

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dinçer AVLAN

**NORMAL VE HİPOSPADİASLI ÇOCUKLARIN
PREPİSYUMLARINDAKİ YAPISAL VE
MOLEKÜLER GENETİK ÖZELLİKLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. İrem İNANÇ

EDİRNE - 2020

TEŐEKKÜR

Anneme, babama ve tez hocam Prof. Dr. Dinçer AVLAN'a, ayrıca bu çalışmanın gerçekteştirilmesinde önemli katkıları olan Tıbbi Genetik ve Tıbbi Patoloji anabilim dallarına ve sevgili çalışma arkadaşlarıma teőekkürlerimle.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
PENİS EMBRİYOLOJİSİ	3
PENİS ANATOMİSİ	4
TANIM VE TARİHÇE	6
EPİDEMİYOLOJİ	7
SINIFLAMA	7
ETİYOLOJİ	9
TEDAVİ	12
GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
BULGULAR	20
TARTIŞMA	27
SONUÇLAR	32
ÖZET	34
SUMMARY	36
KAYNAKLAR	38
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

- ACTB** : Actin beta (aktin beta)
- AR** : Androgen receptor (androjen reseptörü)
- BMP** : Bone morphogenetic protein (kemik morfogenetik protein)
- CD34** : Cluster of differentiation 34 (farklılaşma kümesi 34)
- cDNA** : Complementary DNA (tamamlayıcı DNA)
- ESR** : Estrogen receptor (östrojen reseptörü)
- FGF** : Fibroblast growth factor (fibroblast büyüme faktörü)
- FGFR** : Fibroblast growth factor receptor (fibroblast büyüme faktörü reseptörü)
- HOX** : Homeobox
- HH** : Hedgehog
- PCR** : Polimerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
- PGP 9.5** : Protein gene product 9.5 (protein gen ürünü 9.5)
- SRY** : Sex determining region of Y chromosome (Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi)
- TGF** : Transforming growth factor (dönüştürücü büyüme faktörü)
- TIPU** : Tubularized incised urethroplasty (Tübularize insize üretroplasti)
- WT1** : Wilms tumor supressor gen 1 (Wilms tümör baskılayıcı gen 1)
- ZEB1** : Zinc finger box 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Hipospadias, yaklaşık 200 canlı doğumda bir görülen, sadece erkek çocukları etkileyen, hormonal ve genetik faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği düşünülen doğumsal bir dış genital organ anomalisidir (1). Bu penil anomalinin üç komponenti tanımlanmıştır (2):

- 1.Eksternal üretral açıklığın olması gerekenden aşağıda yerleşimi
- 2.Değişik derecelerde penil kordi veya eğrilik
- 3.Prepsiyumun ventral yüzde açık olması

Intrauterin dönemde her iki cinsiyette dış genital organların öncüsü olarak oluşan genital tüberkül adı verilen yapı, erkekte bulunan Y kromozomu varlığında cinsiyet belirleyici genlerin ve sinyal moleküllerinin etkisiyle orta hatta birleşip bir tüp halinde kapanarak üretrayı, diğer dokular ve prepsiyumun da bu yapıları çevrelemesiyle birlikte penisi meydana getirir. Bu gelişim sürecinde bir aksama olması hipospadiasla sonuçlanmaktadır. Bu süreçte rol oynayan ve genel olarak büyüme faktörleri olarak bilinen bir grup protein yapısındaki moleküllerin üretiminde veya işlevindeki bozuklukların, ya da bu gelişim sürecinde görevli bazı genlerdeki mutasyonların üretra ve prepsiyum gelişimine aksaklıklara neden olduğu düşünülmektedir (2). Genital tüberkül gelişiminde fibroblast growth faktörlerin (FGF), özellikle de FGF10'un, FGF reseptör 2 aracılığıyla epitel ve mezenkim arasında etkileşimi sağlayarak orta hattın kapanmasına etki ettiği, FGFR2 gen mutasyonu olan farelerde hipospadias görüldüğü ortaya konulmuştur (3).

Çeşitli bone morphogenetic protein (BMP) sinyal moleküllerinin de genital tüberkül oluşumunda epitel – mezenkim etkileşiminde rol aldığı ve farelerde üretral epitelden salgılanan BMP7'nin homeobox 13 (HOXA13) geni üzerinden düzenlendiği ifade edilmektedir (4). Gelişmekte olan embriyonun pozisyonuna dair bilgiler taşıdığı bilinen HOX genlerindeki bozuklukların üretral açıklığın yanlış pozisyonuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (5). Ayrıca HOXA13 geni, izole hipospadiaslı hastalarda prepisyumda ve üretrada ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur ve hastalığın sebebi olarak suçlanan genlerden biridir (6).

Üretral tüp gelişimde Transforming growth factor (TGF) sinyal yolağının da etkili olduğu ileri sürülmektedir. Memelilerde yarık damak gelişiminde etkisi olduğu bilinen bu molekülün bir diğer orta hat kapanma bozukluğu olan hipospadiasta da etkili olabileceği öne sürülmüştür (7).

Dış genital yapının gelişimi hormon bağımsız ve hormon bağımlı olmak üzere iki fazda gerçekleşmektedir. Hormon bağımlı fazında oluşacak aksaklıkların da hipospadiasla sonuçlanabildiği bilinmektedir. Literatürde normal popülasyona göre hipospadiaslı çocuklarda androjen reseptör (AR) genini artmış olarak saptandığı bildirilmiştir (8). Benzer olarak gebelikte östrojen maruziyetinin erkek dış genital yapısında anomalilerle sonuçlandığı ortaya konmuş, ayrıca östrojen reseptör 1 geninin (ESR1) hipospadiasla ilişkili olduğu yayınlanmıştır (3).

Hipospadiasta prepisyum gelişim kusuru da bulunduğundan prepisyumdaki yapısal farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Sünnet için başvuran hastalardan yapılan prepisyum biyopsileriyle yaşa göre sünnet derisinin fibroblast ve damarsal yapısının farklılaştığını göstermiştir (9). Başka bir çalışmada da prepisyumdaki nöral yoğunluk karşılaştırılmış ve farklılık olabileceği gösterilmiştir (10).

Yukarıda bahsedilen literatür bilgileri ışığında, çalışmamız hipospadias gelişimine neden olabilecek genetik, hormonal ve yapısal sebeplerin ortaya konulabilmesi ve ileride muhtemel bir tedavi değişikliğine yol açabilmesi bakımından yararlı olabileceği düşüncesiyle tasarlanmıştır.

Hipospadiasın günümüzde tek tedavisi ameliyat olup ilerleyen zamanlarda medikal tedavi ile giderilebilmesi ve hatta oluşumunun engellenebilmesi için literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

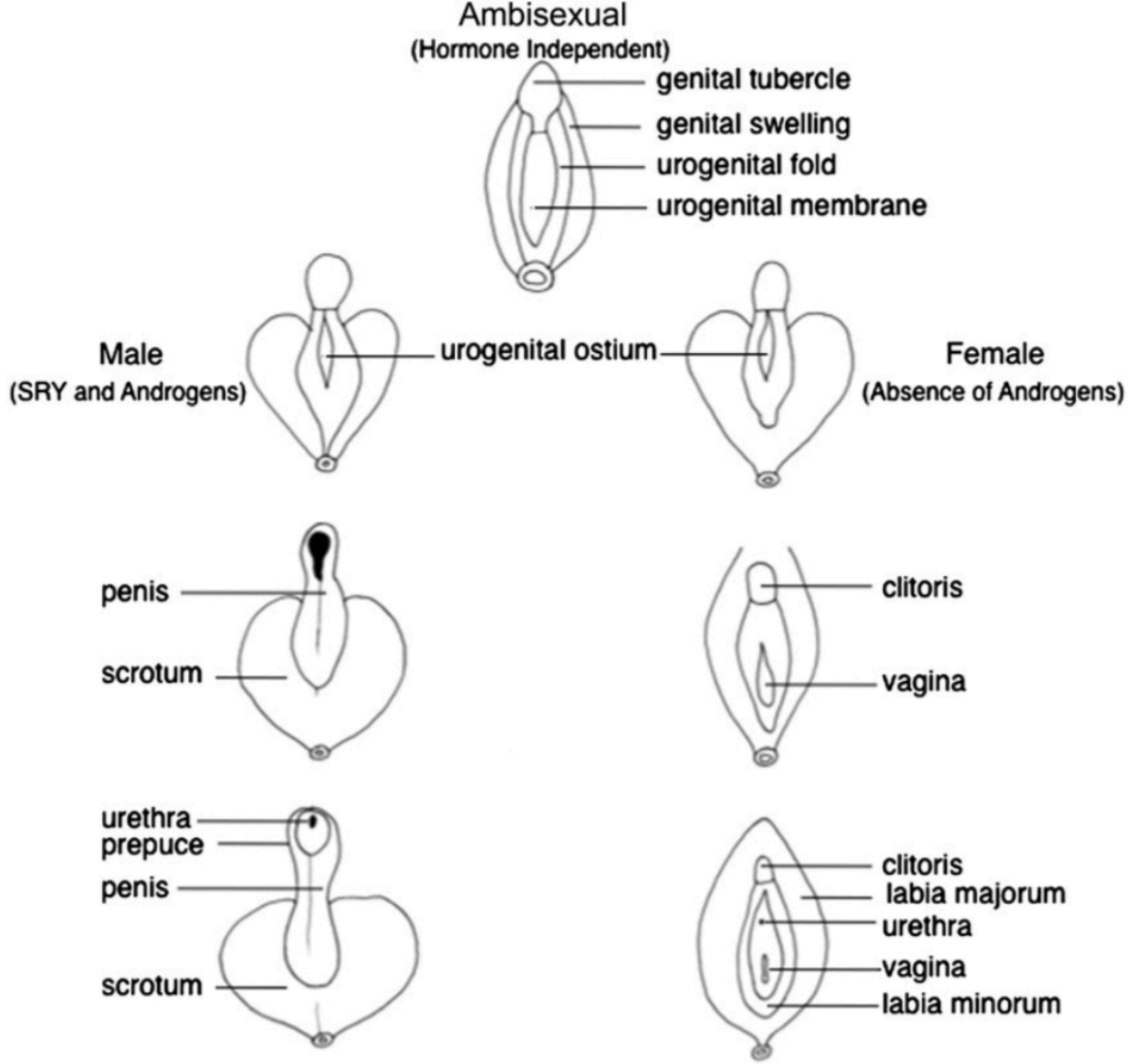
GENEL BİLGİLER

PENİS EMBRİYOLOJİSİ

Eksternal genital organların gelişimi, erken hormon bağımsız faz (5-8 hafta) ve geç hormon bağımlı cinsiyet farklılaşma fazı (8-20) hafta olarak ikiye ayrılır (11). Erken hormon bağımsız fazda dişi ve erkek genital organları birbirinden farksızdır. 5. embriyolojik haftada kloakal katlantılar mezenkimal hücrelerin perineye göçüyle genital tüberkül adı verilen orta hattaki yükseltiyi oluşturur (2). Eksternal genitalyanın öncüsü olarak kabul edilen genital tüberkül, her iki cinsiyette morfolojik olarak aynıdır, ürogenital sinüsten meydana gelen lateral plate mezodermi, yüzey ektodermi ve endodermal üretral epitelden meydana gelmektedir (11). 6. haftada gonadlar ve seks kordları oluşur, perinede ürogenital ve labioskrotal katlantılar oluşmaya başlar, 7. hafta Mullerian ve Wolf kanalları meydana gelir (2).

Geç hormon bağımlı cinsiyet farklılaşma fazında ise fetal testiste leydig hücrelerinden salgılanan testosteron nedeniyle eksternal genital organlar erkek morfolojisinde görünmeye başlar. Bunun için sex determining region of Y chromosome (SRY) geni sinyal yolağını başlatır (12). Genital tüberkül fallusu oluşturacak şekilde uzar ve sonuçta bu fallus penise dönüşür. Epitelyal üretral plate, genital tüberkülün ucuna doğru uzar, genital tüberkülün ventral yüzünde üretral katlantılarla sınırlanan bir oluk oluşturur (2). Üretral katlantıların kenarları posteriordan anteriora doğru birleşerek üretrayı meydana getirir. (Şekil 1) Bu

nedence hipospadias gelişiminde rol oynayan çeşitli faktörlerin geç hormon bağımlı cinsiyet farklılaşma fazı bitmeden meydana geldiği düşünölmektedir (11).

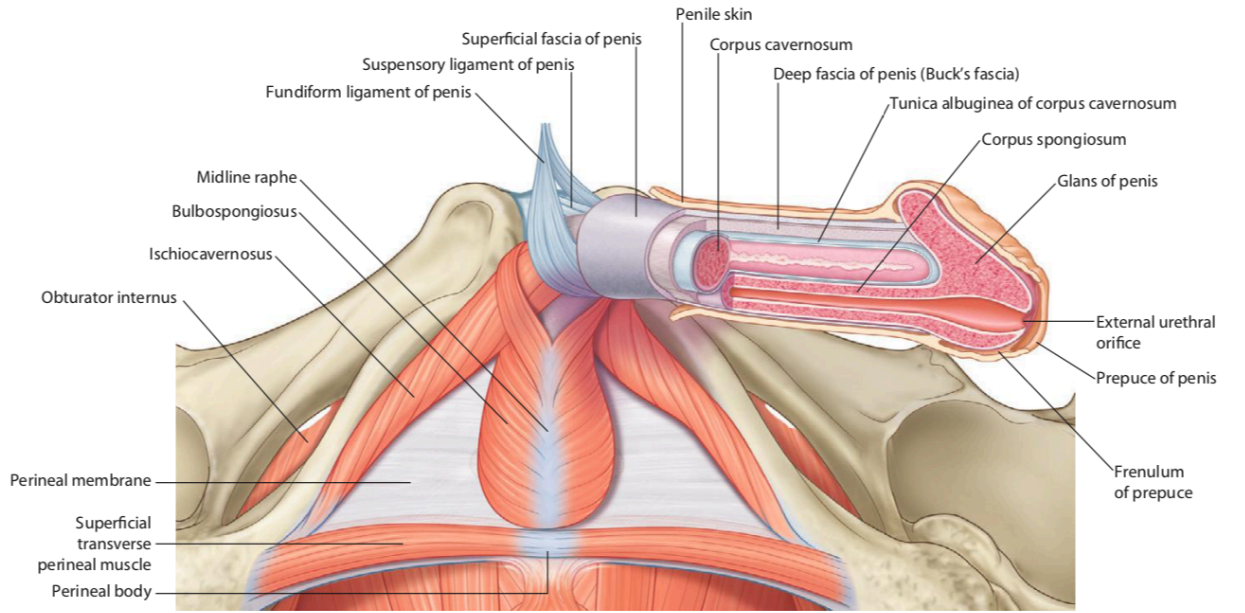


şekil 1. Eksternal genital organların embriyoloji gelişim süreci (2)

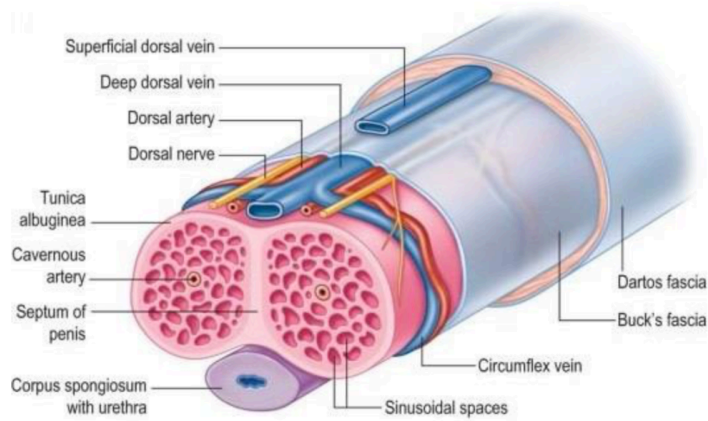
PENİS ANATOMİSİ

Penis iki corpus cavernosum ve bir corpus spongiosum'dan meydana gelmiştir ve corpus spongiosum spongioz üretrayı içermektedir. Corpus spongiosum'un distal ucu da glansı oluşturmaktadır. Penisin anatomik pozisyonu erektil olduğundan corpus cavernosumlar dorsal, corpus spongiosum ventral yerleşimli olarak adlandırılır.

Penisin kök kısmı iki ligamanla desteklenmektedir; fundiform ve asıcı ligamanlar. Asıcı ligaman penis kökünü symphysis pubise asarken, fundiform ligaman superiorda linea albaya yapışmakta olup ikiye ayrılarak penisin iki yanına gider ve inferiorda tekrar birleşir. Penisin gövde kısmı tamamen deri ile örtülüdür. Derinin dital kısmı prepisyum ve frenulumu oluşturmaktadır. Yüzeyden derine doğru penisi çevreleyen yapılar; deri, yüzeysel fasya (*Colles*), derin fasya (*Buck*), tunika albuginea'dır (13,14). (Şekil 2 ve 3)



Şekil 2. Penis anatomisi (14)



Şekil 3. Penis anatomisi, damar ve sinir yapıları kesitsel görünüm (14)

Dorsal yüzde Buck fasyasıyla tunika albuginea arasında iki yanda dorsal arterler ve sinirler, bunların arasında derin dorsal ven ve lenfatikler seyreder. Aynı planda ventral yüzde corpus cavernosum ve corpus spongiosum arasında vena profunda penis yer alır (Şekil 3). Penisin arteriyel kanlanmasını eksternal pudental arter sağlarken, venöz dönüş de eksternal pudental ven yoluyla femoral vene gerçekleşir.

Ön ve arka yüzde penisi çepeçevre saran zengin bir kollateral ağ mevcuttur (15).

Hipospadik peniste anatomik bozukluk üretra eksikliğiyle sınırlı olmayıp, ventral yüzde corpus spongiosum özellikle uretranın distal kesimlerinde rudimenterdir. Deri, dartos ve Buck fasyaları da ince, atrofik ve fibrotiktir. Ön yüzde prepisyum yoktur, dorsal yüzde kapüşon görünümü oluşturacak şekilde yığılı görünümündedir (15).

TANIM VE TARİHÇE

Hipospadias, Yunanca'da "altında" anlamına gelen "hypo" ve "yarık" anlamına gelen "spadon" sözcüklerinin birleşiminden meydana gelmektedir (16). Embriyogenezis sırasında üretral, prepusyal ve ventral penil yapıların tam kapanamaması sonucu üretral açıklığın penisin ventral yüzünde, olması gerekenden daha proksimal yerleşimli açılması olarak tanımlanır (17-20). Bu durum üretral açıklığın penil shaft, penoskrotal bölge, hatta perinede bulunmasına yol açabilmektedir (18).

Tarihte ilk defa Galen tarafından tanımlanmış ve üretral açıklık seviyesine kadar ampütasyon ve glansın şeklini koruyacak konik bir insizyon önerilmiştir (21,22). Günümüzde halen hipospadias tedavisi cerrahi olmakla birlikte, tedaviye yönelik ilk cerrahi girişimin İskenderiye'de M.S. I.-II. yüzyılda yaşamış olan Heliodoros ve Antyllus tarafından yapıldığı bilinmektedir (21). Kordi de ilk olarak Galen tarafından tanımlanmış ancak 1842'de Mettauer'in ventraldeki cilt kısısalığı yüzünden meydana geldiğine dikkat çekmesine kadar yaklaşık 1500 yıl unutulmuştur (21).

15. yüzyılda Şerafettin Sabuncuoğlu meatal darlıkta "mibza" adını verdiği bir bıçağı kullanmış ve üretraya metal bir sonda yerleştirmiştir, ayrıca el yazmalarında hipospadiasın sınıflandırılmasından ayrıntılı olarak bahsedilmektedir (23). Prepisyum kullanılarak üretroplasti tekniği Thiersch tarafından 1869'da ve Duplay tarafından 1874'te tanımlanmış ve modern hipospadias cerrahisinin temelleri atılmıştır (21). Onarımda pediküllü prepisyal tüplerin kullanılması Van Hook tarafından 1896, Rochet tarafından 1899'da tanımlanmıştır (21,22). Cerrahi onarımda günümüzde artık nadiren kullanılan skrotal dokular da Bouisson tarafından 1860'dan kullanılmıştır (21).

20. yüzyılda, günümüzde kullanılan hipospadias cerrahi onarım teknikleri büyük ölçüde şekillenmiştir. Mathieu 1932 yılında meatal tabanlı flep ile tek seansta hipospadias onarımını ortaya koymuştur (24). Duckett'ın (25) glanüler ve subkoronal vakalar için metal ilerletme ve glanüloplasti (MAGPI) tekniğini 1981'de ve Snogross'ın (26) tübularize insize üretroplasti (TIPU) tekniğini 1994'te yayınlamasıyla hipospadias cerrahisinde önemli ölçüde yol alınmış ve ağır vakalar da başarıyla tedavi edilmeye başlanmıştır. Hipospadias cerrahisinde tanımlanmış 250'den fazla teknik vardır ve "cerrahide daha önce tanımlanmamış yeni bir şey yoktur" deyişi hipospadias için söylenmiş gibidir (15,21).

EPİDEMİYOLOJİ

Hipospadias, erkek çocuklarda inmemiş testisten sonra en sık görülen ikinci konjenital anomali ve penisin en sık görülen konjenital anomalisidir (27). 200 - 300 erkek çocuktan birinde görülmektedir (2,15,18,28). Olguların yaklaşık %10'unda ailesel olgular bulunmakta olup, erkek kardeşinde hipospadias bulunan bir erkek olguda hipospadias görülme riski %9-17'dir (29,30). Distal tip olarak bilinen glanüler ve subkoronal tipteki hipospadiasların görülme sıklığı proksimal tiplerden daha yüksektir. Distal tipler 1/80-125 oranında görülürken penil tipler 1/1250, penoskrotal ve perineal tipler 1/3300 oranında görülmektedir (17,30-34). Görülme sıklığının arttığını bildiren yayınlar olsa da (18,31), bunun hastalığın bilinirliğinin artması ve sürveyans sistemlerindeki gelişmeden olduğu düşünülmektedir (32,33,35-38)

SINIFLAMA

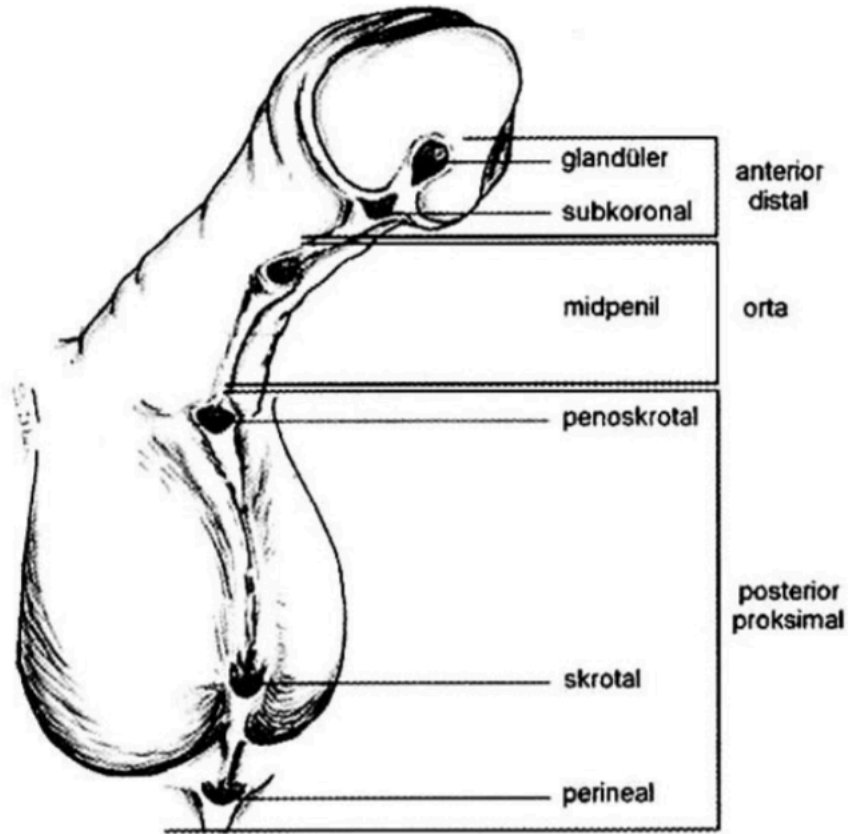
Hipospadiasta sınıflama üretral meatusun yerleşim yerine göre yapılmaktadır. Eski fakat popüler olan sınıflandırma Smith'in çalışmasına dayanır (15,39). Smith (39), glansın ucundan koronaya kadar olan meatus yerleşimlerine birinci, subkoronadan penoskrotal bileşkeye kadar olan bölgedekilere ikinci ve penoskrotal bileşkeden daha proksimalde yerleşimli olanları da üçüncü derece olarak adlandırmıştır.

Schaeffer ve Erbes (40) 1950'de sınıflandırmayı ameliyat öncesi meatusun yerleşimine göre basitleştirmişlerdir. Bu sınıflamaya göre meatus glans yerleşimli ise glanüler, penil şaftta herhangi bir yerde yerleşimliyse penil ve penoskrotal bileşkenin proksimalindeyse perineal olarak sınıflanmıştır (15,41).

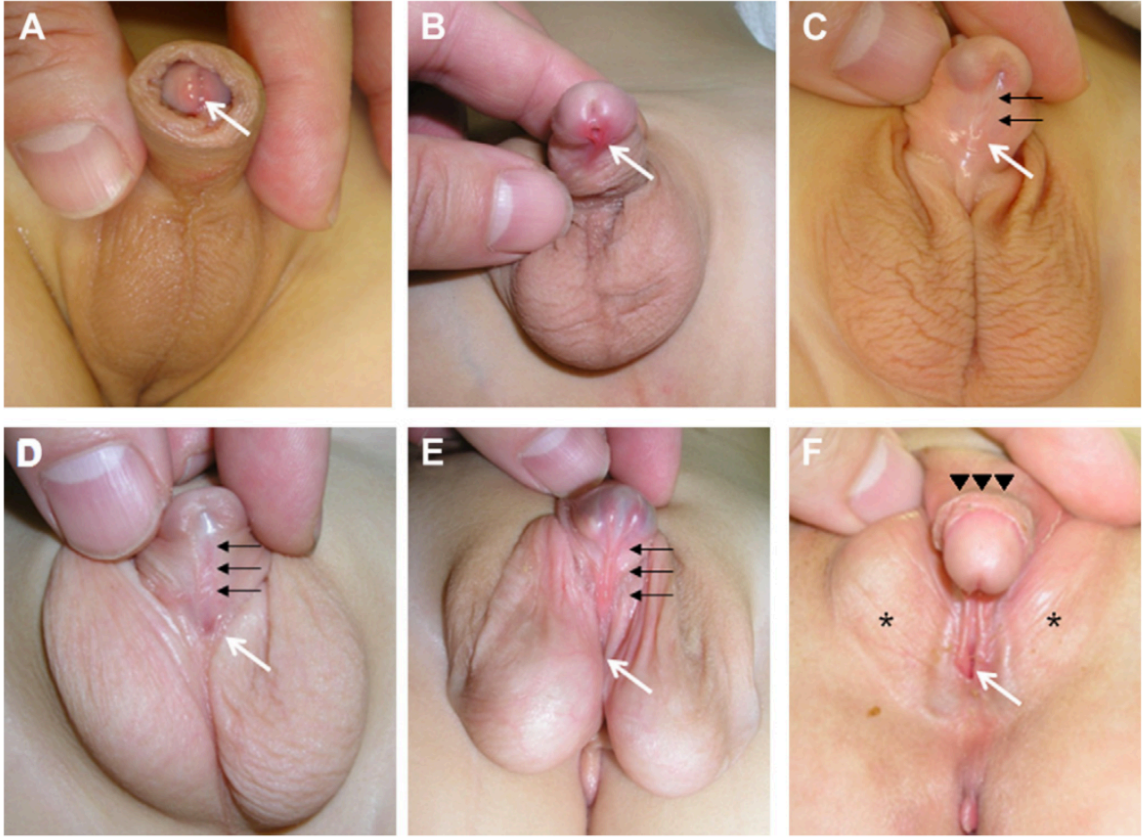
Ancak hipospadiasla birlikte kordinin mevcut olması ve kordi düzeltildikten sonra meanın yer değiştirmesi nedeniyle, cerrahlar üretral meanın yeni lokalizasyonuna göre sınıflandırma yapan Barcat sınıflamasını (42) tercih etmektedirler. 1996 yılında Duckett

(17), Barcat sınıflamasıyla büyük benzerlik gösteren bir sınıflama yapmıştır. Buna göre çeşitli serilerde, kordi düzeltildikten sonra %49-73,4 oranında anterior veya distal, %7,1-21 oranında penisin orta kesimlerinde ve %17,5-30 oranında proksimal yerleşimlidir (15).

Ancak son yıllarda glanüler (glans ile korona arası), distal (korona ile penis gövdesinin orta kesimi) ve proksimal hipospadias (penis gövdesinin orta kesiminin daha proksimali) şeklinde yapılan sınıflama daha fazla tercih edilir olmuştur (11,15). (Şekil 4 ve 5)



Şekil 4. Hipospadias sınıflandırması (15)



Şekil 5. Normal eksternal genital yapılar (A) ve üretral meatusun yerleşimine göre hipospadias tipleri (B-F). (B) glanüler tip, (C) penil tip, (D) penoskrotal tip, (E) skrotal tip, (F) bifid skrotumun (*) eşlik ettiği perineal tip. Beyaz ok işaretleri üretral meatusu, siyah ok üretral plate'i, ok başı da kapüşonlu prepisyum görünümünü belirtmektedir (11).

ETİYOLOJİ

Hipospadias etiyojisi kesin olarak ortaya konulamamış olmakla birlikte genetik, endokrin ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı düşünülmektedir (2,27,43-47) Hipospadiaslı hastaların sadece %30'unda açık bir genetik sebep bulunabilmektedir (27). Ancak ek anomalinin eşlik etmediği izole hipospadiaslarda bu oran %10'a kadar düşmektedir (43).

Bununla birlikte, hipospadias, 200'den fazla genetik sendromla ilişkilendirilmiştir (48). Bunlardan en bilinenleri WAGR (Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon), Denys-Drash sendromu (genitoüriner malformasyonlar ve Wilms tümörüne yatkınlık) ve kalp, akciğer, gastrointestinal ve genitoüriner sistem malformasyonlarının birlikte görüldüğü Smith-Lemli-Opitz sendromudur (45,48).

Hipospadias için şimdiye kadar saptanabilen en büyük risk faktörü, ailede hipospadiaslı bir olgunun varlığıdır (49). Genetik geçişin maternal ve paternal yoldan eşit oranda olduğu düşünülmektedir (29). Proksimal hipospadiaslarda genetik geçişin daha fazla olduğu görülmüştür (50).

Genital yapıların maskülenizasyonu için fetal hayatta testisten salgılanan testosteron ve başka androjenlerin varlığına ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (15,45). Dördüncü haftadan itibaren salgılanmaya başlayan ve 8-12. haftalar arasında pik yapan human koryonik gonadotropinin (hCG) etkisiyle Leydig hücreleri prolifer olmaktadır, bu dönem üretral kıvrımların tübularizasyonu ile aynı döneme rastlamaktadır (2,15). Bu nedenle hipospadiasın ortaya çıkışındaki en büyük rolün androjen uyarısındaki yetersizlik olduğu düşünülür (15,51-53).

Eksternal genital organların gelişimi için, testisten salınan testosteron ve dihidrotestosteron androjen reseptörüne (AR) bağlanır ve transkripsiyonel yanıtı aktive eder. AR, gelişmekte olan penis ve üretrada ekspres edilir (54). Gebe farelere uygulanan AR antagonisti sonrası erkek farelerde hipospadias geliştiği saptanmıştır (11,55). Hipospadiaslı hastaların prepisyumlarında bakılan AR gen ekspresyonu da kontrol grubuna göre düşük olarak bulunmuştur (56)

Azalmış testosteron kadar, artmış östrojenlerin de hipospadias açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir (57). Sentetik östrojen preparatı olan dietilstilbestrole intrauterin dönemde maruz kalan erkek bebeklerde hipospadias riskinin arttığı gösterilmiştir (58). Hipospadiaslı hastalarda östrojen reseptör (ESR) genlerinde çeşitli polimorfizmler saptanmıştır (59). İnsanda ESR1 ve ESR2 olmak üzere 2 çeşit ESR geni bulunmaktadır ve hipospadiaslı hastaların prepisyumlarında kontrol grubuna göre ekspresyonu azalmış olarak raporlanmıştır (60).

Embriyonik gelişimde distal üretral plate epitelinin major sinyal merkezi olduğu ve genital tüberkül gelişimini çeşitli sinyal yollarıyla düzenlediği düşünülmektedir (61,62). Hedgehog (HH) genleri, Fibroblast growth faktör (FGF), Bone morphogenetic protein (BMP) ve Wilms Tümör-1(WT1) geni bu yollardandır (11,45,62,63). Memelilerde; Sonic HH (SHH), Desert HH (DHH) ve Indian HH (IHH) olmak üzere 3 çeşit HH geni mevcuttur ve hormon bağımsız fazda SHH'nin apoptozis ve proliferasyon arasındaki dengeyi sağladığı düşünülmektedir (63). SHH delesyonu oluşturulmuş olan farelerde genital katlantıların oluşmaya başladığı ancak büyümenin devam etmediği ve eksternal genital organların gelişmediği gösterilmiştir (63).

Fibroblast growth faktörler tarafından oluşturulan sinyallerin genital tüberkül gelişimi sırasında epitel ve mezenkim arasındaki etkileşimi sağladığı öne sürülmektedir (64). FGF-8 yokluğunda farelerde üretral platein proksimalden distale gelişimi durmuş, genital tüberkül agenezisine yol açmıştır (4). Genital tüberkül mezenkiminden salınan FGF-10 eksikliğinde farelerde üretral katlantıların füzyonu gerçekleşmemiştir (61,65). FGF-2 ve FGF-8 genleri insanda hipospadias ile ilişkili bulunmuş, ancak FGF-10 genindeki mutasyonlar henüz insanda hipospadiasla ilişkilendirilememiştir (3,45).

Çeşitli BMP sinyal molekülleri distal üretral plate epitelinden ve çevre dokularından salınmakta ve genital tüberkül oluşumunda epitelial-mezenkimal etkileşimi düzenlemektedir (66). Hipospadiaslı hastalarda BMP7 mutasyonları ortaya konulmuştur (3,67). Carmichael ve ark. (67) tarafından bu mutasyonu taşıyan hastaların hipospadias açısından 2 kat riske sahip olduğu ifade edilmiştir. Yine epitelial-mezenkimal etkileşimi sağladığı düşünülen Transforming Growth Faktör beta (TGF beta) geninde ve reseptörlerindeki mutasyonlarında da hipospadias riskini arttırdığını ifade eden çalışmalar mevcuttur (68,69).

WT1, embriyoloji olarak böbreklerin ve gonadların gelişiminde çeşitli görevleri olan bir transkripsiyon düzenleyici gendir (45,70,71). Gonad gelişimi ile hipospadias üzerine dolaylı etkisinin yanısıra, izole hipospadiaslı çocuklarda WT1 mutasyonu gösterilmiştir (70).

Homeobox (HOX) genleri, gelişmekte olan embriyoya ait pozisyonel bilgileri taşımakla görevlidir (45). HOXA13, FGF-8 ve BMP7 gibi morfojenlerin ekspresyonunu düzenlemektedir ve HOXA13 defektif farelerde üretral plate epitelinde bu moleküllerde azalma ortaya konmuştur (4). HOXA13 izole hipospadias için aday bir gendir ve hipospadiaslı hastalarda prepisyumda ve üretral plate dokusunda ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur (70).

Hipospadiasta prepisyum gelişimi de defektiftir. Bunun üretra defektine yol açabilen genetik ve moleküler sinyalizasyon yollarındaki aksaklıkların aksine dokunun damar, sinir ve bağ doku yoğunlukları gibi histolojik özellikleri araştırılmış, hipospadiaslı hastalarda prepisyumda nöral yoğunluğun kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği ve mikro damar yapılarının hasta grubunda daha az olduğu tespit edilmiştir (9,70). Güncel çalışmalar hipospadiasa eşlik eden prepisyum defektinin gelişiminde de başta FGFR2 geni olmak üzere, AR ve ESR genlerinin önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur (8,72).

Etiyolojide çevresel faktörler kadar genetik faktörler de gündeme gelmiştir. Annenin gebelikte sigara kullanımı hipospadias riskini arttırmaktadır (42). Ayrıca materyal diyet, intrauterin büyüme geriliği ve düşük doğum ağırlığı da hipospadias etiyojisi ile

ilişkilendirilmektedir (50,73). Son 30 yılda hipospadias sıklığında bildirilen artışı sentetik kimyasal üretiminde ve kullanımındaki artışa bağlayan çalışmalar da mevcuttur (35,46,47)

Dolayısıyla etiyojide pek çok açığa kavuşturulamamış kısım olsa da, çalışmalar genetik ve çevresel faktörlerin birbiriyle etkileşim oluşturduğunu göstermektedir.

TEDAVİ

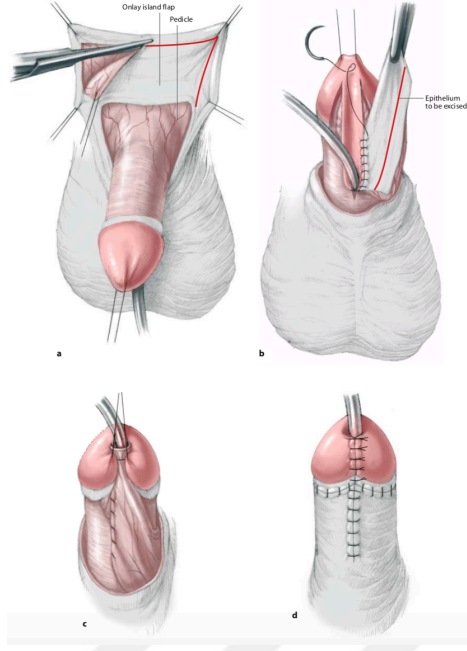
Günümüzde hipospadias tedavisi cerrahi olmakla birlikte, kabul görmüş ve uygulanan tek bir teknik yoktur. Hipospadiasın derecesine göre cerrahi yöntem değişkenlik gösterilmekle birlikte tedavide amaç; düz bir penil shaft ve konik şekilli glans oluşturmak, üretral açıklığı glans ucuna taşımak, meatusta darlık olmaması, normal ereksiyon ve işemeyi sağlamak ve normale yakın bir kozmetik görünüm elde etmektir (15, 74).

Hipospadias onarımı kordi düzeltilmesi ve glanüloplastiyi de içermekle birlikte en önemli komponenti üretroplastidir ve hipospadiasın derecesine göre pek çok çeşidi vardır. Ana hatlarıyla üretroplasti tipleri (15);

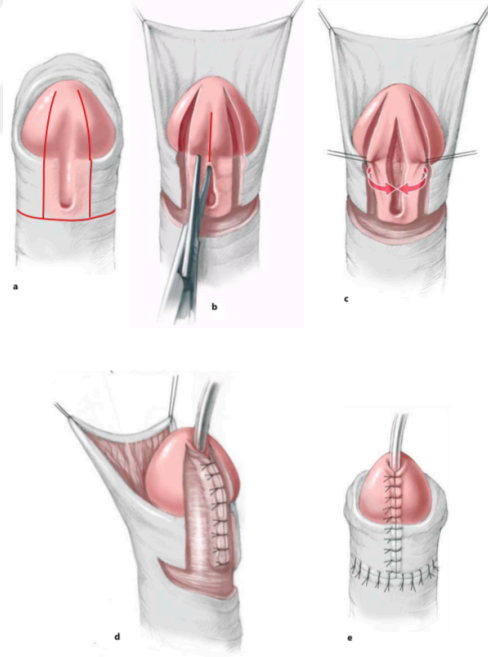
- In situ tüpler veya lokal flep uygulamaları (lateral veya metal tabanlı)
- Pediküllü ada flepleri (tübularize veya onlay) (Şekil 6) (75)
- Serbest greft uygulamaları (inceltirilmiş deri, prepisyum, mesane mukozası, yanak iç mukozası)
- Üretral ilerletme ve uzatma

Distal veya anterior hipospadias tiplerinde sıklıkla üretral uzatmayı hedefleyen bir üretroplasti olan ve Snodgrass (26) tarafından 1994'te tanımlanan "tübularize insize üretroplasti (TIPU) yöntemi kullanılmaktadır (Şekil 7) (75).

Proksimal tiplerde ise iki aşamalı onarım teknikleri, greft ve flep kullanımı gerektiren üretroplastiler önerilmektedir (74).



Şekil 6. Onlay ada flebi yöntemi (75)



Şekil 7. Tübularize insize üretroplasti (TIPU) yöntemi (75)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25/02/2019 tarihli 04/03 no'lu kararı ile onaylanmış olup (Ek 1) 2019/67 kodlu proje olarak Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir ve clinicaltrials.gov “protocol registration and results system” kayıtlarında “NCT03838458” ID numarasıyla kayıtlıdır.

Genetik olarak TGF beta, ESR1, AR, FGFR2, HOXA13 gen ekspresyonları, immunohistokimyasal olarak da ganglion varlığı ve periferik damar ve sinir yoğunlukları çalışılmıştır.

HASTA SEÇİM KRİTERLERİ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi kliniğinde hipospadias nedeniyle ameliyatı planlanan 0-18 yaş arası çocuklar hasta grubunu, sünnet operasyonu yapılan 0-18 yaş arası çocuklar kontrol grubunu oluşturdu. Çalışma, gruplar arasında yüksek düzeyde etki büyüklüğü öngörülerek, %5 yanılma payı ve %80 güç ile her bir gruptan 26'şar olmak üzere toplam 52 olgunun çalışmaya alınması gerektiği hesaplandı. Temmuz 2019 - ocak 2020 tarihleri arasında her iki gruptan 26'şar kişi çalışmaya dahil edildi. Olgular 18 yaşından küçük olduğu için yasal vasilerinden yazılı bilgilendirilmiş onam alındı (Ek 2). Kontrol grubunda genitoüriner anomalisi (inmemiş testis, cinsiyet gelişim bozukluğu) olan hastalar,

hasta grubunda hipospadias dışında genital anomalisi olan hastalar çalışma dışında bırakıldı. Mart 2019'dan itibaren her iki grup da sayı olarak tamamlanana kadar kriterlere uyan ve çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastalar operasyon sırasına göre çalışmaya dahil edildi, operasyonlar klinikteki 5 farklı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

ÖRNEKLERİN ALINMASI

Doku örnekleri, sünnet ve hipospadias ameliyatları sırasında prepsiyumun mukozal yüzeyinden her hasta için 1x1 mm boyutunda ikişer kare çıkarılarak elde edildi. Çıkarılan iki parça dokudan Tıbbi Genetik anabilim dalında çalışılacak örnek eppendorf tüp içindeki RNA free solüsyona (İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific), Tıbbi Patoloji Anabilim dalında çalışılacak örnek %4 formalin solüsyonuna (Facepath, TR) konuldu ve 1 saat içinde ilgili bölümlere ulaştırıldı.

GENETİK İNCELEME YÖNTEMİ

Dokudan RNA izolasyonu

Hasta ve kontrol grubu olgularından alınan doku örnekleri RNA stabilizasyonu sağlamak için eppendorf tüpte bulunan 1ml RNA later Solüsyonu [İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific] içerisine alındı. Solüsyon içerisindeki her bir doku Flow Laminar Air kabin içerisinde 100mg'dan küçük parçalara ayrıldı. RNA izolasyonu için PureLink® RNA Mini Kit [İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific] kullanıldı. 2 ml'lik Eppendorf tüp içerisine doku parçaları alındı ve üzerine 2-merkaptoetanol ile hazırlanmış Lysis buffer'dan 600µl eklendi (Lizis solusyonu; 1 ml Lysis buffer içerisine 10µl 2-merkaptoetanol ile hazırlanmalıdır). Doku iyice parçalanana kadar oda sıcaklığında vorteks yapıldı. Ardından oda sıcaklığında 12.000g devirde 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında eppendorf tüp içerisinde üstte toplanan süpernatant temiz bir RNase içermeyen eppendorf tüpe aktarıldı. Tüp içerisindeki süpernatant, insülin enjektörü yardımıyla 5-10 kez al-ver yapıldı ve homojen bir hale getirildi. Homojen doku lizati üzerine %70'lik ethanolden 600 µl eklendi. Vorteks yardımıyla hafifçe karıştırıldı. 700 µl'lik spin kolon üzerine örnek hacminin yarısı ilave edildi. Oda sıcaklığında 30sn ye 12.000g devirde santrifüj edildi. Örnek toplama kolonu değiştirildi ve kalan örnek hacmi kolona ilave edilerek tekrar santrifüj edildi. Daha sonra örnek toplama kolonu yenilenerek bu sefer kolon üzerine filtreye dokunmadan 700 µl Wash Buffer 1 eklendi. Oda sıcaklığında 12.000g devirde 30 sn santrifüj yapıldı ve yine alttaki toplama kolonu değiştirildi. Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer 2 ilave edildi, yine aynı devirde santrifüj yapıldı ve alt kolon değiştirildi. Wash Buffer 2 aşaması birkez daha

tekrarlandı ve yine santrifüj yapıldı. Örnek toplama kolonu değiştirildi ve üzerine buffer eklenmeden 12.000g devirde 1 dakika santrifüj edildi. Kolon ortasına hiç değmeden filtenin tam ortasına gelecek şekilde 40 µl RNase içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 12.000g devirde 2 dakika santrifüj yapıldı. İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi (230/260 dalga boyundaki spektrumu) NanoDrop [Nanodrop 2000C UV-Vis Spectrophotometer, ThermoScientific, USA] cihazında ölçüldü ve hastalara verilen spesifik kodlarla birlikte -80 °C'de saklandı.

cDNA (Komplemental DNA) Hazırlanması

İzole edilen RNA örneklerinin komplementer DNA'ya çevrilmesi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen, Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA) kullanıldı. Total RNA'nın 10ul'si 250ng olacak şekilde her bir RNA örneği dilüe edildi. Reaksiyon hazırlama aşamasında dilüe örnek hacmi maksimum 10 µl olacak şekilde hesaplama yapıldı. Ardından komplementer DNA reaksiyonunu hazırlamak için gerekli olan malzemeler buz üzerine çıkarıldı ve polimerase chain reaction (PCR) hazırlandı. Reaksiyon hacmi maksimum 20 µl olmalıdır ve her bir reaksiyon için gerekli olan malzemeler Tablo 1'de gösterilmiştir. Kırılgan bir yapıya sahip RNA molekülünün daha kararlı çift zincirli komplementer DNA'ya çevrilmesi için PCR cihazı (SensoQuest, Labcycler Gradient, Germany) kullanıldı. Kullanılan PCR protokolü ise Tablo 2'de verilmiştir. PCR sonucunda elde edilen cDNA'lar gen ekspresyon çalışması yapılana kadar -20°C veya -80°C saklanmaktadır.

Tablo 1. Her bir reaksiyon için gerekli olan malzemeler (Hacim 20 µl)

2 µl	10X RT Buffer
0.8 µl	25X dnTPMix
2 µl	10X RT RandomPrimerler
1 µl	MultiScribeReverseTran scriptase
4.2 µl	Nuclease-free H ₂ O
10 µl	Çalışılacak RNA'lar eklenir

Tablo 2. cDNA için PCR protokolü

PCR	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Gen Ekspresyon Çalışması

Gen ekspresyon çalışması TaqMAN Gene expression assay kiti kullanılarak Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR'da yapıldı. Çalışma esnasında TGFB1, ESR1, AR, FGFR2, HOXA13 ve Housekeeping gen olarak actin beta (ACTB) genlerinin gen ekspresyon durumu $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi kullanılarak incelendi. Housekeeping gen; bir organizmanın tüm dokularında temel hücresel işlevlerin yerine getirilmesi için sağlıklı hücresel koşullarda sürekli ve belirli düzeylerde ifade olması gereken özel genlerdir. Her bir olgu için gen ekspresyon çalışması 3 tekrarlı olarak çalışılmış ve ortalaması alınarak C_T değerleri bulunmuştur. Her bir çalışma esnasında ilgili gen ve hasta için mutlaka ACTB gen çalışılmış ve assay kontaminasyonunun olmadığını incelemek adına NTC (Non Template kontrol) reaksiyonu hazırlanmıştır. TaqMAN Gene expression assay kiti kullanılarak hazırlanan Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar ve miktarları Tablo 3'de, Real-Time PCR koşulları ise Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 3. Reaksiyon için gerekli malzemeler ve miktarları

RT PCR komponentleri	Reaksiyon için hacim
TaqMan Fast Advanced Master Mix	10 µl
TaqMan Assay	1 µl
Nuclease Free Water	7 µl
Total hacim	18 µl

Tablo 4. Real Time PCR protokolü

	RT- PCR (40 siklus)			
RT-PCR	Hold 50°C	Hold 95°C	Denature 95°C	Anneal- Extend 60°C
Süre	2 dk	2 dk	1 sn	20 sn

Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Real Time PCR, çalışma prensibi olarak Polimeraz zincir reaksiyonu sırasında eş zamanlı olarak veri alınmasını sağlamaktadır. PCR döngüsünde 60°C'de olan Anneal-Extend basamağında eş zamanlı olarak okuma almakta ve elde edilen veriler ile C_T değerleri hesaplanmaktadır. Real Time PCR esnasında kullanılan StepOne Software2.3 sayesinde çalışma esnasında elde edilen C_T değerlerinden her bir olgu ve her bir assay'e ait $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri elde edilmektedir.

PCR veri analizinin karşılaştırmalı veya $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yönteminde, iki farklı deneysel RNA örneğinden elde edilen C_T değerleri doğrudan bir housekeeping genine normalize edilir ve daha sonra karşılaştırılır. Bu yöntem ilgili genin ve temizlik genlerinin amplifikasyon verimliliğinin yüzde 100'e yakın olduğunu varsayar. İlk olarak ilgilenilen genin C_t değerleri (ΔC_T) ve housekeeping geni her deney numunesi için hesaplanır. Daha sonra deney ve kontrol örnekleri arasındaki $\Delta\Delta C_T$ değerleri arasındaki fark hesaplanır. İki numune arasında ilgilenilen genin ekspresyonundaki kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ye eşittir.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME YÖNTEMİ

İmmunohistokimyasal Boyama İşlemi

Mukozal vasküler yoğunluğu belirlemek için CD34, periferik sinir yoğunluğunu belirlemek için PGP 9.5, ganglion için sinaptofizin antikorları kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için formalin tespitli, parafine gömülü dokulardan hazırlanan 4 mikron kalınlıktaki kesitler kullanıldı. Doku kesitleri, elektrostatik yüklü lamlara (Tıpkimsan, TR) alındı ve 70°C'de en az 1 saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm immunohistokimyasal boyama süreci tam otomatik immunhistokimya cihazında (Ventana BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) gerçekleştirildi. İşlem için cihaza uygun, biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB)

kromojeni içeren hazır kit (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanıldı. CD34 (QBEnd 110, ThermoFisher Scientific, UK) antikor inkübasyonu 56 dakika, PGP 9.5 (BSB-46, Bio SB, US) antikor inhibisyonu 72 dakika ve sinaptofizin (SP11, ThermoFisher Scientific, UK) antikor inkübasyonu 60 dakika boyunca uygulandı. Arka plan boyama için Harris Hematoksilen (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) 16 dakika uygulandı, mavileştirme solüsyonu Bluing Reagent ((Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) 4 dakika uygulandı. Lamlar deterjanlı suyla yıkandı ve absölü alkolde 2 kez çalkalandı, sonrasında ksilol bazlı kapatıcıyla kapatılarak işlem sonlandırıldı.

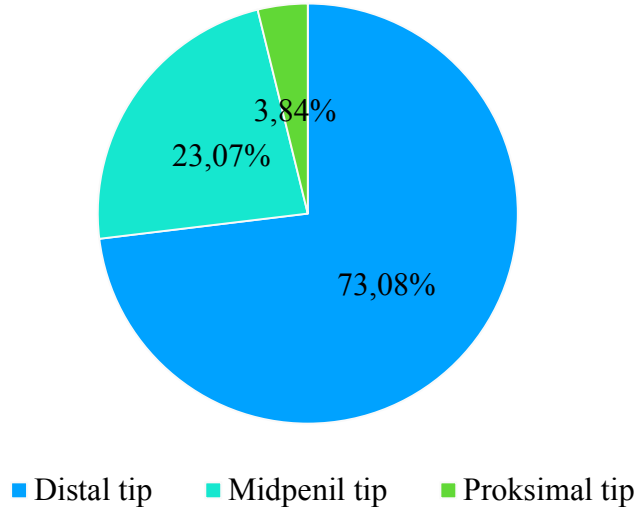
Dermal damar yoğunlukları immunohistokimyasal olarak CD34 antikoruna ile, dermal periferik sinir yoğunlukları PGP9.5 antikoruna ile değerlendirilmiş ve kantitatif olarak tüm örneklerdeki damar ve sinir sayıları 200x büyütme altında not edilmiştir.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra verilerin dağılımı Shapiro-Wilk Testi ile değerlendirilmiştir. Niceliksel verilerin normal dağılım göstermeyen iki grubun karşılaştırmasında Mann-Whitney U Testi, niteliksel verilerin analizinde ise Chi-Square testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ düzeylerinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya Mayıs 2019 - Ocak 2020 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi kliniğinde hipospadias nedeniyle opere edilen 26 hasta, sünnet istemiyle başvuran ve sünnet operasyonu yapılan 26 sağlıklı çocuk kontrol grubu olarak alındı. Kontrol grubunda yaş ortalaması $70, 61 \pm 35,78$ ay, hipospadias grubunun yaş ortalaması $66,73 \pm 39,94$ aydı (Tablo 5). Hipospadias grubunda 19 hastada (%73,07) distal, 6 hastada (%23,07) midpenil, 1 hastada (%3,84) proksimal tipte hipospadias mevcuttu (Şekil 8).



Şekil 8. Hipospadias tipleri dağılımı

Tablo 5. Hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri

	Ortalama yaş±SD (ay)	Minimum yaş (ay)	Maksimum yaş (ay)
Kontrol grubu (n: 26)	70 ,61±35,78	6	120
Hipospadias grubu (n: 26)	66,73±39,94	16	145

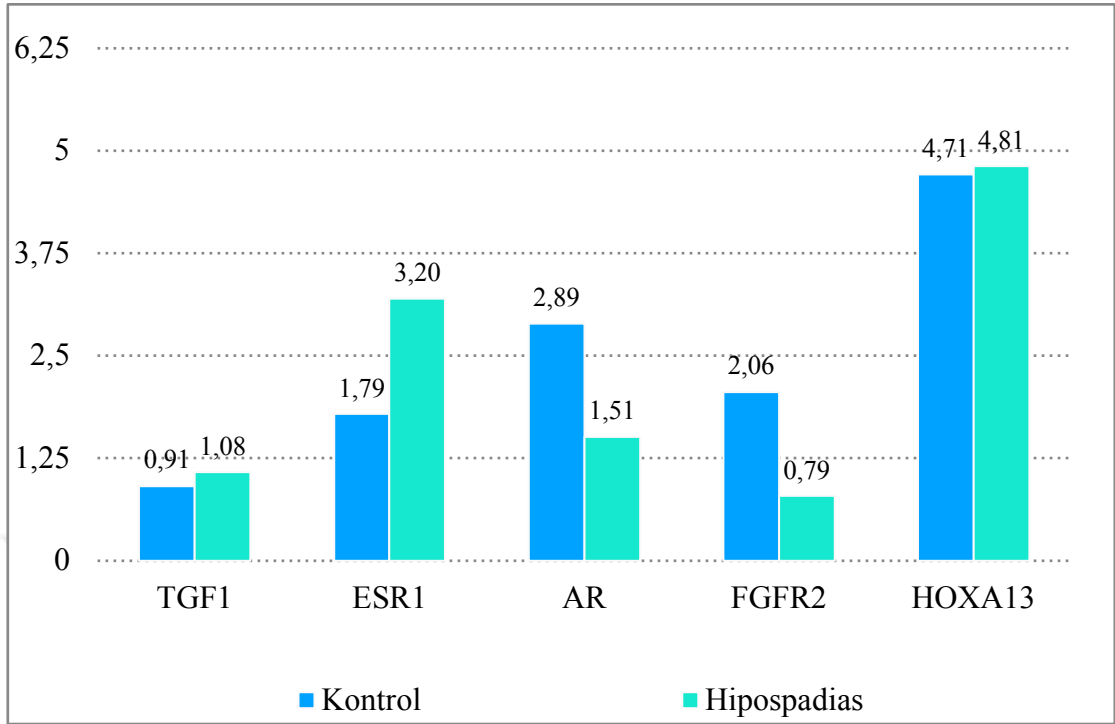
Prepisyum dokularından yapılan genetik analizlerde $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak PCR ile hasta ve kontrol gruplarında TGFB1, ESR1, AR, FGFR2 ve HOXA13 gen ekspresyonları bakılarak Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 6). TGFB1 gen ekspresyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,552$; $p>0,05$). ESR1 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre hasta grubunda saptanan yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,013$; $p<0,05$). AR gen ekspresyonu hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,027$; $p<0,05$). FGFR2 gen ekspresyonu da hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,003$; $p<0,01$). Hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunan HOXA13 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p=0,464$; $p>0,05$) (Şekil 9).

Tablo 6. Grupların gen ekspresyonu sonuçları

	Gruplar	Sayı (n)	Ortalama +SD	Min - maks (medyan)	p değeri
TGF1	Kontrol	26	0,91±0,54	0,41-2,63 (0,74)	0,552
	Hipospadias	26	1,08±0,88	0,19-4,5 (0,85)	
ESR1	Kontrol	26	1,79±1,67	0,42-7,81 (1,28)	0,013* (*p<0,05)
	Hipospadias	26	3,2±3,08	0,12-13,86 (2,16)	
AR	Kontrol	26	2,89±3,13	0,91-16,32 (1,72)	0,027* (*p<0,05)
	Hipospadias	26	1,51±1,02	0,08-3,66 (1,28)	
FGFR2	Kontrol	26	2,06±2,47	0,44-12,77 (1,34)	0,003** (**p<0,001)
	Hipospadias	26	0,79±0,73	0,03-2,07 (0,57)	
HOXA13	Kontrol	26	4,71±5,94	0,16-28,23 (2,92)	0,464
	Hipospadias	26	4,81±4,83	0,43-21,26 (3,48)	

*; Mann-Whitney U Testi, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı

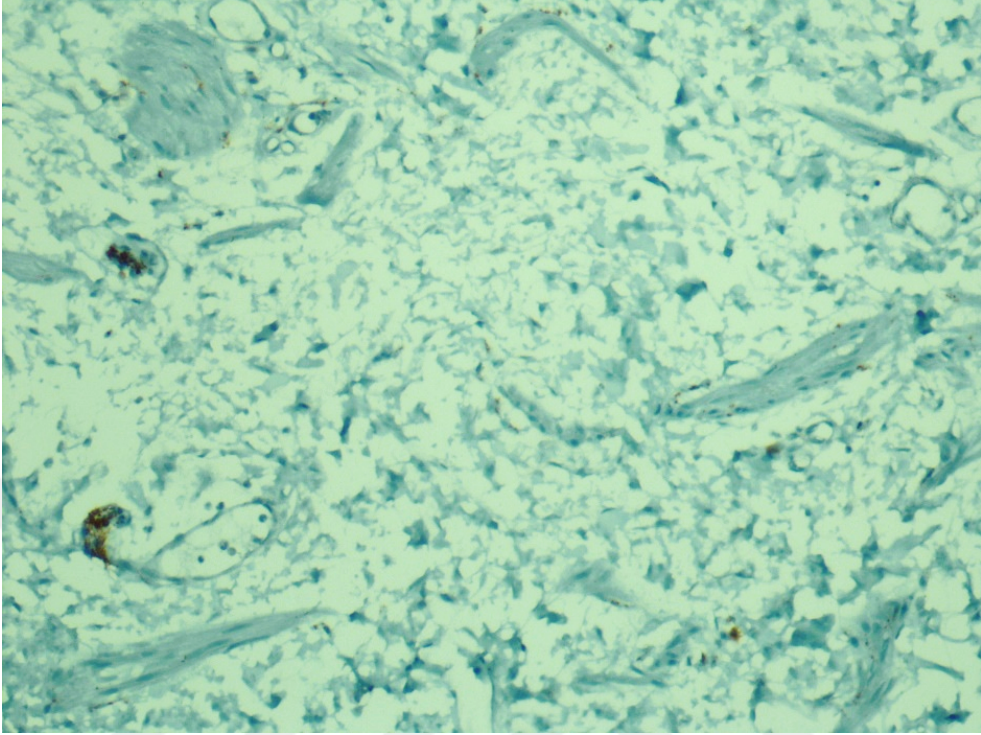
**; Mann-Whitney U Testi, p<0,001 istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı



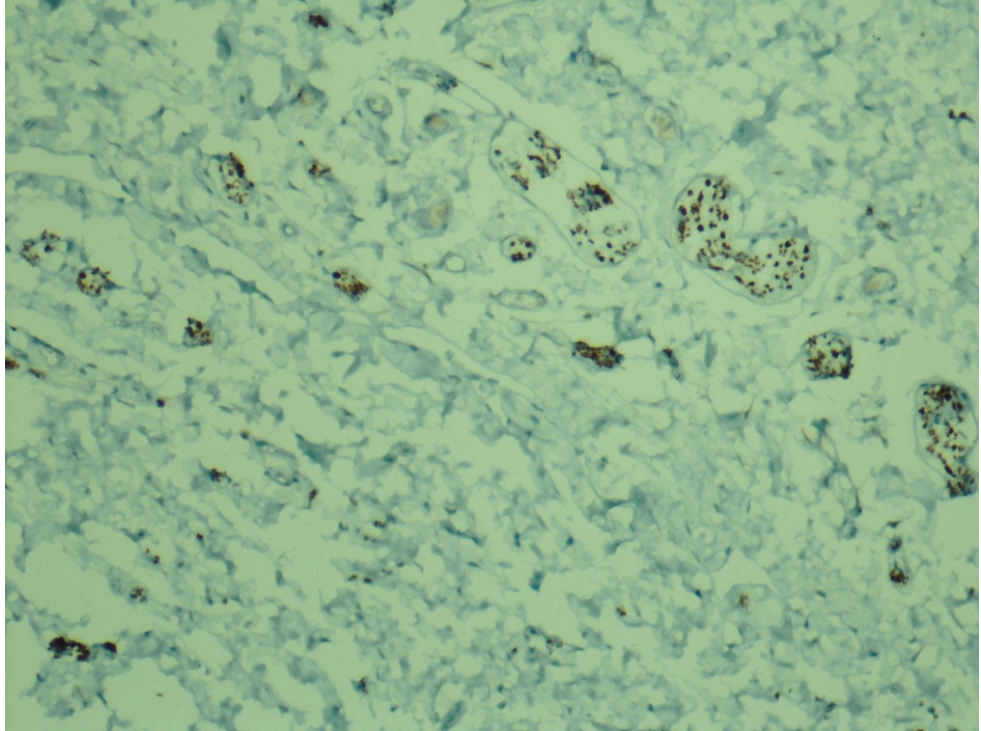
Şekil 9. Kontrol ve hipospadias gruplarının gen ekspresyon ortalamaları

Doku örneklerinin immunohistokimyasal incelemesinde ganglion varlığının belirlenmesi için sinaptofizin, periferik sinir yoğunluğunun ölçümü için PGP 9.5 (Şekil 10a ve b), mukoza vasküler yoğunluğun ölçümü içinse CD 34 antikoru kullanıldı (Şekil 11a ve b). Kontrol grubunda 8 örnekte (%15,4) ganglion varlığı saptanırken hipospadias grubunda 5 örnekte (%9,6) saptandı ($p=0,337$). Periferik sinir yoğunluğu ortalamalarında hipospadias ve kontrol grubunda istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,798$). Periferik damar yoğunluğu hipospadias grubunda kontrol grubuna göre artmış olarak bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,085$) (Tablo 7).

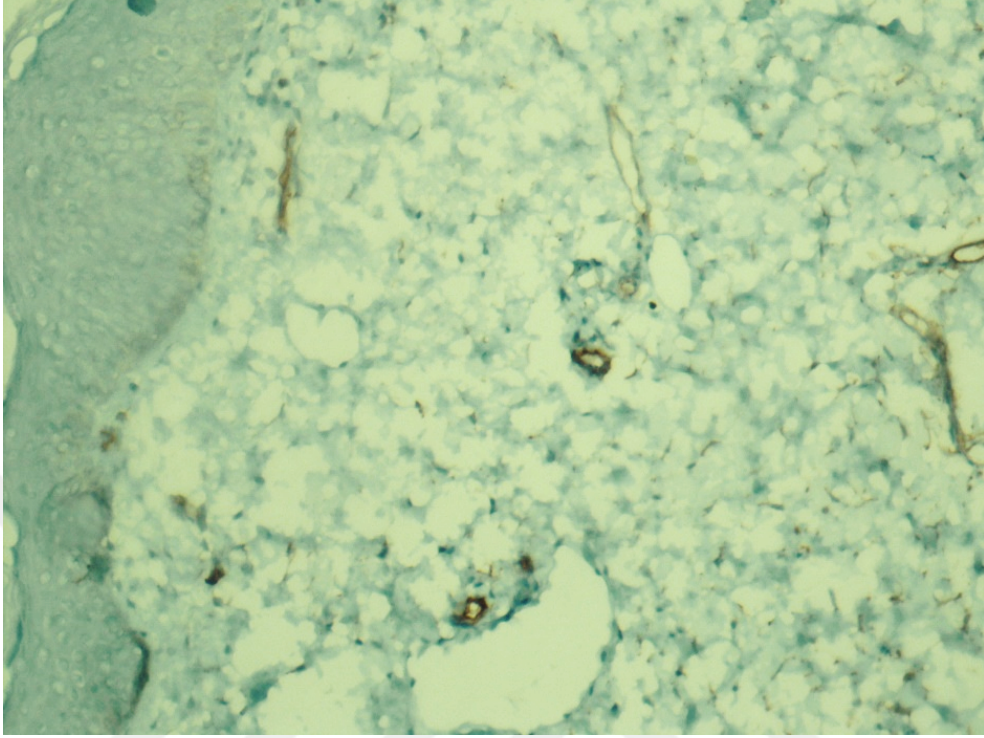
Şekil 10. a. PGP9.5 antikoruna ile iki adet periferik sinirde reaksiyon, immunohistokimya, x200 büyütme



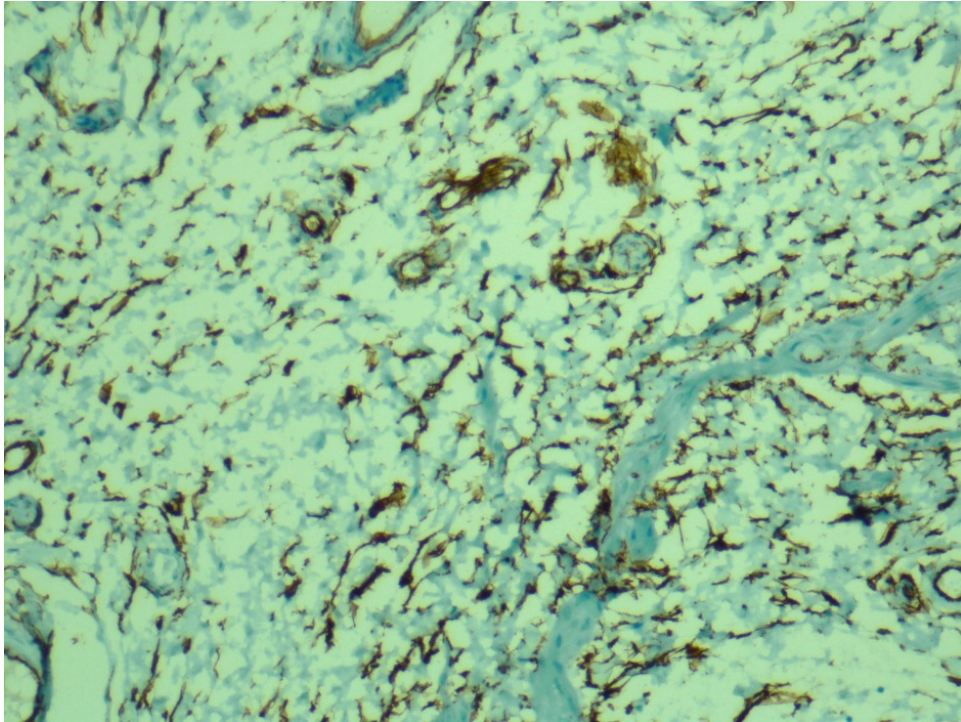
b. PGP9.5 antikoruna ile çok sayıda periferik sinirde reaksiyon, immunohistokimya, x200 büyütme



Şekil 11. a. CD34 antikorü ile seyrek damar duvarlarında reaksiyon, immunohistokimya, x200 büyütme



b. CD34 antikorü çok sayıda damar duvarlarında reaksiyon, immunohistokimya, x200 büyütme



Tablo 7. Dokuların immunohistokimyasal inceleme sonuçları

	Gruplar	Sayı (n)	Ortalama +SD*	Min - maks (medyan)	p değeri
Periferik sinir (PGP 9.5)	Kontrol	26	42,92±17,18	22-97 (39)	0,798
	Hipospadias	26	42,88±18,69	20-93 (37)	
Periferik damar (CD 34)	Kontrol	26	113±35,58	42-179 (109)	0,085
	Hipospadias	26	127,85±24,2	78-169 (131)	
Ganglion (+)	Kontrol	26	8 (%15,4)	-	0,337
	Hipospadias	26	5(%9,6)	-	

* SD; standart deviation (standart sapma)

TARTIŞMA

Hipospadias etiyojisini ortaya koymaya yönelik olarak literatürde pek çok çalışma mevcuttur. Çevresel ve genetik faktörlerin üzerinde sıklıkla durulmuştur ve etiyojide multifaktöriyel sebepler olduğu düşünülmektedir. Embriyolojik dönemde cinsiyet bağımsız ve cinsiyet bağımlı fazlarda oluşacak herhangi bir aksaklık ya da sorunun hipospadiasla sonuçlanabileceği için bu süreçlerde yer alan moleküller ve genler araştırılmış ve etiyojiji ortaya çıkarmaya yardımcı olabilecek çeşitli sonuçlar elde edilmiştir.

Penil cilt ve prepisyum ektodermal kaynaklı iken üretranın mezoderm kökenli olduğu bilinmektedir (76). Ancak üretra gelişiminde güncel kabul edilen “endodermal büyüme teorisine” göre; glandüler üretra da dahil olmak üzere tüm üretra, üretral plate’in dorsalde genital tüberküle doğru büyümesi, üretral katlantıların ventrale doğru büyümesi ve füzyonu ile meydana gelmektedir (77). Ürogenital sistemin normal embriyogenezi epitelyal-mezenkimal etkileşimlere bağlıdır ve bu süreçte sinyal yollarında olacak aksama ve anormal sinyaller hipospadiasla sonuçlanabilmektedir (78). Normal penil gelişim için östrojen ve androjen dengesinin sağlanmış olması da oldukça önemlidir ve günümüzde östrojen maruziyetinin hipospadiasa neden olabileceği düşünülmektedir (57).

Ma ve ark.'nın (79) genital tüberkül üzerine hormonal etkilerin araştırıldığı çalışmasında, organ kültüründe genital tüberkül büyüme hızının dihidrotestosteron (DHT) ile arttığı ve prepisyumun oluştuğu, östrojen uygulanan örneklerde ise büyümenin ve farklılaşmanın baskılandığı gösterilmiştir. Dış genital organların gelişiminde AR'nin en

önemli hedefleri FGFR2-IIIb ve FGF10 olup hayvanlar üzerinde bu sinyal moleküllerinin kaybının ağır hipospadiasla sonuçlandığı gösterilmiştir (64). Tüm bu sinyal mekanizmasında SHH kontrolünde FGF'lerin önemli etkileri olduğu gösterilmiştir (64, 65, 76, 80). Gredler ve ark. (80), FGFR2'nin endodermal ve ektodermal türleri olduğunu, endodermal FGFR2 yokluğunda üretral epitelde gelişimin durduğunu ve hafif dereceli hipospadiasla sebep olduğunu, ektodermal FGFR2 kaybında ise ventral prepisyum hipoplazisi ve ağır dereceli hipospadias geliştiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmadan yola çıkılarak endodermal FGFR2'nin üretral epitel matürasyonunda, ektodermal FGFR2'nin prepisyum oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (80). FGFR2'nin kutanöz yaraların iyileşmesinde reepitelizasyonu ve mikrovaskülarizasyonu artırarak etki gösterdiği bildirilmiştir (81). Bu durum da hipospadiasta prepisyum kapanma defekti görülmesinde FGFR2 etkisini akla getirmektedir. Petiot ve ark.'nın (64) çalışmasında antiandrojen bir ajan olan flutamide uygulanan farelerde FGFR2'nin down regüle edildiği, yani etki düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. Bu da FGFR2 ekspresyonunun androjen kontrollü olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda hipospadias grubunda hem FGFR2 hem de AR ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu iki gen arasındaki paralellik, AR'nin FGFR2 ekspresyonunu etkilediğini doğrular niteliktedir. FGFR2'nin azalması da sinyal yolağında bir defekte bağlı olarak iletim sorununu ya da iletime yetersizliği işaret etmektedir.

Pichler ve ark. (8), hipospadiaslı hastalardan alınan prepisyum örneklerinde AR mRNA seviyelerini artmış olarak saptamış ve reseptördeki up regülasyonu, azalmış AR DNA bağlanma kapasitesi ve AR sinyal defektine kompensatuar olarak değerlendirmişlerdir. Vottero ve ark. (56) da hipospadiaslı hastaların prepisyumlarında AR gen metilasyonunda artış ve buna bağlı olarak AR ekspresyonunda azalma saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise hipospadiaslı hastaların üretral mukoza örneklerinde AR mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (82). Bizim çalışmamızda AR ekspresyon düzeyleri hipospadias grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu durumda androjen duyarlılığında azalma sonucu reseptörlerin down regüle olması düşünülebilir. Ayrıca AR geninde mutasyon sonucu down regülasyon gelişmiş olması ya da östrojen lehine bozulan dengenin down regülasyona sebep olabileceği akla gelmektedir. Bununla birlikte, AR down regülasyonu, FGFR2 ekspresyonunda da azalma ve sonuçta hipospadias gelişiminde hazırlayıcı faktör olarak düşünülebilir. Hipospadias grubumuzda ESR1 ekspresyonundaki artış da bu durumu destekleyicidir.

İnsanda ESR1 ve ER2 olmak üzere 2 çeşit östrojen reseptörü bulunmaktadır ve bu reseptörler östrojen varlığında nükleustan östrojen yanıtı genlerin transkripsiyonunu

uyarmakla görevlidir (45). Potent bir sentetik östrojen türü olan dietilstilbesteroles maruz kalan annelerin bebeklerinde hipospadias riskinin arttığı ortaya konulmuştur (58). Ayrıca Kim ve ark. (83) gebe farelerde intrauterin sentetik östrojen maruziyeti oluşturulan dişi yavrularda etkilenme saptamazken erkek yavrularda hipospadias gelişimi, uretranın daha kısa olması ve uretral plate'i çevreleyen dokuların daha ince olması gibi sorunlar geliştiğini ortaya koymuştur. Hipospadiaslı hastalardan elde edilen prepisyum dokusunda kontrol grubuna göre östrojen yanıtı genlerin ekspresyonunda artış saptanmıştır (6). Başka bir çalışmada da yine östrojen yanıtı bir protein olan ve hücre adhezyon moleküllerini azalttığı bilinen zinc finger box 1 (ZEB1) ekspresyonunu hipospadiaslı hastaların prepisyumlarında artmış olduğu, ZEB1'in hipospadiasın ağırlığı ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (60). Bu durum da östrojen maruziyetinin hipospadias üzerindeki etkisine işaret etmektedir. Watanabe ve ark. (59) ER geninin bir haplotipinde hipospadiasla güçlü bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Ancak ESR1'in bazı varyantlarının hipospadias riskini azalttığı, bazı varyantlarının riski arttırdığı öne sürülmektedir (84,85). Ma ve ark. (79) genital tüberkül üzerindeki östrojen etkisinin konsantrasyona bağımlı olduğunu göstermiş ve organ kültürlerinde yüksek östrojen konsantrasyonlarında genital tüberkül gelişimi, epitelyal matürasyon, uretral kanalizasyon ve prepisyum gelişiminin baskılandığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ESR1 ekspresyonu hipospadias grubunda anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Bu durumun da çevresel östrojen maruziyetindeki artışın reseptörlerin up regülasyonuna sebep olmuş olabileceği ya da östrojen - androjen dengesinin östrojen lehine bozulmasının sonucu olduğu düşünülmektedir.

Ektoderm ve mezoderm arası etkileşimin bozulmasının orta hat defektlerine sebep olabileceği teorisiyle yapılan bir çalışmada, ektoderm ve mezoderm arası etkileşimde rolü olduğu düşünülen TGF beta 3 eksikliği oluşturulan farelerde yarı damak ve akciğer gelişim anomalileri meydana gelmiştir (7). Zhou ve ark. (86) sıçanlarda gerçekleştirilen in vitro penis kültüründe ventral yüzde yerleşim gösteren uretral açıklığın, TGF beta 1 uygulanan penis ucuna doğru ilerleme gösterdiğini saptamıştır. Çinli çocuklar üzerinde yapılan bir vaka kontrol çalışmasında TGF beta reseptör 2'nin rs6785358 polimorfizminin hipospadias açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır ancak reseptör düzeyleriyle ilgili bir veri içermemektedir (69). Çalışmamızda prepisyumdaki TGF beta düzeyleri kontrol grubunda hipospadias grubuna göre daha düşük olduğu saptanmış olmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak bu konuda literatürde yeterli sayıda insan çalışması olmaması, sonuçların hayvan deneyleriyle paralellik göstermeyebileceğini düşündürmektedir.

Mezenkimden eksprese edilen HOXA13 geni, eksternal genital organların gelişiminde hem epitel - mezenkim arasındaki etkileşimde görev alarak, hem üretranın pozisyonun hakkında bilgiyi ileterek, hem de programlı hücre ölümü sırasında önemli roller oynamaktadır (3-5, 67). Üretral plate'in öncüsü olan genital tüberkül gelişimi sırasında, penil üretranın gelişimi ve kapanması için programlı hücre ölümü kritik rol oynamaktadır (63). Bu süreçte HOXA13 mutant farelerde azalmış programlı hücre ölümü ve genital tüberkülde mitotik aktivitede azalma gösterilmiştir (4). Ayrıca üretral plate oluşumu sırasında epitel ve mezenkim etkileşiminde sinyal molekülü olarak görev alan BMP7'nin düzenlenmesinde HOXA13'ün etkili olduğu bilinmektedir (4). Wang ve ark.'nın (5) izole hipospadiaslı hastaların prepisyum dokularında HOXA13 gen ekspresyonunu artmış olarak saptaması da etiyolojide etkisini düşündürmektedir. Ancak hipospadiaslı hastalarda HOXA13 geninde etiyolojiyle ilişkilendirilebilecek genetik polimorfizm saptanamamıştır (87). Çalışmamızda HOXA13 ekspresyonunun hipospadias grubunda kontrol grubuna göre minimal bir artış gösterdiği saptanmış ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımız hipospadias etiyolojisinde HOXA13 etkisini reddeden Utsch ve ark.'nın (87) çalışması ile paralellik göstermektedir.

Üretra gelişiminde etkili sinyal yolları kadar prepisyumda da anormallikler saptanabileceği hipotezinden yola çıkılarak prepisyumun yapısal özellikleri incelenmiştir. Nazir ve ark (10). hipospadiaslı hastaların prepisyumlarında periferik sinir yoğunluklarını immunohistokimyasal olarak değerlendirmiş ve kontrol grubuna göre sinir yoğunluğunu azalmış olarak saptamışlardır. Denervasyon ve hipoinnervasyonun inflamatuvar yanıtı azaltarak kan akımını ve doku iyileşmesini azalttığı düşünülmektedir (88). Ayrıca post operatif dönemde dokunun kontrakte olabilmesinin de kanamayı azaltmada ve iyileşmeyi hızlandırmada olumlu etkisinde sinir yoğunluğunun yeterli olması gerekliliğine dikkat çekilmektedir (9). Hipospadias grubumuzda ganglion varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Periferik sinir yoğunluğuna bakıldığında hipospadias grubunda kontrol grubuna göre az olduğu görülmektedir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak periferik sinir yoğunluğunun sadece miktar olarak bakılıp dağılım paterninin değerlendirilmemiş olması ve hasta sayısının kısıtlı olmasının bu sonuca etki ettiği görüşündeyiz.

Hipospadiaslı hastaların prepisyum dokularında farklı yaş gruplarına morfolojik özellikleri araştıran bir çalışmada, 3 yaşından küçük hastalarda vaskülarizasyonun yeterli, fibrozisin de minimal seviyede olduğu ortaya konulmuş olup damar, sinir ve kollajen yoğunluğunun da yaşla beraber artış gösterdiği belirtilmiştir (9). Savaş ve ark. (89)

hipospadiaslı hastalarda kontrol grubuna göre prepisyumda mikrodamar yoğunluğunu azalmış olarak saptamış ve hipospadias ağırlığı ile mikrodamar yoğunluğu arasında negatif korelasyon bildirmişlerdir. Oladipupo ve ark. (81) FGFR2'nin neovaskularizasyonu uyaran sinyal yolağında önemli etkileri olduğunu saptamıştır. Çalışmamızda periferik damar yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı olmaksızın hipospadias grubunda artmış olarak bulunmuştur. Bu durum, hipospadias grubunda FGFR2 ekspresyonun çalışmamızda anlamlı azalmış bulunması ile ilişkilendirebileceği gibi, hipospadias grubunun büyük çoğunluğunun (%73,08) distal yani hafif tipte hipospadiastan oluşmasıyla açıklanabilir.



SONUÇLAR

Bu çalışmanın amacı, hipospadias etiyolojisinde rol oynadığı düşünülen sentetik kaynaklı östrojenler başta olmak üzere, diğer olası çevresel faktörlerin hipospadias gelişimindeki genetik ve moleküler etkilerini açıklamaya çalışmaktır. Çalışmada hipospadias etiyolojisine yönelik, prepisyum dokusunda FGFR2, AR, ESR1, TGF beta gen ekspresyonlarındaki değişimi saptamayı, ganglion varlığını, periferik damar ve sinir yoğunluğunu belirlemeyi amaçladık.

1. 26 hipospadias ve 26 kontrol grubundan elde edilen doku örneklerinin değerlendirilmesinde FGFR2 ve AR ekspresyon düzeyleri azalmış olarak bulunurken, ESR1 artmış saptandı, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.
2. Prepisyumda ganglion varlığı, periferik damar ve sinir yoğunlukları açısından anlamlı fark saptanmadı.

Önceden belirlenmiş kısıtlı hasta sayısı ile elde edilen bu sonuçlara dayanarak hipospadias gelişiminde AR ve ESR1 gibi cinsiyet hormon reseptörlerinin ve epitelial – mezenkimal etkileşimde önemli rolü bulunan FGFR2 ‘nin genlerinin ve bu genlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin etiyolojiyi anlamaya yönelik ipuçlarını içerdiği saptanmıştır. Moleküler seviyede mekanizmaların anlaşılabilmesi ve etyolojide rol oynadığı düşünülen faktörlerin etkilerinin nasıl olduğu daha geniş popülasyonlu ve elde edilen sonuçların yol

göstericiliğinde daha ayrıntılı çalışmaların planlanmasıyla hipospadias etijolojisine ışık tutma konusunda adım atıldığı düşüncesindeyiz.



ÖZET

Hipospadias, üretral açıklığın penisin ventralinde, normalden proksimalde yerleşmesi, ventralde prepisyum kapanma defekti ve çeşitli derecelerde penil eğrilikle karakterize bir anomalidir. Etiyolojiye yönelik tartışmalar olmasına rağmen henüz net bir sonuç bildirilmemiştir. Dietilstilbestrol gibi sentetik östrojenler dahil, hormonal aktivasyon gösterebilen kimyasallara maruziyetin neden olabileceği düşünülmektedir.

Hipospadias etiyojisini araştırmak amacıyla Trakya Üniversitesi Çocuk Cerrahisi kliniğinde ameliyat olan 26 hipospadias ve 26 sünnet hastasından elde edilen prepisyum örneklerinde TGFB, ESR1, AR, FGFR2 ve HOXA13 gen ekspresyonları, periferik damar ve sinir yoğunluklarıyla ganglion varlığı araştırıldı.

Hipospadias grubunda ESR1 ekspresyonu artmış ($p=0,013$), AR ve FGFR2 ekspresyonları azalmış olarak bulundu (Sırasıyla $p=0,027$ ve $p=0,003$). TGFB ve HOXA13 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Doku örneklerinin immunohitokimyasal incelemesinde ganglion varlığı, periferik damar ve sinir yoğunlukları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Hipospadias grubunda artmış ESR1 düzeyleri, hipospadias oluşumunda östrojen maruziyetini ortaya koyarken, AR ekspresyonundaki azalma östrojen artışı ve androjen azlığı sonucunda eksternal genital organların gelişiminin hormon bağımlı fazda aksamaya uğradığını destekleyici niteliktedir. AR ile paralellik gösteren FGFR2 düzeylerindeki azalma

da hem FGFR2 ekspresyonunun androjen kontrolünde olduğunun, hem de epitel-mezenkim etkileşimlerinde sinyal molekölü olan FGFR2'nin azalmasıyla sinyal yolağında anormallik gelişip üretral plate gelişimi ve tübularizasyonunun defektif olmasına neden olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmanın sonuçlarına göre erkek dış genital yapıların gelişiminde cinsiyet hormon reseptörleri ve epitelizasyonda görevli FGF reseptörlerinin gen düzeyinde önemli görevler üstlendikleri, bu genlerin ifadesindeki aksaklıkların birbirini olumsuz yönde etkileyerek hipospadias gelişimine neden olabilecekleri söylenebilir. Bununla birlikte, yaş gruplarının ve hipospadias tiplerinin çeşitlilik gösterdiği, hasta sayısının arttırıldığı daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu ve etiyolojiyi aydınlatmada faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: Hipospadias, FGFR2, ESR1, AR

MOLECULAR AND STRUCTURAL COMPARISON OF HYPOSPADIC AND NORMAL CHILDREN PREPUCES

SUMMARY

Hypospadias is an anomaly characterized by the placement of the urethral opening in the ventral of the penis, proximal to the normal, prepuce closure defect in the ventral and various degrees of penile curvature. Although there are discussions about etiology, no clear results have been reported yet. It is believed that exposure to chemicals that may show hormonal activation, including synthetic estrogens such as diethylstilbestrol, may be caused.

In order to investigate the etiology of hypospadias, the presence of TGFB, ESR1, AR, FGFR2 and HOXA13 gene expressions, peripheral vascular and nerve densities were investigated in the prepuce samples obtained from 26 hypospadias and 26 circumcised patients who were operated in Trakya University Pediatric Surgery clinic.

ESR1 expression was increased in the hypospadias group ($p = 0.013$), and AR and FGFR2 expressions were decreased ($p = 0.027$ and $p = 0.003$, respectively). There was no statistically significant difference in TGFB and HOXA13 expression levels ($p > 0.05$). There was no statistically significant difference between the presence of ganglion, peripheral

vascular and nerve densities in immunohistochemical examination of tissue samples ($p > 0.05$).

Increased ESR1 levels in the hypospadias group reveal estrogen exposure in hypospadias formation, while the decrease in AR expression is supportive of the development of external genital organs in the hormone-dependent phase as a result of an increase in estrogen and androgen depletion. The decrease in FGFR2 levels parallel to AR suggests that both FGFR2 expression is under the control of androgens and that the signal molecule in the epithelial-mesenchyme interactions leads to defective urethral plate development and tubularization.

According to the results of the study, it can be said that gender hormone receptors and FGF receptors involved in epithelialization play important roles in the development of male external genital structures at the gene level, and that the defects in the expression of these genes can negatively affect each other and cause the development of hypospadias. However, we think that more extensive studies are needed in which age groups and hypospadias types vary, the number of patients is increased, and it will be useful in clarifying the etiology.

Keywords: Hypospadias, FGFR2, ESR1, AR

KAYNAKLAR

1. Snodgrass WB, N. C. Hypospadias. In: Docimo SG, editor. The Kelalis-King-Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology 6th edition ed. New York: Taylor & Francis; 2016. p. 1232-59.
2. Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS. Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation* 2012;84(3):261-8.
3. Beleza-Meireles A, Lundberg F, Lagerstedt K, Zhou X, Omrani D, Frisen L, et al. FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur J Hum Genet* 2007;15(4):405-10.
4. Morgan EA, Nguyen SB, Scott V, Stadler HS. Loss of Bmp7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development* 2003;130(14):3095-109.
5. Wang C-H, Zeng Q, Jiang X-Z, Wan B, He L-Y. Distribution of HoxA13 in the prepuce and urethral plate in different types of hypospadias and its implication. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2013;19(9):806-10.
6. Wang Z, Liu BC, Lin GT, Lin CS, Lue TF, Willingham E, et al. Up-regulation of estrogen responsive genes in hypospadias: microarray analysis. *J Urol* 2007;177(5):1939-46.

7. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11(4):415-21.
8. Pichler R, Djedovic G, Klocker H, Heidegger I, Strasak A, Loidl W, et al. Quantitative measurement of the androgen receptor in prepuces of boys with and without hypospadias. *BJU Int* 2013;112(2):265-70.
9. Dossanova A, Lozovoy V, Manekenova K, Lozovaya Y, Seidakhmetov M, Dossanov B, et al. Histological and morphological characteristics of the prepuce of penis skin structure in different age groups. *J Pediatr Urol* 2018;14(3):280.e1-e6.
10. Nazir Z, Masood R, Rehman R. Sensory innervation of normal and hypospadiac prepuce: possible implications in hypospadiology. *Pediatr Surg Int* 2004;20(8):623-7.
11. Kojima Y, Kohri K, Hayashi Y. Genetic pathway of external genitalia formation and molecular etiology of hypospadias. *J Pediatr Urol* 2010;6(4):346-54.
12. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346(6281):240-4.
13. Drake RL, Vogl W, Mitchell, AWM, Gray, H. *Gray's anatomy for students*. 4th edition ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2019.
14. Drake RL, Vogl W, Mitchell, AWM, Gray, H. *Gray's Atlas of Anatomy*. 2nd edition ed: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
15. Başaklar A. *Hipospadias. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. 2: Palme Yayıncılık; 2006. p. 1571-659.
16. Kenneth CH, Leung AK. Hypospadias: a review. *J Singapore Paediatr Soc* 1987;29(1):54-6.
17. Duckett JW, Jr. Hypospadias. *Pediatr Rev* 1989;11(2):37-42.
18. Baskin LS. Hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 2004;545:3-22.
19. Snodgrass WB, Bush, NC. Hypospadias. In Docimo SG (Ed). *The Kelalis-King-Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology* 6th ed. CRC Press 2016:1232-59.
20. van der Horst HJ, de Wall LL. Hypospadias, all there is to know. *Eur J Pediatr* 2017;176(4):435-41.
21. Smith ED. The history of hypospadias. *Pediatr Surg Int* 1997;12(2/3):81-5.

22. Hadidi AT. History of hypospadias: Lost in translation. *J Ped Surg* 2017;52(2):211-7.
23. Kendirci M, Kadioglu A, Boylu U, Miroglu C. Urogenital surgery of the 15th century in Anatolia. *J Urol* 2005;173(6):1879-82.
24. Byars LT. Surgical repair of hypospadias. *Surg Clin North Am* 1950;30(5):1371-8.
25. Duckett JW. MAGPI (meatoplasty and glanuloplasty): a procedure for subcoronal hypospadias. *Urol Clin North Am* 1981;8(3):513-9.
26. Snodgrass W. Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias. *J Urol* 1994;151(2):464-5.
27. Sagodi L, Kiss A, Kiss-Toth E, Barkai L. Prevalence and possible causes of hypospadias. *Orv Hetil* 2014;155(25):978-85.
28. Czeizel A, Toth J. Correlation between the birth prevalence of isolated hypospadias and parental subfertility. *Teratology* 1990;41(2):167-72.
29. Schnack TH, Zdravkovic S, Myrup C, Westergaard T, Christensen K, Wohlfahrt J, et al. Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2008;167(3):251-6.
30. Canning DA. Hypospadias trends in two US surveillance systems. Rise in prevalence of hypospadias. *J Urol* 1999;161(1):366.
31. Paulozzi LJ. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 1999;107(4):297-302.
32. Carmichael SL, Shaw GM, Nelson V, Selvin S, Torfs CP, Curry CJ. Hypospadias in California: trends and descriptive epidemiology. *Epidemiology* 2003;14(6):701-6.
33. Dolk H, Vrijheid M, Scott JE, Addor MC, Botting B, de Vigan C, et al. Toward the effective surveillance of hypospadias. *Environ Health Perspect* 2004;112(3):398-402.
34. Bergman JE, Loane M, Vrijheid M, Pierini A, Nijman RJ, Addor MC, et al. Epidemiology of hypospadias in Europe: a registry-based study. *World J Urol* 2015;33(12):2159-67.
35. Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;7(3):282-6.
36. Fisch H, Hyun G, Hensle TW. Rising hypospadias rates: disproving a myth. *J Pediatr Urol* 2010;6(1):37-9.

37. Nissen KB, Udesen A, Garne E. Hypospadias: Prevalence, birthweight and associated major congenital anomalies. *Congenit Anom* 2015;55(1):37-41.
38. Springer A, van den Heijkant M, Baumann S. Worldwide prevalence of hypospadias. *J Pediatr Urol* 2016;12(3):152 e1-7.
39. Smith CK. Surgical Procedure for Correction of Hypospadias. *J Urol*. 1938(40):239.
40. Schaeffer AA, Erbes, J. Hypospadias. *Am J Surg* 1950;80:183.
41. Lewitt SB, Edward FR. Hypospadias. *Pediatric Annals* 1988;17(1):48-57.
42. Barcat J. Anatomic-clinical studies in hypospadias symposium. *Ann Chir Infant* 1969;10:285.
43. Kalfa N, Sultan C, Baskin LS. Hypospadias: etiology and current research. *Urol Clin North Am* 2010;37(2):159-66.
44. 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(7):499-510.
45. Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation. Sex Dev* 2015;9(5):239-59.
46. George M, Schneuer FJ, Jamieson SE, Holland AJ. Genetic and environmental factors in the aetiology of hypospadias. *Pediatr Surg Int* 2015;31(6):519-27.
47. 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(1):12-9.
48. Kalfa N, Philibert P, Baskin LS, Sultan C. Hypospadias: interactions between environment and genetics. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335(2):89-95.
49. Thorup VM, do Nascimento OF, Skjoth F, Voigt M, Rasmussen MD, Bennedsgaard TW, et al. Short communication: Changes in gait symmetry in healthy and lame dairy cows based on 3-dimensional ground reaction force curves following claw trimming. *J Dairy Sci* 2014;97(12):7679-84.
50. Fredell L, Kockum I, Hansson E, Holmner S, Lundquist L, Lackgren G, et al. Heredity of hypospadias and the significance of low birth weight. *J Urol* 2002;167(3):1423-7.
51. Baskin LS. Hypospadias and urethral development. *J Urol* 2000;163(3):951-6.

52. Mendonca BB, Costa EM, Belgorosky A, Rivarola MA, Domenice S. 46,XY DSD due to impaired androgen production. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24(2):243-62.
53. Kalfa N, Philibert P, Werner R, Audran F, Bashamboo A, Lehors H, et al. Minor hypospadias: the "tip of the iceberg" of the partial androgen insensitivity syndrome. *PLoS One* 2013;8(4):e61824.
54. Kim KS, Liu W, Cunha GR, Russell DW, Huang H, Shapiro E, et al. Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res* 2002;307(2):145-53.
55. Uda A, Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Asai N, Kohri K. Morphological features of external genitalia in hypospadiac rat model: 3-dimensional analysis. *J Urol* 2004;171(3):1362-6.
56. Vottero A, Minari R, Viani I, Tassi F, Bonatti F, Neri TM, et al. Evidence for epigenetic abnormalities of the androgen receptor gene in foreskin from children with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(12):E1953-62.
57. Staib P, Kau N, Romalo G, Schweikert HU. Oestrogen formation in genital and non-genital skin fibroblasts cultured from patients with hypospadias. *Clin Endocrinol* 1994;41(2):237-43.
58. Klip H, Verloop J, van Gool JD, Koster ME, Burger CW, van Leeuwen FE, et al. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 2002;359(9312):1102-7.
59. Watanabe M, Yoshida R, Ueoka K, Aoki K, Sasagawa I, Hasegawa T, et al. Haplotype analysis of the estrogen receptor 1 gene in male genital and reproductive abnormalities. *Hum Reprod* 2007;22(5):1279-84.
60. Qiao L, Tasian GE, Zhang H, Cunha GR, Baskin L. ZEB1 is estrogen responsive in vitro in human foreskin cells and is over expressed in penile skin in patients with severe hypospadias. *J Urol* 2011;185(5):1888-93.
61. Haraguchi R, Suzuki K, Murakami R, Sakai M, Kamikawa M, Kengaku M, et al. Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development* 2000;127(11):2471-9.
62. 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(1):26-46.
63. 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(21):4241-50.

64. Petiot A, Perriton CL, Dickson C, Cohn MJ. Development of the mammalian urethra is controlled by Fgfr2-IIIb. *Development* 2005;132(10):2441-50.
65. Yucel S, Liu W, Cordero D, Donjacour A, Cunha G, Baskin LS. Anatomical studies of the fibroblast growth factor-10 mutant, Sonic Hedge Hog mutant and androgen receptor mutant mouse genital tubercle. *Adv Exp Med Biol* 2004;545:123-48.
66. Suzuki K, Bachiller D, Chen YP, Kamikawa M, Ogi H, Haraguchi R, et al. Regulation of outgrowth and apoptosis for the terminal appendage: external genitalia development by concerted actions of BMP signaling [corrected]. *Development* 2003;130(25):6209-20.
67. Carmichael SL, Ma C, Choudhry S, Lammer EJ, Witte JS, Shaw GM. Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development. *J Urol* 2013;190(5):1884-92.
68. Zou MX, Liu HY, Haraguchi Y, Soda Y, Tatemoto K, Hoshino H. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett* 2000;473(1):15-8.
69. Han XR, Wen X, Wang S, Hong XW, Fan SH, Zhuang J, et al. Associations of TGFBR1 and TGFBR2 gene polymorphisms with the risk of hypospadias: a case-control study in a Chinese population. *Biosci Rep* 2017;37(5).
70. Wang Y, Li Q, Xu J, Liu Q, Wang W, Lin Y, et al. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet* 2004;12(9):706-12.
71. Kohler B, Biebermann H, Friedsam V, Gellermann J, Maier RF, Pohl M, et al. Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46,XY disorders of sex development. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):E1131-6.
72. Celayir A, Moralioglu S, Cetiner H, Kir G, Celayir S. Expression of androgen, estrogen, and progesterone hormone receptors in the penile tissues of children with different types of hypospadias. *North Clin Istanb* 2019;6(2):110-6.
73. Giordano F, Carbone P, Nori F, Mantovani A, Taruscio D, Figa-Talamanca I. Maternal diet and the risk of hypospadias and cryptorchidism in the offspring. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;22(3):249-60.
74. Carrasco Jr AM, JP. Hypospadias. *Holcomb and Achcraft's Pediatric Surgery*. 7th ed. Elsevier; 2019. p. 918-41.
75. Mouriquand PM, P. Y. Hypospadias. In: Puri PH (ed). *Pediatric Surgery Atlas*: Springer; 2006. p. 529-42.
76. Haid B, Pechriggl E, Nagele F, Dudas J, Webersinke G, Rammer M, et al. FGF8, FGF10 and FGF receptor 2 in foreskin of children with hypospadias: an analysis of immunohistochemical expression patterns and gene transcription. *J Pediatr Urol* 2019.

77. Kurzrock EA, Baskin LS, Cunha GR. Ontogeny of the male urethra: theory of endodermal differentiation. *Differentiation* 1999;64(2):115-22.
78. Kurzrock EA, Baskin LS, Li Y, Cunha GR. Epithelial-mesenchymal interactions in development of the mouse fetal genital tubercle. *Cells Tissues Organs* 1999;164(3):125-30.
79. Ma LM, Wang Z, Wang H, Li RS, Zhou J, Liu BC, et al. Estrogen effects on fetal penile and urethral development in organotypic mouse genital tubercle culture. *J Urol* 2009;182(5):2511-7.
80. Gredler ML, Seifert AW, Cohn MJ. Tissue-specific roles of Fgfr2 in development of the external genitalia. *Development* 2015;142(12):2203-12.
81. Oladipupo SS, Smith C, Santeford A, Park C, Sene A, Wiley LA, et al. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(37):13379-84.
82. Silva TS, Richeti F, Cunha DP, Amarante AC, de Souza Leao JQ, Longui CA. Androgen receptor mRNA measured by quantitative real time PCR is decreased in the urethral mucosa of patients with middle idiopathic hypospadias. *Horm Metab Res* 2013;45(7):495-500.
83. Kim KS, Torres CR, Jr., 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(3):267-75.
84. Choudhry S, Baskin LS, Lammer EJ, Witte JS, Dasgupta S, Ma C, et al. Genetic polymorphisms in ESR1 and ESR2 genes, and risk of hypospadias in a multiethnic study population. *J Urol* 2015;193(5):1625-31.
85. Ban S, Sata F, Kurahashi N, Kasai S, Moriya K, Kakizaki H, et al. Genetic polymorphisms of ESR1 and ESR2 that may influence estrogen activity and the risk of hypospadias. *Hum Reprod* 2008;23(6):1466-71.
86. Zhou Y, Huang F, Liu Y, Li D, Zhou Y, Shen L, et al. TGF-beta1 relieves epithelial-mesenchymal transition reduction in hypospadias induced by DEHP in rats. *Pediatr Res* 2019.
87. Utsch B, Kaya A, Ozburun A, Lentze MJ, Albers N, Ludwig M. Exclusion of WTAP and HOXA13 as candidate genes for isolated hypospadias. *Scand J Urol Nephrol* 2003;37(6):498-501.
88. Baskin LS, Lee YT, Cunha GR. Neuroanatomical ontogeny of the human fetal penis. *Br J Urol* 1997;79(4):628-40.
89. Savas MC, Kapucuoglu N, Gursoy K, Baspinar S. The microvessel density of the hypospadiac prepuce in children. *J Pediatr Urol* 2011;7(2):162-5.



EKLER

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU		TÜTF-BAEK 2019/51		
	PROTOKOL ADI		Normal ve Hipospadişlı Çocukların Prepsiyumlarındaki Yapısal ve Moleküler Genetik Özelliklerin Karşılaştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI		Prof. Dr. Dinçer AVLAN		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ				
	DESTEKLEYİCİ				
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 04/03		Tarih: 25.02.2019		
	Fakültemiz Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Dinçer AVLAN'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. İrem İNANÇ'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI		Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi			

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	<i>Mazaretli</i>
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Üyesi F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	<i>Mazaretli</i>
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	<i>Mazaretli</i>
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	(E) H	<i>[İmza]</i>
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	<i>Mazaretli</i>
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E (H)	(E) H	<i>[İmza]</i>
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	<i>[İmza]</i>

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.

[İmza]

EK 2

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Normal ve Hipospadiaslı Çocukların Prepisyumlarındaki Yapısal ve Moleküler Özelliklerin Karşılaştırılması
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Normal ve doğuştan yarım sünnetli çocukların sünnet derilerindeki farklılıkların incelenmesi
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Prof. Dr. Dinçer Avlan, Trakya Üniversitesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Çocuk Ürolojisi Bilim Dalı
- **Araştırmanın amacı:** Doğuştan yarım sünnete neden olabilecek genleri ve sünnet derisindeki farklılıkları araştırarak hastalığın oluşumu açısından literatüre ve hastalara katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Tıpta Uzmanlık Tez çalışması
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 01.03.2019 – 1 yıl
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 52
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Yapılacak ameliyatta çıkarılan ve nomalde çöpe atılacak olan sünnet derisinden alınacak yaklaşık 1x1 cm boyutlarındaki doku örneği Tıbbi Genetik ve Tıbbi Patoloji laboratuvarlarına ulaştırılacaktır.
- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Çalışmanın genetik analizleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkez’inde, histopatolojik analizleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı’nda yapılacaktır. Her hasta uygun bir kod ile işaretlenip isimleri kullanılmayacaktır, bilgileri gizli tutulacaktır. Hastalardan alınacak olan dokudan hastalığın tanısını açığa çıkarabilecek genetik ve histopatolojik değişiklikler araştırılacaktır.
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Belirtilen uygulama yöntemi dışında gönüllülere farklı bir yöntem uygulanmayacaktır, bu yüzden araştırma grubunda rastgele atanma olasılığı yoktur.
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Peygamber sünneti tanısı olan hastalarda hastalığa sebep olabilecek doku farklılıklarını saptayarak hastalığın tanısı ve nedeni hakkında daha fazla bilgi sahibi olunabilmesi.
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Araştırmanın gönüllü için doğrudan bir yararı yoktur ancak doğuştan yarım sünnetli olmanın sebebini açıklayabilir ve bu hastalığın tedavisinde yardımcı olabilir.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Gönüllünün planlanan ameliyatına ek olarak herhangi bir sorumluluğu yoktur.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Yapılması planlanan ameliyata ek bir risk bulunmamaktadır.

- Risklere karşı alınan önlemler:** Ameliyata ek bir risk olmadığından alınacak önlem bulunmamaktadır.
- Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Sünnet ve doğuştan yarım sünnetli olma ameliyatlarına alternatif yöntem yoktur.
- Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Araştırmaya bağlı olarak hastaya zarar gelmesi beklenmemektedir.
- Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Gönüllülere herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllüler araştırmaya dahil edilme kriterlerine uymuyorsa ve kendi istekleriyle çalışmadan ayrılabilirler.
- Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Gönüllülere bilgi verilmesi planlanmamaktadır, talep edilmesi halinde bilgi verilebilir.
- Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:**

Arş. Gör. Dr. İrem İnanç – 0543 620 49 29

- Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:**

Alınan materyal, hastalığın nedenini saptamak amacıyla patoloji ve genetik laboratuvarlarında incelenecektir.

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediyim ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

•**Gönüllünün; (El yazısı ile)**

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

•**Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)**

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

•**Açıklamaları yapan araştırmacının**

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih: