skin basal-cell carcinoma of a Polish population. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; 51: 219–224.

6. EKLER

Ek 1: Bilgilendirilmiş Onam Formu

GENETİK ARAŞTIRMALAR İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM

Sayın.....

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı ‘Hipospadias genetiğinde SHH (sonic hedgehog) yolağının araştırılması’ isimli bir çalışma yapmaktadır. Eğer kabul ederseniz sizi de araştırmaya katmak istiyoruz.

Çalışmada hipospadiaslı hastalardan deri (cerrahi sırasında alınan ve çöpe atılacak olan) ve kan (damaryolu açılması sırasında alınan 1 cc kan), kontrol grubunda alınan doku (cerrahi sırasında alınan ve çöpe atılacak olan sünnet derisi) ve kan (damaryolu açılması sırasında alınan 1 cc kan) örneklerinde SHH yolağı araştırılacaktır. Bunun için bu örneklerden genetik olarak moleküler genetik mekanizmaların aydınlatılması için SHH olarak bilinen sinyal iletim yolağında görevli genler Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılacaktır.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır. Toplanan kanlar öncelikle yurt içi, çok gerekli olduğu zaman yurt dışında bir laboratuvarında tetkik edilecektir. Araştırmaya davet edilmenizin nedeni Hipospadias genetiği hakkında araştırmalar yapmaktır.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Araştırmaya katılmak isterseniz Dr. Şenay CANPOLAT tarafından muayene edilecek gerekli olduğunda fotoğrafınız çekilecek ve aile ağacı bilgileriniz çıkarılacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Genetik ve biyokimya analizleri için kolunuzdan 1 tüp (toplam 1ml) kan alınacaktır. Bazen ikinci bir tüp kan daha almak gerekli olabilir. Ayrıca bazı durumlarda yanak içinden sürüntü ya da tükürük örneğinden de yararlanabiliriz. Toplanan kanda yeterli genetik materyal elde edilemediği durumda ya da farklı bir metotla çalışma gerekliliğinde, toplanan kandan hücre çoğaltması yoluna gidilebilir.

Bu işlem hücre kültürü olarak adlandırılır ve bu yolla hücreleriniz ölümsüz olarak çoğaltılabilir.

Kan alınırken iğne batması nedeniyle hafif bir acı duyabilirsiniz. Çok düşük bir ihtimal olsa da kan alırken kanamanın uzaması ya da enfeksiyon gelişmesi riskleri olabilir. Yanak içinden sürüntü alınması halinde düşük bir ihtimalle de olsa sürüntü yerinde enfeksiyon görülebilir.

Sizden alınacak doku ve kan örneği cerrahi sırasında alınan ve çöpe atılacak olan deri ve damaryolu açılması esnasında alınan 1 cc kandan temin edilecektir. Çalışmaya katılmanız durumunda sizden ek bir örnek talebinde bulunulmayacaktır. Kişiyeye ait genetik bilgiler maddi ve sosyal açıdan istismar edilebilecek bilgilerdir. O nedenle araştırma sonuçlarının yalnızca bilimsel amaçlarla ve kimliğinizin gizli tutularak kullanılacağını tekrar vurgulamak istiyoruz. Araştırma sonucunda kendinizde bu hastalık görülmesi bile hastalığa yol açabilecek genleri taşıdığınız ve çocuğunuza kalıtmış olduğunuz ortaya çıkabilir. Bu bilgileri herhangi bir ücret talep etmeden size bildirebiliriz. Bilgi edinmek istemiyorsanız lütfen yazılı formun altında belirtiniz.

Bu risklere ek olarak örneğinizde tüm genom bilgilerinizin elde edileceği geniş ölçekli bir analiz yapılması da gerekli olabilir. Bu analiz sonucunda çocuğunuz ailenizdeki bu hastalık dışında başka hastalıklar için taşıyıcı olduğunuz ya da ileride bu tarz hastalıkları geliştirebileceğiniz bilgisi edinilebilir. Buna ek olarak bazı hastalıklara yatkınlık yaratan genom değişikliklerini de taşıdığınız saptanabilir. Bu bilgilerin büyük bir kısmı henüz klinik önemi ispatlanmamış araştırma düzeyinde olan bilgilerdir. Bu nedenle çalışmamızda klinik önemi olduğu kesinlik kazanmış olan bilgileri herhangi bir ücret talep etmeksizin size iletebiliriz. Diğer bilgiler kimlik bilgileriniz ile ilişkilendirilmeden veri bankalarına eklenerek araştırmacıların kullanımına açılabilir.

Tarafımızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar saklanabilir ve başka genetik araştırmalarda örneğin kontrol örneği olarak kullanılabilir. Lütfen yazılı formun altındaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyerek bu konudaki görüşünüzü belirtiniz.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde

incelenebilecektir. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler kimlik belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçlar dışında kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Araştırmaya katılmak zorunda olmadığınız gibi araştırmaya katılmayı kabul ettiğinizde istediğiniz anda ayrılma hakkına da sahipsiniz. Ancak bu kararınızı bize önceden bildirirseniz araştırmanın bozulmasına meydan vermemiş olursunuz. Katılmak istemediğinizde şu anda sürdürülen tedavi işlemleri bundan etkilenmeyecektir.

Katılımcının Beyanı

Dr. Şenay Canpolat tarafından hipospadias genetiğinde SHH yolağının araştırılması ile ilgili genetik araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi ile riskleri ve tıbbi bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırma ile ilgili sorularım için Dr. Şenay Canpolat'ın 0532 607 31 36 numarası ile temas edebileceğim bana bildirildi. İstediğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Araştırmaya katılımımın tamamen gönüllü olduğu, katılmam ya da katılıp daha sonra araştırmadan çekildiğim durumda tedavi ve tetkiklerimin bundan etkilenmeyeceği belirtildi. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük

bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı Adı–Soyadı Doğum Tarihi Adres/Tel
İmza

Veli/Vasi Adı–Soyadı Doğum Tarihi Adres/Tel
İmza

Tanık Adı–Soyadı Doğum Tarihi Adres/Tel
İmza

Hekim:

Adı Soyadı:

Adresi:

İmza:

Görüşme tarihi ve saati:

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()

Öğrenmek istemiyorum ()

Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin araştırma konusuyla ilgili diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte her türlü genetik çalışmada (kimliğim ile bağlantısız olarak) kullanılmasını onaylıyorum.

Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

Ek 2: Hastaların Demografik Verileri Anket Formu

Hastanın Adı Soyadı:.....

Yaş:.....

Dosya No:.....

Annenin hipospadiaslı çocuğu doğurduğu yaşı:

Hipospadiaslı çocuğun annenin kaçınıcı doğumu olduğu:.....

Hipospadiaslı hastaya anne hamile iken annenin ilaç kullanım öyküsü:

Ailede başka hipospadiaslı bireyin olup olmadığı:

7. ÖZGEÇMİŞ

01.03.1975 tarihinde Ankara'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladıktan sonra 1997 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi bölümünü kazandım. 2003 yılında Tokat Yeşilyurt Sağlık Ocağı'nda göreve başladım. 2005 yılında Ankara Polatlı 112 ASH'e tayinim oldu. Burada 7 yıl çalıştıktan sonra 2013 yılı Ocak ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım.

