



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

HİSTOPATOLOJİK TANILI REKTOSİGMOİD HİRSCHSPRUNG  
HASTALIĞI OLGULARINDA BCL-2 VE LAMİNİN EKSPRESYONUNUN  
RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE HİRSCHSPRUNG  
ENTEROKOLİTİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Dr. Merve DEDE

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

HİSTOPATOLOJİK TANILI REKTOSİGMOİD HİRSCHSPRUNG  
HASTALIĞI OLGULARINDA BCL-2 VE LAMİNİN EKSPRESYONUNUN  
RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE HİRSCHSPRUNG  
ENTEROKOLİTİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Dr. Merve DEDE

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. İrfan KIRIŞTIOĞLU

Bursa-2023

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
SUMMARY .....	v
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.Giriş ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler.....	1
2.1.Tarihçe .....	1
2.2.Embriyoloji .....	2
2.2.1.Laminin .....	4
2.2.2.BCL-2.....	5
2.3.Fizyoloji ve Histoloji .....	7
2.4.Etyopatogenez ve Teoriler.....	8
2.4.1.Embriyolojik Nedenler .....	8
2.4.2.Genetik Nedenler .....	8
2.4.3.İmmünolojik Faktörler.....	9
2.4.4.Edinsel Nedenler.....	9
2.5.Patoloji.....	9
2.6.Hirschsprung Hastalığında Anatomik Tutulum.....	11
2.7.Tanı.....	11
2.7.1.Klinik .....	11
2.7.2.Laboratuvar.....	11
2.7.3.Doku Tanısı için Kullanılan Yöntemler .....	11
A.Histopatolojik Tanı (Enzim Histokimyası) .....	11
B.İmmunohistokimyasal Tanı.....	12
C.Elektron Mikroskopik Çalışmalar.....	13
D.Genetik Çalışmalar .....	13
2.8.Komplikasyonlar .....	14
2.8.1.Enterokolit Tablosu.....	14
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
1.Gereç.....	17

1.1.Kullanılan Cihazlar .....	17
1.2.Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	18
2.Yöntem.....	18
2.1.Hasta Seçim Kriterleri .....	18
2.2.Parafinize Doku Materyalinin Temini ve İmmünohistokimyasal Boyama.....	20
2.3.İmmünohistokimyasal Boya Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	21
2.4.Parafinize Dokudan DNA İzolasyonu .....	21
2.5.Spektrofotometre ile DNA Kalite Tayini.....	22
2.6.Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	23
2.7.Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
2.8.BCL-2 Geni için Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) .....	25
2.9.Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması ve PAGE Yükleme .....	25
2.10.Gümüş Boyama .....	26
2.11.DNA Dizi Analizi ile Mutasyon Tayini .....	27
A.Pürifikasyon Basamağı .....	27
B.DNA Dizi Analizi .....	28
2.12.Parafinize Dokudan RNA İzolasyonu.....	29
2.13.cDNA (Komplementer DNA) Sentez Aşaması .....	29
2.14.mRNA Ekspresyon Analizi .....	30
2.15.İstatistiksel Analizler.....	32
<b>BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
A.İmmünohistokimyasal Çalışma Bulguları .....	33
B.Moleküler Genetik Analiz Sonuçları .....	36
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>61</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>62</b>

## ÖZET

Hirschsprung hastalığı (HH) etyolojisi netlik kazanmamış, histopatolojik tanısı güç bir hastalıktır. Hastalıkla ilişkili Hirschsprung enterokoliti (HEK) etyolojisi de belirsizliğini korumaktadır.

Intrauterin dönemde nöral krest hücrelerinin enterik sinir sistemini oluşturmak üzere, kraniokaudal yöndeki göçünde görevli ekstrasellüler matriks proteinlerinden Laminin ve anti-apoptotik, nöroprotektif BCL-2 ekspresyonunun, post-operatif HEK geçiren ve geçirmeyen hastalardaki durumu karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Merkezimizde opere olmuş, histopatolojik tanılı 20 rektosigmoid Hirschsprung hastasına (post-operatif HEK görülen 10, görülmeyen 10 hasta) ve kontrol grubu olmak üzere, HH dışı nedenlerle opere edilmiş 10 hastaya ait, patoloji arşivinde bulunan bağırsak dokusu retrospektif olarak incelenmiştir. Dokular immunohistokimyasal yöntemlerle protein ekspresyonu, moleküler genetik incelemelerle mRNA ve DNA düzeyinde değerlendirilmiş, BCL-2 ve Lamininin, HH ve HEK ilişkisi araştırılmış, yöntemlerin sonuçları karşılaştırılmıştır.

BCL-2 immunohistokimyasında HH'de aganglionik dokulardaki ekspresyonun, ganglionik dokulara göre anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. *BCL-2* mRNA ekspresyonu ise hem aganglionik hem ganglionik dokularda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşük belirlenmiştir. Laminin immunohistokimyasında aganglionik dokular anlamlı düzeyde pozitif boyanırken, ganglionik dokular negatif-hafif boyanmıştır. Laminin mRNA düzeyinde değerlendirmede kullanılan *LAMA1* molekülünün ekspresyonu, aganglionik dokularda daha yüksek olma eğilimi gösterse de her dokuda farklı değerler elde edilmiştir. BCL-2 ve Lamininin HEK ile ilişkisine yönelik incelemelerde immunohistokimyasal ve moleküler anlamlılık belirlenememiştir. *BCL-2* geninde mutasyon araştırmak amacıyla yapılan DNA dizi analizinde, bir olguda HH için literatürde tanımlanmamış bir değişim tespit

edilmiştir. Bu hastanın aganglionik bağırsak dokusundaki *BCL-2* mRNA ekspresyonu da ganglionik dokusuna göre belirgin olarak azalmıştır.

Bunların sonucunda *BCL-2*'nin, HH ve HEK etyopatogenezinde üzerine düşülmesi gereken bir molekül olduğu kanaatindeyiz. Elde edilen sonuçlar, geniş hasta serileriyle yapılacak çalışmalarla anlamlılık gösterebilecek potansiyelindedir.

**Anahtar Kelimeler:** Hirschsprung hastalığı, *BCL-2*, Laminin, Hirschsprung enterokoliti



## SUMMARY

### **Retrospective Analysis of BCL-2 and Laminin Expression in Cases of Rectosigmoid Hirschsprung Disease with Histopathological Diagnosis and Its Relationship with Hirschsprung-Associated Enterocolitis**

Hirschsprung's disease (HD) is a condition whose etiology has not been clarified and its histopathological diagnosis is tough. The etiology of the Hirschsprung associated enterocolitis (HAEC) also remains unclear.

The expression of Laminin which is extracellular matrix protein involved in the craniocaudal migration of neural crest cells in the intrauterine period to form the enteric nervous system and BCL-2 which is anti-apoptotic, neuroprotective were compared in patients with and without post operative HAEC.

Retrospective analysis was performed on the intestinal tissue from 20 patients with the histopathological diagnosis of Rectosigmoid Hirschsprung who underwent surgery in our center (10 patients with post-operative HAEC, 10 patients without) and 10 patients as the control group who underwent surgery for an unrelated condition. Immunohistochemical techniques were used to evaluate the protein expression in tissues and molecular genetic studies were used to evaluate in the terms of mRNA and DNA analyses. Investigations were done into the connections between BCL-2, Laminin, HD and HAEC. The outcomes of the various procedures were compared.

When compared to ganglionic tissues, BCL-2 immunohistochemistry revealed that HD patients' aganglionic tissues had significantly lower levels of BCL-2 expression. In HD patients' aganglionic and ganglionic tissues, *BCL-2* mRNA expression was shown to be considerably lower than in the control group. Aganglionic tissues stained strongly positively with Laminin immunohistochemistry, whereas ganglionic tissues stained lightly or negatively. Although aganglionic tissues tended to have increased levels of *LAMA1* molecule expression, which is used to evaluate Laminin at the mRNA level, various values were found in each tissue. Immunohistochemical and

molecular significance could not be determined in the investigations regarding the relationship between BCL-2 and Laminin and HAEC. During DNA sequencing analysis for *BCL-2* gene mutation investigations, a mutagenic change for HD that has not yet been identified in the literature was detected. Aganglionic tissue from this patient expressed *BCL-2* mRNA substantially less than ganglionic tissue appears to have done.

Hence, we conclude that BCL-2 is a molecule that should be considered while figuring out the etiopathogenesis of HD and HAEC. Results from research studies with larger patient series could discover the outcomes to be meaningful.

**Keywords:** Hirschsprung's disease, BCL-2, Laminin, Hirschsprung associated enterocolitis



# GİRİŞ

## 1. Giriş ve Amaç

Hirschsprung hastalığı (HH), çoğunlukla gastrointestinal sistemin distalinde, myenterik ve submukozal sinir pleksuslarında ganglion hücrelerinin bulunmaması, etkilenen bağırsakta normal peristaltik hareketlerin görülmemesi ve fonksiyonel bağırsak obstrüksiyonu ile karakterize konjenital bir hastalıktır (1,2).

Hirschsprung enterokoliti (HEK) ise Hirschsprung hastalığının en ciddi ve yaşamı tehdit edici komplikasyonudur. Hastada yüksek ateş, sepsis bulguları, bol-kötü kokulu ishal şeklinde dışkılamaya rağmen karında distansiyon, hassasiyet ve direkt grafilerde geniş tabanlı hava sıvı seviyelerinin bulunması ile karakterize intestinal obstrüksiyon tablosu görülür (1-4). HEK, pre-operatif dönemde görülmesinin yanısıra, post-operatif (definitif pull through cerrahisi sonrası) dönemde de karşılaşılabilen bir klinik durum olup, etyolojisi hala belirsizliğini korumaktadır (5).

Bu çalışmada intestinal BCL-2 ve Laminin ekspresyonunun post-operatif HEK geçiren ve geçirmeyen hastaların biyopsi materyallerindeki seviyesi ile normal kişilerdeki ekspresyon seviyesi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Böylece HEK geçiren ve geçirmeyen hastalar ve HH taşımayan kontrol grubu karşılaştırılarak HH ve HEK etyolojisi ile ilişkili mekanizmalar hakkında bilgi üretilmesi amaçlanmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

### 2.1. Tarihçe

HH ile ilgili ilk kayıt, Hollandalı Frederick Ruysch tarafından 1691 yılında bildirilen otopsi bulguları olup, klinik tanımlama ise 1886 yılında Danimarkalı bir doktor olan Harald Hirschsprung tarafından yapılmıştır (6).

Hastalığın tanısı 1955-1960 tarihleri arasında tam kat intestinal biyopsi alınarak koyulurken, 1960 itibarıyla rektal mukozal biyopsiler (punch biyopsi

(Bx) veya aspirasyon Bx) de popülarleşmeye başlamıştır (7). Tanı amacıyla Hemotoksilen-Eozin (H&E), Asetilkolinesteraz (AChE) boyamaları gibi enzim histokimyası, çeşitli immunohistokimyasal boyamalar ve elektron mikroskopik değerlendirmeler kullanılmaktadır. Ancak tüm bu değerlendirmelerin çeşitli avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Avrupa Pediatrik Cerrahlar Birliği en çok kullanılan histolojik ve immün boyama yöntemlerinin H&E boyama (%77), AChE boyama (%74) ve kalretinin boyama (%31) olduğunu bildirmiştir (7,8).

HEK kavramı ise literatürde 1950'de ilk kez Burnard, Fisher ve Swenson tarafından ima edilmiş, 1962'de Bill ve Chapman ilk kesin tanımı sunmuştur (9). Pek çok bilim insanı o tarihten bu yana HEK etyopatogenezini aydınlatmaya ilişkin çalışmalar sürdürmektedir ancak; bu konu hala netlik kazanmamıştır.

HEK tanısı koymayı standardize etmek amacıyla, 2008 yılında Delphi yöntemiyle (10,11) ve 2013 yılında Amerikan Pediatrik Cerrahi Derneği tarafından bir HEK kılavuzu geliştirilmiştir (11).

HH'nin cerrahi tedavisine yönelik ilk başarılı cerrahi girişim 1948 yılında Swenson ve Bill tarafından yapılmıştır. Takip eden yıllarda Duhamel, Martin, State, Rehbein, Soave, Boley kendi adlarıyla anılan teknikler ve modifikasyonlar tanımlamışlardır. Son yıllarda ise klasik teknikler yerini, transanal endorektal pull-through (TERPT), posterior eksizyonel anorektal myektomi, submukozal sfinkteromyotomi gibi tekniklere bırakmıştır (12).

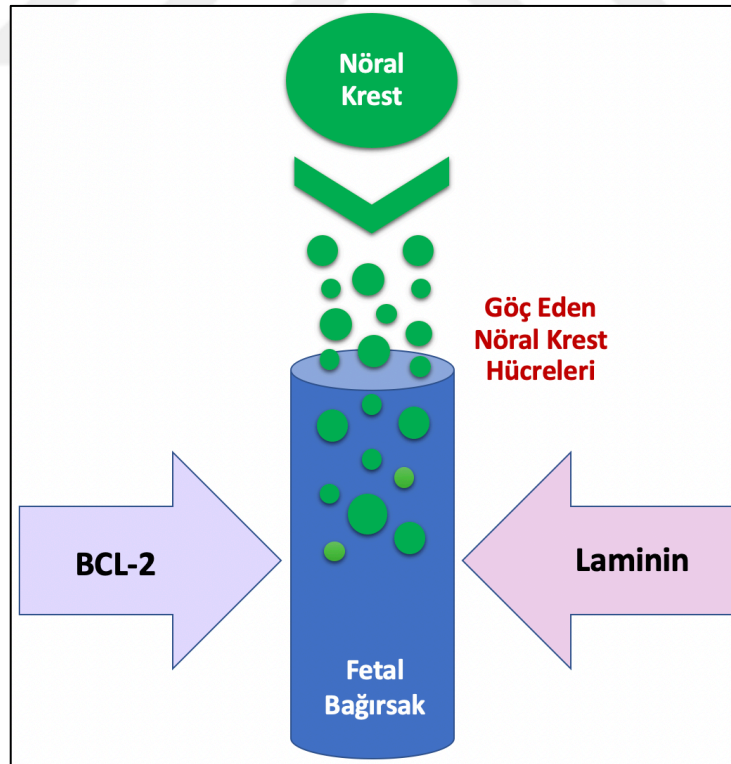
## **2.2. Embriyoloji**

HH'deki temel problem olan aganglionozis; intrauterin dönemde nöral krest hücrelerinin enterik sinir sistemini oluşturmak üzere kraniokaudal yönde ve bağırsak duvarında uygun yerlere göç edememeleri, anormal yapıda olmaları, yerleşeceği uygun bir mikroçevre bulamamaları, matriks proteinlerindeki anormallikler ve immatür nöral elemanların olgunlaşamamaları gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Nöronal göç herhangi bir nedenle duraksadığında, distaldeki bağırsaklar aganglionik olarak kalmaktadır (1,2).

Nöroenterik ganglion hücreleri, gestasyonun 4. haftasında torasik somitlerden ayrılarak kranial ve kaudal yönde gastrointestinal kanala göç eder.

Vagal nöral krest hücreleri kraniokaudal yönde göç ederken, sakral nöral krest hücrelerinin kaudaldan kraniale doğru migrasyonu başlar. Bu migrasyonun sonucu olarak kolonun distal yarısı hem vagal hem de sakral parasempatik sistemden gelen ektramural sinir lifleri tarafından innerve olur (1,2,13). Kraniokaudal yönde göç eden nöroblastlar özofagusa 5-6. haftada, mide ve duodenuma 7. haftada ve distal rektuma 12. haftada ulaşır. Bağırsak visseral bir organ haline gelince, nöronlar bağırsak duvarında derin tabakalara ilerleyerek bağırsağın intrinsik otonom sinir sistemini oluşturan ganglion hücrelerini meydana getirir. Ganglion hücreleri önce Auerbach (myenterik) pleksusunu ardından submukozal Meissner pleksusunu oluşturur (1).

Nöral öncü hücrelerin kraniokaudal yönde ilerleyerek bağırsak duvarına ulaşmasında nöral farklılaşma ve enterik mikroçevrenin rolü büyüktür (14). Şekil-1, fetal nöral intestinal yapıyı şekillendirmek üzere kraniokaudal yönde göç eden nöral krest hücreleri ile bu göçte BCL-2 ve Laminin molekülünün etkisini şematize etmektedir.

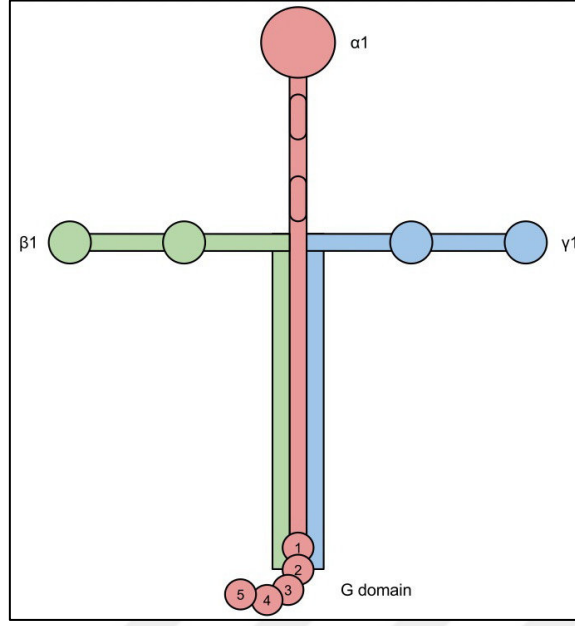


**Şekil-1:** Nöral krestten fetal bağırsağa hücre göçü üzerine BCL-2 ve Laminin etkisi

Nöral migrasyona etkili mikroçevre elemanlarından olan ekstrasellüler matriks (ECM) moleküllerinin, biyolojik olarak aktif olduğu ve nöral krest kök hücrelerinin kaderini değiştirebildiği gösterilmiştir. Bu düzenlemede rol oynayan önemli yapılar: Laminin, tip 4 kollajen, fibronektin ve proteoglikanlar gibi ECM molekülleri; NCAM ve L1CAM gibi nöral hücre adezyon molekülleridir (13). Aganglionik segmentlerde bu moleküllerin aktivitelerinin anormal olduğu tespit edilmiştir (1,2,15).

### **2.2.1. Laminin**

Laminin; epitel, endotel, kas ve yağ hücreleri ile periferik ve merkezi sinir sistemini çevreleyen, bir arada tutan, fonksiyonel bazal membranın önemli bir bileşenidir. Farklı hücresele aktiviteler ve sinyal yolları ile bazal membran komşuluğundaki hücrelerle etkileşime girerler. Her bazal membran yapısal ve fonksiyonel farklılıkları olan Lamininler içerir. Lamininler; her biri  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  zincirlerinden oluşan geniş bir glikoprotein ailesidir. Şu anda, içerdikleri farklı aminoasit yapılarına göre beş  $\alpha$ , üç  $\beta$  ve üç  $\gamma$  Laminin zinciri tanımlanmıştır. Bunların farklı kombinasyonları toplamda 15 Laminin izoformu oluşturur. Genetik tetkikler ve immunohistokimyasal boyamalarla farklılıkları ortaya konabilen bu izoformlardan Laminin-1 (zincir kompozisyonuna göre adlandırılmış haliyle Laminin 111) (Şekil-2) embriyonik epitelyal gelişim ve nöral büyümede rol oynar. Laminin-1'in, enterik nöronların gelişimini de desteklediği bilinmektedir (16). Hirschsprung hastalarının aganglionik segmentinde Laminin-1 ekspresyonunun artması Laminin-1'in aganglionoziste rol oynayan bir molekül olduğunu düşündürmektedir. Özellikle Laminin-1'in bağırsak dokusunda eksprese edilen  $\alpha 1$  alt biriminin (*LAMA1*) bu bölgede nöral büyümeyi desteklediği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Laminin-1'in enterik nöral sistem (ENS) gelişimi üzerindeki kesin etkisi tam olarak anlaşılmamıştır (17-19).



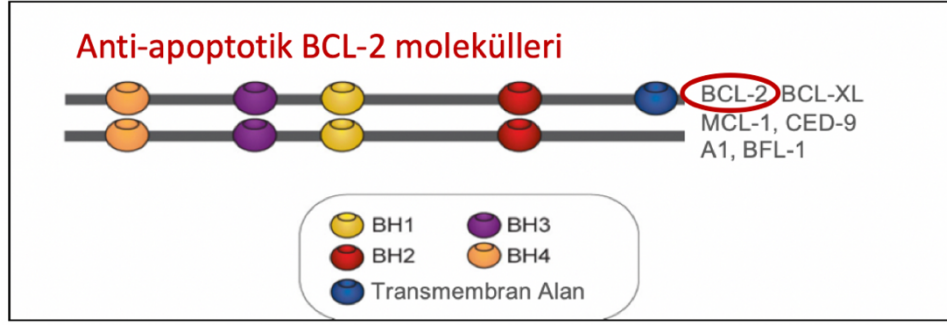
**Şekil-2:**  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$  den oluşan çapraz şekilli Laminin-1 yapısı (20)

Lamininin de bir parçası olduğu ECM ve organizasyonu, dinamik olarak değişir ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesini etkiler. ECM düzensizlikleri HH'de sadece bir sonuç değil, aynı zamanda HH etyopatogenezi için bir sebep olabilir. Hirschsprung hastalarında etkilenen bağırsakta ENS'nin rejenerasyonu için ekstrasellüler matriks proteinlerinin kullanılabileceği öngörülmektedir (13).

### 2.2.2. BCL-2

Programlanmış hücre ölümü (apoptozis) ile ilgili önemli bir protein ailesi olan BCL-2 ailesi, hem inhibitör (anti-apoptotik) hem de inhibitör etkiyi bloke eden (pro-apoptotik) düzenleyiciler içerir (21).

BCL-2 ailesinin farklı üyeleri, yapılarındaki BCL-2 homoloji (BH) alanlarında farklılıklar içerir ve ekspresyon analizleri ile tespit edilebilirler. Bu ailenin anti-apoptotik özellik taşıyan en önemli üyeleri BCL-2 ve BCL-x<sub>L</sub> iken, pro-apoptotik etkili önemli üyeler Bax, Bak, BCL-x<sub>S</sub> dir (21). Anti-apoptotik BCL-2 protein ailesi Şekil-3'te şematize edilmiştir (22).



**Şekil-3:** İçerdiği BH alanlarına göre apoptozis üzerinde farklı etkiler gösteren BCL-2 ailesi üyeleri (Abgent tarafından tasarlanmış ve Wikipedia'ya bağışlanmıştır, Kosigrim tarafından grafik uygulama yapılmıştır) (22)

Gelişmekte olan merkezi ve periferik sinir sistemlerinde yaygın olarak eksprese edilen BCL-2 proteini, buradaki apoptozu bloke etmede işlevsel bir role sahiptir (23). Ayrıca artan kanıtlar BCL-2'nin nöronal hücre farklılaşması ve büyümesinde önemli bir işlevi olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada BCL-2 ekspresyonunun, fetüsün myenterik ve submukozal pleksuslarının enterik ganglion hücrelerinde ortaya çıktığı ve yetişkin bağırsağında korunduğu gösterilmiştir (24).

Antiapoptotik özellik taşıyan BCL-2'nin azalması nöronal gelişimde sorun yaratacaktır. Aganglionik dokularda BCL-2 düzeyleri düşük olacaktır. Deneysel ve klinik çalışmalarla bu görüş desteklenmektedir (25,26).

Sıçan aganglionik kolonuna BCL-2'yi aşırı eksprese eden nöroepitelyal kök hücre transplantasyonunun, aşılınmış hücrelerin hayatta kalması, farklılaşması ve işlevi üzerindeki etkisini değerlendiren deneysel bir çalışmada apoptozun 1 haftada azaldığı, nöronal farklılaşmanın arttığı, kolon şeritlerinde elektriksel stimülasyon ile indüklenen relaksasyonun da arttığı gözlemlenmiştir. Bu deneysel çalışmanın sonucunda, BCL-2'nin nöronal replasmanı artırabileceği, gastrointestinal nörodejeneratif hastalıklar için yararlı bir tedavi olacağı düşünülmüştür (25).

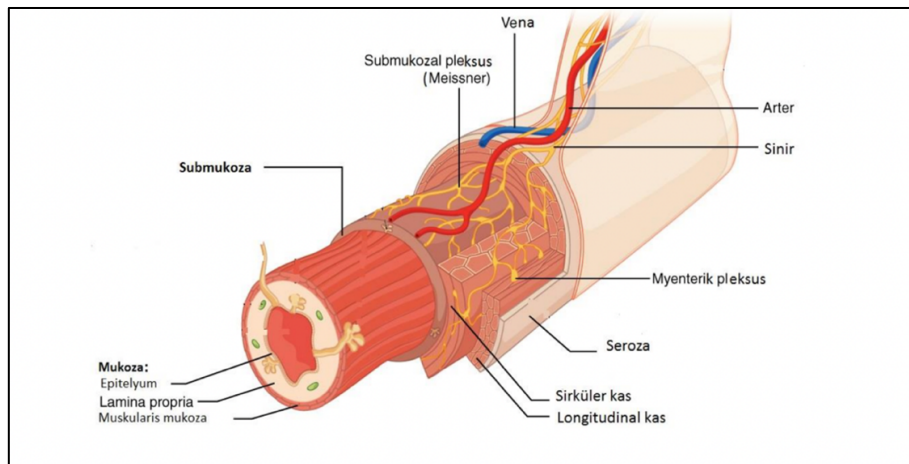
Pediyatrik fonksiyonel bağırsak obstrüksiyonu vakalarında BCL-2 ekspresyonunun rolünü değerlendiren bir çalışmada BCL-2 ekspresyonu ile ganglion hücre sayısı arasında önemli bir korelasyon olduğu, hiperganglionik numunelerde yüksek, hipoganglionik numunelerde düşük bulunduğu belirtilmiştir (26).

### 2.3. Fizyoloji ve Histoloji

Gastrointestinal kanalın sinir sistemi intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere birlikte çalışan iki yapılanma şeklindedir. Ekstrinsik sinir sistemi; periferik sinir sistemine ait otonom sinir sistemi tarafından oluşturulur. Bu sistem gastrointestinal traktusun dışındadır. Hem parasempatik hem sempatik innervasyonu vardır (16).

Intrinsik sistemi oluşturan yapılanma, enterik nöral sistem (ENS) şeklinde isimlendirilen benzersiz bir yapıdır. ENS, gastrointestinal sistem duvarında bulunan nöronlar ve onları destekleyen hücrelerden oluşan sistemdir. Bu yapı kısmen santral sinir sistemi tarafından kontrol edilse de esas olarak kendi içinde kısa refleks arkları ile fonksiyon gösterir. Normal gastrointestinal motilitede oldukça önemli bir rolü olan ENS'nin gelişiminin anlaşılması, pediatrik hasta popülasyonuna ait motilite bozukluğu patofizyolojisinin ve tedavisinin aydınlatılması için önem arz eder (16).

Histolojik olarak ENS Auerbach (myenterik), Henle ve Meissner diye adlandırılan üç ganglion pleksusundan oluşur. Bunlardan Auerbach pleksusu sirküler ve longitudinal kas tabakalarının arasında, Henle pleksusu submukozanın derininde, Meissner pleksusu ise submukozanın yüzeyinde bulunur (Şekil-4) (27).



**Şekil-4:** Gastrointestinal intrinsik sinir sistemini oluşturan Submukozal (Meissner) ve Myenterik (Auerbach) pleksuslarının histolojik yapısı (Wikimedia'dan alınan ve Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported lisansı altında çoğaltılan görsel) (27)

## 2.4. Etyopatogenez ve Teoriler

HH etyopatogenezinde embriyolojik faktörler, genetik faktörler, immünolojik faktörler ve edinsel nedenler olabileceği düşünülmüştür.

### 2.4.1. Embriyolojik Nedenler

Kabul gören iki teori olmuştur (1,2). Enterik sinir sistemini oluşturmak üzere bağırsaklara göç eden nöral krest hücrelerinin distale göçünün durması sonucu HH'nin oluştuğu teorisi bunların ilkidir. Bu teoriye göre aganglionik segmentin uzunluğu ganglion hücre göçünün duraklama zamanına göre değişir (1,2,28,29).

İkinci teoriye göre hedeflerine ulaşmasına rağmen uygunsuz mikroçevre koşullarından dolayı nöral krest hücrelerinin sayısı artmaz, differansiyasyon ve sağ kalım sorunları olur (1,2,28,29).

Nöral hücre gelişimini, göçünü ve bağırsak duvarına yerleşmelerini kolaylaştıran Laminin ve BCL-2 gibi protein yapıların bağırsaktaki anormal dağılımı aganglionozis ile sonuçlanabilir (13).

### 2.4.2. Genetik Nedenler

HH özellikleri cinsiyet ile değişkenlik gösterebilen, %80-90 sporadik, %10 aile öyküsü olan bir hastalıktır. Down sendromlu çocuklarda HH daha sık görülür (30).

Nöral krest hücre göçüne ve bu hücrelerin bağırsakta yaşamasına engel olarak aganglionozis yarattığı düşünülen bazı durumlar tanımlanmıştır. Bunlar; *RET* proto-onkogenini etkileyen genetik mutasyonlar, glial-hücre-kökenli nörotrofik-faktör (*GDNF*) ekspresyonunun azalması nedeniyle *RET* reseptörünün aktive olamaması, endotelinlerin endotelin-B-reseptör-kompleksine (*EDNRB*) bağlanamaması ve aktive olamaması, *SOX10* genindeki mutasyonlardır (21,28,29).

*BCL-2* gen ürününün, apoptozda yer alan yolakların kritik bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir (24).

Artan kanıtlar, anti-apoptotik özelliklerine ek olarak, *BCL-2*'nin hücre farklılaşması ve büyümesinde önemli bir işlevi olduğunu göstermektedir. Nöral krest hücrelerinin sağkalımını ve nöronal farklılaşmayı iyileştirdiği düşünülmektedir. İn vivo çalışmalar *BCL-2* aşırı ekspresyonunun sıçan



striatumuna nakledilen fetal dopaminerjik nöronların aksonal büyümesini arttırdığını göstermiştir (25).

Enterik nöral krest kaynaklı hücreler fetal bağırsakta oldukça az apoptotik ölüme maruz kalır. Bazı kanıtlar, fetal bağırsaktaki bu hücrelerin trofik destek gerektirdiğini ve bunun en azından kısmen *GDNF* tarafından sağlandığını göstermektedir. Ancak *GDNF* sinyali bozulursa ve trofik destek kaybolursa BCL-2 gibi antiapoptotik bir mekanizmaya ihtiyaç duyulacaktır (21,31).

#### **2.4.3. İmmünolojik Faktörler**

HEK görülen hastalarda, immünolojik aktivite yükselmiştir. Bağırsak aganglionik segmentlerinde majör doku uyumluluk komplekslerinin (MHC) sınıf II antijenlerinin ve ICAM-1'in artan ekspresyonu bu ilişkiyi daha da güçlendirir (32).

#### **2.4.4. Edinsel Nedenler**

Gastrointestinal sistemde nöronların dejenerasyonuna yol açan otoimmün aracılı inflamatuvar enterik nöropati (Chagas Hastalığı) ilk akla gelen edinsel nedendir. Myenterik pleksusta immün infiltrasyona bağlı olarak enterik ganglionların dejeneratif kaybı ile karakterizedir (33,34).

#### **2.5. Patoloji**

Embriyonik dönemde nöral elemanların enterik sistem boyunca göç etmeleri, bağırsak duvarından girip submokoza ve kas tabakaları arasında dağılarak ENS'ye ait ganglion hücrelerini oluşturmalarıyla sonuçlanır. Bu ganglion hücrelerinin yokluğu HH'deki temel patolojidir. Bu süreçte nöronal göçün herhangi bir nedenle duraklaması, o segment distalindeki bağırsakların aganglionozisi ile sonuçlanır. Duraklama işlemi ne kadar erken olursa aganglionik segment o kadar uzun olur (1,2).

Ganglion hücrelerinin göçündeki duraklama, bu hücrelerle birleşmesi gereken preganglionik parasempatik liflerde hipertrofi ve hiperplaziye neden olur (35).

HH'de aganglionik segmentte parasempatik ganglion pleksuslarının üçü de yoktur. Aganglionik segment ile ganglionik segment arasında bulunan transizyonel zonda ise ganglion hücreleri vardır; ancak sayıca azdır.

Aganglionik bölgede, kolinerjik ve adrenerjik sinir lifleri sayıca artmış ve hipertroftiktir (1,2,35,36).

Nakazawa-Tanaka ve ark., 2018 yılında yaptıkları çalışmayla, Laminin gibi ECM bileşenlerinin, aganglionik bölgedeki düz kas tabakasında anormal dağılım göstermesinin yanısıra bu anormalliğin aganglionik segmentin proksimaline uzandığını göstermiştir (17). Bir başka çalışmada HH'li olguların aganglionik bağırsaklarındaki Laminin konsantrasyonunun, ganglionik bağırsaklarına oranla anlamlı şekilde yüksek olduğunu, ganglionik dokulardaki konsantrasyonunun ise aynı yaştaki kontrol grubunun bağırsaklarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (37).

HH'nin mevcut tanı ve tedavisi aganglionik segmente odaklanırken, gastrointestinal motor işlev bozukluğunun, cerrahi düzeltilmeden uzun süre sonra bazı hastalarda devam etmesi, bağırsaktaki morfolojik ve fonksiyonel anormalliklerin aganglionik segmentle sınırlı olmadığını gösterir. Bu durum ameliyat sonrası hastada kalan ganglionik bağırsak dokusunun normal olarak innerve olmayabileceğini ve normal bağırsak fonksiyonunu sürdüremeyebileceğini düşündürmektedir (18,38).

Post-operatif morbidite ve mortalite ile ilişkili olabilecek histopatolojik parametreleri belirlemek için tasarlanan, rezeke edilen kolonun ganglionik proksimal sınırını inceleyen çalışmalar mevcuttur. Sonuçta artmış sinir demeti kalınlığı, sinir demetlerinin fokal düzensizliği, miyelinsiz sinir demetleri varlığı ve akut inflamasyon gibi patolojik bulgular suçlanmıştır (38,39). Buna ek olarak HH'ye sahip bireylerin yalnızca cerrahi sınıra komşu sahayı değil, tüm intestinal sistemlerini ilgilendiren patolojilere sahip olma olasılığı akılda tutulmalıdır. Bu bağlamda Laminin-1 alt birimlerinden  $\alpha 1$  ve  $\beta 1$  zincirlerinin nöral krest hücre gelişimi ve göçü ile ilişkisini inceleyen çalışmalar (16-18) konuyu moleküler düzeyde aydınlatmayı amaçlamıştır. Örneğin hem hayvan modellerinde hem insan nöral krest hücreleri üzerinde Laminin  $\beta 1$  zincirini bağlayan 37/67 kDa Laminin reseptörünün (LAMR) varlığını belirleyen bir çalışmanın verileri, aganglionozisli hastalarda bu reseptörün ekspresyonunda azalma ve lokalizasyonunda değişiklik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bu reseptöre bağlanan Laminin  $\beta 1$  analogu (YIGSR) ile in vitro tedavinin, nöral

krest hücre göçünü arttırdığını ortaya koymuştur. Böylece gastrointestinal traktın tam kolonize edilebilmesinin veya aganglionozis uzunluğunun azaltılmasının mümkün olduğu öne sürülmüştür (18).

Cerrahi ve cerrahi olmayan tedavinin doğru şekilde uygulanabilirliği açısından, HH histopatolojisinin bütüncül bakış açısıyla anlaşılması bir gerekliliktir. Geniş ve karmaşık bu sistemi anlamak için araştırmalar sürmektedir.

## **2.6. Hirschsprung Hastalığında Anatomik Tutulum**

HH çoğunlukla rektosigmoid lokalizasyonda görülür. Literatürde aganglionik segmentin, hastaların %51-81'inde rektosigmoid lokalizasyonla sınırlı olduğu, %10-26'sında rektosigmoid lokalizasyonun daha proksimaline kadar uzandığı ve %3-10'unda ise tüm kolonu kapsadığı bilinmektedir (1,2,11,12,40).

## **2.7. Tanı**

### **2.7.1. Klinik**

HH'nin belirti ve bulguları aganglionik segmentin uzunluğuna ve başvuru zamanına bağlıdır. Temel olarak 3 farklı klinik tablo gözlenir. Bunlardan ilki yenidoğan döneminde görülen intestinal obstrüksiyon tablosu, ikincisi kronik konstipasyon, büyüme ve gelişme geriliği bulguları görülen tablo, sonuncusu ise enterokolit tablosudur (1,2,40,41).

### **2.7.2. Laboratuvar**

HH tanısında kullanılan başlıca tetkikler; ayakta direkt karın grafisi, kolon grafisi, anorektal manometri ve rektal biyopsi şeklinde sayılabilir.

**Rektal Biyopsi:** Tam kat rektal biyopsi HH'nin tanısında altın standarttır. Dentat line'nin 1-3 cm proksimalinden alınan tam kat rektal biyopsi materyalinde Auerbach ve Meissner pleksuslarının görülmemesi (aganglionozis) tanıyı kesinleştirir (1,2,8).

### **2.7.3. Doku Tanısı için Kullanılan Yöntemler**

#### **A. Histopatolojik Tanı (Enzim Histokimyası)**

Enzim histokimyası kullanılarak HH'nin morfolojik tanısı konabilir. Hematoksilin-eozin (H&E), Asetilkolinesteraz (AChE), Laktat dehidrojenaz (LDH), Süksinat dehidrojenaz (SDH), Nitrik Oksit (NO) ve NADPH-Diaforaz

enzimleri kullanılarak histokimyasal boyamalar yapılabilmektedir (42). Boyama sonrası ganglion hücrelerinin ışık mikroskobu altında tanımlanması temeline dayanmaktadır. Hipoganglionozisli olgularda yanlış pozitiflik riski mevcuttur. Boyamanın yorumlanması önemli deneyim gerektirir. Biyopside hipoksi, basınç ile mekanik hasar, diatermi kullanımı, yetersiz fiksasyon gibi nedenlerle artefaktlar oluşabilir. Biyopsi alınan bölgeye göre değişkenlik, çok küçük yaş grubunda submukozanın ganglion hücreleri veya enzim sisteminin immatürasyonu, yorumlanmasının belirli bir uzmanlık düzeyi gerektirmesi patologların işini zorlaştırmaktadır (7,8). Ayrıca HH varyantları (NID, hipoganglionozis, immatür ganglion, internal sfinkter akalazyası ve kronik intestinal psödoobstrüksiyon) ile histopatolojik ayrımının yapılmasında güçlükler mevcuttur. H&E boyaması ganglion hücrelerini tanımlamak için altın standart yöntem olsa da ganglion hücrelerinin tanımlanmasına yardımcı olmak için çok sayıda immünohistokimyasal boyama gündeme gelmiştir (8,43).

## **B. İmmünohistokimyasal Tanı**

Histokimyasal değerlendirmenin yanlış veya yetersiz sonuçlanabileceği durumlarda bağırsak örneklerinin araştırılmasında kullanılmak üzere çeşitli immünohistokimyasal nöronal belirteçleri içerir. Genel olarak, immünohistokimya, spesifik antikör-antijen reaksiyonu kullanılarak çeşitli antijenlerin araştırılması için güçlü bir araçtır. Temel immünohistokimyasal yöntemler, direkt veya indirekt immünofloresan ya da enzim immünohistokimyasıdır (8,43).

Bu bağlamda kullanılan belirteçler 7 farklı grupta toplanmaktadır. Bunlar:

**1) Genel belirteçler** (Nöron Spesifik Enolaz-NSE, Protein gen ürünü 9.5-PGP, Kalretinin, Nöral hücre adezyon molekülü-NCAM, Nöral büyüme faktör reseptörü-NGFR, **Laminin**, **BCL-2**, ...)

### **2) Kolinerjik belirteçler**

### **3) Adrenerjik belirteçler**

**4) Non-adrenerjik, non-kolinerjik belirteçler** (Nitrik oksit sentaz-NOS)

**5) Nöropeptidler** (Vazoaktif intestinal peptid-VIP, Substans P, ...)

**6) Nöronal destek hücre belirteçleri** (S-100 proteini)

## **7) Sinaptik belirteçler** (Sinaptofizin)

Çok sayıda seçenek olmasına rağmen bu çalışmada, BCL-2 ve Laminin immunohistokimyası kullanılmıştır. Bunun sebebi BCL-2 ve Laminin immunohistokimyasal boyalarının kolay ulaşılabilir olması, klinik ve hayvan çalışmalarında son dönemde üzerinde çalışılan, hastalığın patofizyolojisinde rolü olduğu düşünülen moleküller olmalarıdır. Ayrıca anti BCL-2 boyaması, diğer standart boyaların aksine, myenterik ganglionlar içindeki sinir liflerini zayıf boyadığından, sinir hücresi gövdelerinin görüntülenmesi için uygundur (23). Enterik nöronal referans marker olarak Laminin tercih edilmiştir.

Bununla birlikte, Hirschsprung hastalığında nöral ve nöral olmayan antijenlerin immün boyama modellerine ayrılmış çok sayıda çalışmaya rağmen, tek bir antikor veya çoklu antikor paneli oluşturulamamış ve immunohistokimya, HH'nin rutin tanısında henüz genel kabul görmemiştir (7).

İmmunohistokimya çok değerli bir yöntem olarak kullanılma potansiyelinin yanısıra, özellikle genetik analizlerle desteklenerek, aşamalı çalışmaların önemli bir parçası olabilecek, kantitatif veri sunumları sağlayabilecek, HH'nin anlaşılabilmesi, tanınabilmesi, yönetilebilmesi için kaliteli veriler sunabilecek bir yöntemdir.

### **C. Elektron Mikroskopik Çalışmalar**

Bu çalışmalar fazla zaman alır ve numunelerin değerlendirilmesinden önce birkaç prosedür gerektirir. Bu nedenle, HH histopatolojisini doğrulamak için çok fazla tercih edilmez (44).

### **D. Genetik Çalışmalar**

Enzim histokimyasının yetersizliği nedeniyle immunohistokimyasal değerlendirmelere, immunohistokimyanın da özellikle objektif kantitatif veri sunma konusundaki yetersizliği nedeniyle genetik ekspresyon analizlerine ihtiyaç doğmuştur. HH'yi indükleyebilen anahtar genlerin tamamının tanımlanması ve hastalığın şiddetini modüle eden etkileşimlerin anlaşılması hedeflenmektedir (9,45). Kullanılabilecek bazı moleküler/genetik yöntemler Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile mRNA düzeyinde analiz, TUNEL assay ile apoptozis analizi, Western-blot ile protein düzeyinde analiz ve DNA dizi analizi ile mutasyon analizi yöntemleridir. HH şüpheli veya tanılı

bireylerde incelenmesine karar verilen moleküllerin; hızlı, kolay ve maliyet açısından rahat uygulanabilir bir yöntem olan RT-PCR ile dokulardaki mRNA ekspresyonları ölçülerek moleküler düzeyde gen ifadesi değerlendirilebilir. Aynı moleküllerin protein düzeyindeki ekspresyonlarını, maliyeti oldukça yüksek olan Western-blot analizleri ile değerlendirmek mümkündür. Bu hastaların herhangi bir dokularından elde edilen DNA örneklerinden ise Sanger sekans, SSCP, MLPA gibi yöntemlerle çeşitli gen mutasyonları taranabilir. TUNEL assay ise apoptozis değerlendirmesi gibi spesifik bir işleve sahiptir (24-26,31).

## **2.8. Komplikasyonlar**

### **2.8.1. Enterokolit Tablosu**

HEK, HH'nin en ciddi ve potansiyel yaşamı tehdit edici komplikasyonudur. Pre-operatif veya post-operatif dönemde görülebilen; yüksek ateş, sepsis bulguları, bol, kötü kokulu ishal şeklinde dışkılamaya rağmen karında distansiyon, hassasiyet ve direkt grafilerde geniş tabanlı hava sıvı seviyelerinin bulunması ile karakterize intestinal tıkanıklık tablosudur. İntestinal içeriğin stazı, mukozal kan dolaşımının bozulmasına ve bakteriyel translokasyona yol açarak enterokolit oluşumuna neden olur (1,2,5,9).

HEK hem ganglionik hem de aganglionik segmentlerde görülür (1-5,10,11). Tedavi edilmezse toksik megakolona ve kolon perforasyonuna neden olabilir (4,11).

HEK sıklığının %17-50 arasında olduğuna dair farklı yayınlar bildirilmiştir. Bunun ana nedeni tanıda farklı kriterlerin kullanılmış olmasıdır. HH'nin cerrahi tedavisi sonrası HEK sıklığı %5-35 civarındadır. Erken post-operatif dönemde veya daha sonra görülebilir. Sendromik hastalarda sıklığın daha fazla olduğu düşünülmektedir. Erken ve doğru tanı, uzamış ve sorunlu hastane yatışlarının önüne geçebilir (5,9,11,40).

HEK tedavisinde ciddi başarı sağlanmış olsa da hala önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. HEK geçiren hastaların tıbbi yönetimi, geçirmeyen HH'li olgulara göre 2,5 kat daha maliyetlidir (46).

HEK gelişiminde etkili olduğu düşünülen genel risk faktörleri; uzun segment HH, cinsiyet, genetik faktörler-aile öyküsü, başta Down sendromu

olmak üzere ek anomaliler-sendromlar, uzun segment hastalık, aşamalı operasyonlar, operasyon tipi, mekanik nedenler, defonksiyone stoma şeklinde tanımlanmıştır (9,47,48).

Günümüzde HEK etiyojisi net olarak aydınlatılamamıştır. Deneysel kanıtlara dayalı birkaç hipotez önerilmiştir. Bunlar; bağırsak mikrobiyotasının değişimi, mukozal bariyer fonksiyon bozulması, doğal immun yanıtın değişmesi ve bakteriyel translokasyondur (46).

Literatürde Laminin ve BCL-2'nin HEK ile ilişkisini açıklayan bir çalışma yoktur. Bu çalışma Hirschsprung hastalarında Laminin ve BCL-2'nin hem aganglionik hem de ganglionik bağırsak segmentlerindeki ekspresyonunda saptanan değişikliklerin, ENS üzerine olan etkilerini değerlendirmektedir. ENS'deki bu değişimlerin HEK gelişiminde rol oynayıp oynamadığı sorusuna cevap aramak hedeflemektedir.

Tanısı hususunda fikir uyuşmazlıkları olabilen bu klinik tablo için 1995 yılında bir grup araştırmacı tarafından "Delphi analizi" yapılmış, HEK tanısı için bir skorlama sistemi tanımlanmıştır (Pastor Skorlaması). Tablo-1'de belirtilen öykü, fizik muayene, radyoloji ve laboratuvar özelliklerinden pozitif olanların karşılıklarında yazan skorların toplamı 10 ve daha fazla ise HEK kabul edilmesi uygun bulunmuştur (10,11).

**Tablo-1:** HEK Tanısında kullanılan klinik skorlama sistemi (Pastor Skorlaması)  
(10,11)

<b>HH ilişkili enterokolit</b>	<b>Skor</b>
<b>Öykü</b>	
Patlar tarzda diyare	2
Pis kokulu diyare	2
Kanlı ishal	1
Daha önce HEK öyküsü	1
<b>Fizik muayene</b>	
Distansiyon	2
RT sonrası patlar gaz ve gaita çıkışı	2
Peripheral perfüzyon bozukluğu	1
Ateş	1
Letarji	1
<b>Radyoloji</b>	
Multipl hava-sıvı seviyeleri	1
Dilate luplar	1
Mukozada testere dişi görüntüsü	1
Rektosigmoid alanda Cut-off işareti	1
Pnömotozis	1
<b>Laboratuvar</b>	
Lökositoz	1
Sola kayma	1
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>
<b>HEK</b>	<b>&gt;10</b>



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Gereç

Uludağ Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 8 Haziran 2022 tarih ve 2022-12/7 no'lu kararı ile uygun bulunan bu tez çalışması için Bursa Uludağ Üniversitesi Proje Süreçleri Yönetim Sistemi (BAPSİS) üzerinden Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine, Lisansüstü Tez Projesi başvurusunda bulunulmuştur. TTU-2022-847 numaralı proje Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 27 Haziran 2022 tarihinde onaylanmış, 1 Temmuz 2022 tarihinde resmi olarak proje işlemleri başlatılmıştır. Mevcut tez çalışmasında immunohistokimyasal analizler Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (AD)'nda, moleküler genetik analizler ise Tıbbi Biyoloji AD'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sırasında bu anabilim dallarında bulunan ve mevcut çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanılan malzemeler listelenmiştir.

#### 1.1. Kullanılan Cihazlar

- Işık Mikroskopu (Olympus CX 31, ABD)
- İmmunohistokimya Boyama Cihazı (Ventana Benchmark Ultra, Fransa)
- Kapama Cihazı (Sakura/Tissue-Tek Film Kapama Cihazı, Hollanda)
- Mikrotom (Thermo/Shandon Finesse, İngiltere)
- Yerli Su Banyosu Cihazı (Türkiye)
- Etüv Cihazı (Nüve, Türkiye)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- -80°C Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -20°C Derin Dondurucu (Bosch, Türkiye)
- UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)
- Class II Laminar Flow Steril Kabin (Labogene, Danimarka)
- StepOnePlus™ System Real-Time PCR (Applied Biosystems, ABD)

- Plate Santrifüj (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter, ABD)
- Thermal Cyclers (Bio-Rad, ABD)

## 1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Monoklonal Antikor, BCL-2; Klon 124, (Novocastra, ABD)
- Monoklonal Antikor, Laminin Ab-1 (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- UltraView Universal DAB Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Etanol (Sigma Aldrich, ABD)
- İzopropanol (Sigma Aldrich, ABD)
- HİBRİGEN DNA Mini Kit (Hibrigen, Türkiye)
- Omega Bio-tek RNA Kit (Omega Bio-tek, ABD)
- MicroAmp™ Optical 96-Well (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- TaqMan® Primer Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- TaqMan® Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- 10 µl, 200 µl ve 1000 µl Steril Pipet Ucu (Isolab, Almanya)
- 1.5 ml ve 0.75ml ve 0.2 Steril Eppendorf Tüp (Isolab, Almanya)

## 2. Yöntem

### 2.1. Hasta Seçim Kriterleri

Mevcut tez çalışmasındaki hasta grubu; Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniği'nde opere olmuş, histopatolojik olarak tanı konmuş olan 20 Rektosigmoid Hirschsprung hastası ve kontrol grubu olmak üzere, Hirschsprung dışı bir nedenle bağırsak rezeksiyonu yapılmış 10 hastadan oluşmaktadır. HH grubunda yer alan hastalar; 10'u post-operatif HEK geçirmiş (HEK+), 10'u HEK geçirmemiş (HEK-) olan hastalardan seçilmiştir. HEK değerlendirmesi Pastor skorlaması baz alınarak yapılmıştır.

Uygun boyanabilme özellikleri ve sağlıklı veri sağlama açısından, histopatolojik preparatların yaşı 10 yıl olacak şekilde seçim yapılmıştır.

Örnekleme hesaplaması G Power programı ile yapılmıştır. Güç 0.8, alfa (yanılma payı) 0.05 ve etki büyüklüğü 0.45 (orta) alındığında gerekli olan

örneklem sayısı 48 olarak bulunmuştur (31). Bu bağlamda 20 Hirschsprung Hastasının aganglionik (G-) ve ganglionik(G+) olacak şekilde ikişer bağırsak segmenti (toplam 40) ile Hirschsprung dışı nedenle opere olmuş 10 hastanın tek bağırsak segmenti alınarak toplamda 50 preparat incelenmiştir.

HH grubuna ait G+ ve G- dokuların kendi aralarında ve kontrol grubu ile aralarında yapılan değerlendirmede BCL-2 ve Lamininin, HH etyolojisindeki rolünü değerlendirmek amaçlanmıştır.

HEK+ ve HEK- grupların cerrahi sonrası hastada bırakılan G+ dokularının karşılaştırılarak incelenmesi ile BCL-2 ve Lamininin, post-operatif dönemde gelişen HEK etyolojisindeki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Bu incelemede G- dokular devre dışı bırakılmıştır.

Çalışmada verileri toplanan HH grubu hastaları; “H1, H2, ..., H19, H20” şeklinde, kontrol grubu hastaları “K1, K2, ..., K9, K10” şeklinde numaralandırılmıştır. H1-H10 numaralı hastalar HEK+, H11-H20 numaralı hastalar HEK- grupta yer almaktadır.

#### **Çalışmaya dahil edilme kriterleri şu şekilde belirlenmiştir:**

##### **HH grubu için;**

- Rektosigmoid Hirschsprung hastalığı nedeniyle opere olmuş ve tanısı histopatolojik olarak konmuş olmak
- Operasyon sırasında 0-18 yaş arasında olmak
- Post-operatif takipli olmak
- Son 10 yıl içerisinde opere olmuş olmak
- **HEK+ hasta grubu için:** Post-operatif takipte en az 1 kez enterokolit atağı geçirmiş olmak
- **HEK- hasta grubu için:** En az 2 yıldır enterokolit açısından post-operatif takipli olmak ve bu sürede enterokolit atağı geçirmemiş olmak

##### **Kontrol grubu için;**

- 0-18 yaş arasında olmak
- Hirschsprung dışı bir nedenle kolonik rezeksiyon geçirmiş olmak
- Malignite, anal atrezi, intestinal atrezi ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları dışı bir nedenle opere olmuş olmak

Çalışmada, belirlenen hastaların patoloji arşivinde bulunan parafinize kalın bağırsak dokuları retrospektif olarak hem immunohistokimyasal boyamalarla protein düzeyinde hem de PCR, SSCP ve DNA dizi analizleri ile DNA ve RNA ekspresyonu düzeyinde değerlendirildi.

## **2.2. Parafinize Doku Materyalinin Temini ve İmmünohistokimyasal Boyama**

**Deney Sürecinde Kullanılan Parafinize Doku Örnekleri:** Toplamda 30 hastaya ait 50 adet patoloji materyali uzman patalog tarafından incelenerek çalışmaya dahil edildi.

Üniversitemiz patoloji laboratuvarında HH tanısı için H&E boyası yanında Kalretinin, Sinaptofizin, CD-117 ve S-100 immun boyaları ile hasta sonuçları doğrulanmaktadır. Bu çalışmada benzer yöntemlerle tanı konmuş hastaların parafin blokları arşivden çıkarılıp her bir antikor için uygun protokolle deneme yapıldıktan sonra tüm hastalara uygun immunohistokimyasal boyama yapıldı.

**İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:** Her numune için uygun etiketler basıldıktan sonra mikrotom cihazı kullanılarak numunelerden 2-3 µ (mikron) kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon, numunelerin 60°C etüvde 2 saat inkübe edilmesiyle sağlandı. Antikorlar uygun şekilde hazırlandı. Numuneler immunohistokimyasal boyama için cihaza (Ventana Benchmark Ultra, Fransa) yerleştirildi.

BCL-2 ve Laminin için aşağıda anlatılan protokoller uygulandı.

**BCL-2 için Uygulanan Protokol:** Hücre iyileştirme için 90 dakika (dk) boyunca CC1 uygulandı. 37°C'de 48 dk Liquid Mouse Monoklonal Antikor BCL-2 (Novocastra, UK) inkübasyonu yapıldı. 100 µl (mikrolitre) Hematoxylin II, 12 dk süreyle arka plan boyaması olarak uygulandı. Son basamakta 4 dk süreyle 100 µl Bluing reagent uygulandı. Boyaması tamamlanan preparat Ksilen kullanılarak film ile kapatıldı.

**Laminin için Uygulanan Protokol:** Protease 1 enzimi 8 dk süreyle uygulandı. 37 °C'de 32 dk Laminin Ab-1 antikorunu (Thermoscientific, ABD) inkübasyonu yapıldı. 100 µl Hematoxylin II, 12 dk süreyle arka plan boyaması olarak uygulandı. Son basamakta 4 dk süreyle 100 µl Bluing reagent

uygulandı. Boyaması tamamlanan preparat Ksilen kullanılarak film ile kapatıldı. Preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

### **2.3. İmmunohistokimyasal Boya Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Laminin ve BCL-2 immunohistokimyası ile boyanma sonuçları değerlendirilirken bağırsak dokusuna ait preparatların Auerbach ve Meissner plexuslarını içeren sinir kesitleri uzman patolog tarafından incelendi.

BCL-2 pozitif boyanma, ganglion hücrelerinin sitoplazmik boyanması olarak tanımlandı. Wang ve ark.'nın (49) yaptıkları çalışmada belirlenen kriterlere göre dokuların BCL-2 antikoru ile boyanma değerleri 0 ile +3 arasında skorlanarak değerlendirildi. 0: Negatif, boyanma yok; 1+: Hafif derecede boyanma (1-2 ganglion hücresi ve/veya soluk sarı); 2+: Orta derecede boyanma (3-5 ganglion hücresi ve/veya koyu kahverengi); ve 3+: Şiddetli boyanma (> 6 ganglion hücresi ve/veya koyu kahverengi) olarak değerlendirildi. Laminin immunohistokimyasal boyanmasında, Auerbach ve Meissner plexusunu çevreleyen bazal membran boyanması değerlendirildi. Boyanma yoğunluğuna göre 0: Negatif, boyanma yok; 1+: Hafif derecede boyanma; 2+: Orta derecede boyanma; 3+: Şiddetli boyanma olarak değerlendirildi.

Her iki immunohistokimyasal boya için de +2 ve +3 boyanma yoğunlukları tek bir grupta toplanarak güçlü pozitif / şiddetli boyanma olarak kabul edildi.

### **2.4. Parafinize Dokudan DNA İzolasyonu**

Mevcut tez çalışması dahilinde mikrotom bıçağıyla dörder kesit halinde 6-8 µ kalınlığında kesilmiş olan parafinize dokular, RNA ve DNA analizi için ayrı eppendorf tüplere alındı. DNA izolasyonu için dokular parafinden arındırıldı. Dokudan DNA izolasyon kiti (Hibrigen, Türkiye) protokolü takip edilerek DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

**Kit Protokolü:** Eppendorf tüpteki dokuların üzerlerine 1000 µl Ksilen eklendi ve 1 dk vortekslendi. Tüpler 14.000 g'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. 1000 µl %100 alkol eklenen tüpler vortekslendikten sonra 14.000 g'de 3 dk santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Örnekler 37°C etüvde 30 dk inkübe edilerek kurutuldu. Takiben doku örnekleri

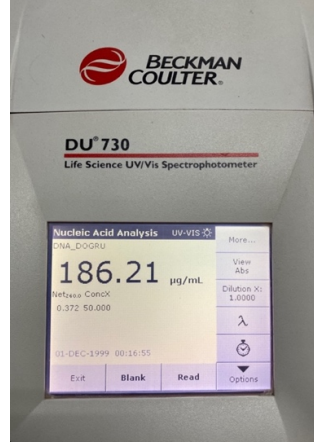
mekanik olarak parçalandı. Üzerine hücreleri parçalamak amacıyla 500 µl DHP lizis tamponu eklendi ve vorteks yardımıyla homojen olana kadar karıştırıldı. Doku içerisindeki proteinleri parçalamak amacıyla 20 µl proteinaz K ve 200 µl DA Tamponu (Proteinaz K tamponu) eklendi ve 65 °C'de 60 dk inkübe edildi. DNA'nın seçici olarak filtreli kolona (filtreli tüp ve içine yerleştiği toplama tüpü) bağlanmasını sağlamak amacıyla örnek üzerine 220 µl kite ait DB Tamponu (bağlanma tamponu) ve 400 µl önceden soğutulmuş etanol (%100) eklendi ve vortekslendi. Homojen hale gelen karışımdan 750 µl alınarak filtreli kolona aktarıldı. 10.900 g'de 1 dk santrifüj edildi. Filtreli kısım çıkarılarak toplama tüpüne süzülen sıvı atıldı. Tüpler tekrar birleştirildi. Homojen karışımın kalan kısmı aynı filtreli kolona aktarıldı ve bir önceki basamak tekrarlandı. 500 µl DY tamponu (yıkama tamponu) filtreli tüplere eklendi ve 10.900 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpüne süzülen sıvı atıldı. Bu aşama tekrarlandı. Filtreli tüp membranının kuruması için hiçbir sıvı eklenmeden 10.900 g'de 3 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü ve içine süzülen sıvı atıldı. Filtreli tüpler 1,5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüpülerine alındı ve direkt membran üzerine 55 µl dH<sub>2</sub>O (60 °C ısıtılmış) eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi ve 10.900 g'de 2 dk santrifüj edildi. Tüpteki izole edilmiş DNA kısa sürede kullanılacak ise +4°C'de, uzun süre sonra kullanılacak ise -20 °C muhafaza edildi.

## **2.5. Spektrofotometre ile DNA Kalite Tayini**

UV-VIS spektrofotometre, elektromanyetik spektrumun ultraviyole ve görünüm aralıklarını ölçmeye yarayan bir cihazdır (Şekil-5). DNA'nın bilinen spektrum aralığı 260 nm'dir. DNA miktarı incelenirken bu aralık kullanılır.

**Spektrofotometre ile Ölçüm:** Hastalardan elde edilen DNA materyallerinin konsantrasyonu spektrofotometrede A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> nm dalga boyunda optik dansitesi (OD) okunarak hesaplandı:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{Sulandırma oranı} \times \text{Katsayı (50)}$$



**Şekil-5:** UV-Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD) cihazında DNA kalitesinin ölçümü esnasında alınan görüntü

## 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir deoksiribo nükleik asit (DNA) zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir tekniktir. İstenen bölgenin çoğaltılması, tek zincirli DNA'ya iki oligonükleotid primerin (forward (F) ve reverse (R)) hibridizasyonu ile başlatılır. Ardından ısıya dayanıklı termal bir bakteriden (*Thermus aquaticus*) izole edilmiş bir polimeraz enzimi olan Taq polimeraz, DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar.

**PCR İşlemi:** *BCL-2*'ye göre primer dizayn edildi (ENST00000333681.5). Ekzon 1 bölgesi protein kodlamadığından, kodlanan bölgeleri içeren Ekzon 2 ve Ekzon 3 bölgeleri analiz edildi. Ekzon 2, baz çifti 1000'in üzerinde olduğu için 1. bölge (E2-1) ve 2. bölge (E2-2) olmak üzere iki bölgeye ayrılarak araştırıldı. Bu ekzonlara ait özellikler Tablo-2'de belirtilmiştir.

**Tablo-2:** *BCL-2* geninin 2. ve 3. ekzonlarına ait primerler ve özellikleri

Ekzon no	Primer	Bağlanma (Annealing) Sıcaklığı (°C)	PCR ürün boyutu (baz çifti cinsinden)
Ekzon 2-1	F: 5' CCTCTTCTTTCTCTGGGGGC 3'	60	567
	R: 5' GACGCTCTCCACACACATGA 3'		
Ekzon 2-2	F: 5' GAACTGGGGGAGGATTGTGG 3'	60	461
	R: 5' GCTTGAGAAACACTGAAGGGG 3'		
Ekzon 3	F: 5' TCATGGCCTCCAAGAGCATT 3'	65	480
	R: 5' TCGACGTTTTGCCTGAAGACT 3'		

*BCL-2* genine ait Ekzon 2 ve Ekzon 3'ün çoğaltılması için Tablo-3'te belirtilen PCR reaksiyonu hazırlandıktan sonra Tablo-4'te belirtilen koşullarda amplifiye edildi.

**Tablo-3:** PCR reaksiyonunun hazırlanması

PCR Reaksiyonu	
Ex Prime Premix	12.5 µl
F primer (10 pmol/µl)	1.25 µl
R primer (10 pmol/µl)	1.25 µl
DNA (50 ng/µl)	3 µl
Distile su	7 µl
Toplam hacim	25 µl

**Tablo-4:** PCR reaksiyonu koşulları

PCR koşulları	
94°C'de 2 dk	} 40 döngü
94°C'de 30 sn	
63°C'de 30 sn	
72°C'de 30 sn	
72°C'de 7 dk	
4°C'de ∞	

## 2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA dizi analizinde incelenmesi planlanan *BCL-2* genine ait ekzonlar PCR ile çoğaltıldıktan sonra kalite tayini yapılır. Ardından reaksiyon sonucu istenen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığının ve primerin non spesifik bir bağlanma yapıp yapmadığının belirlenmesi amacıyla elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülür (Şekil-6).

**Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi:** 2 gr agaroz tartılarak 100 ml 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) içerisinde mikrodalga fırında 3 dk süreyle homojen hale getirildi. İçerisine 2 µl Etidyum bromür eklenerek agaroz jel karışımı hazırlandı. Kuyucuk oluşturmak amacıyla taraklar elektroforez jel dökme tankına sabitlendi. Sıvı, tank içerisine döküldü ve jel hazırlandı. PCR örnekleri, 120 V 30 dk agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Almanya) ile görüntülendi.





**Şekil-6:** Agaroz Jel Elektrofrezisi sürecine ait görüntüler **A)** Deney öncesi hazırlanan ekipmanlar **B)** Agaroz jele PCR örneklerinin yüklenmesi **C)** Elektroferez işlemi için cihazların çalıştırılması **D)** *BCL2* Ekzon 3 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesinin ardından UV altındaki görüntüsü

## 2.8. *BCL-2* Geni için Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP)

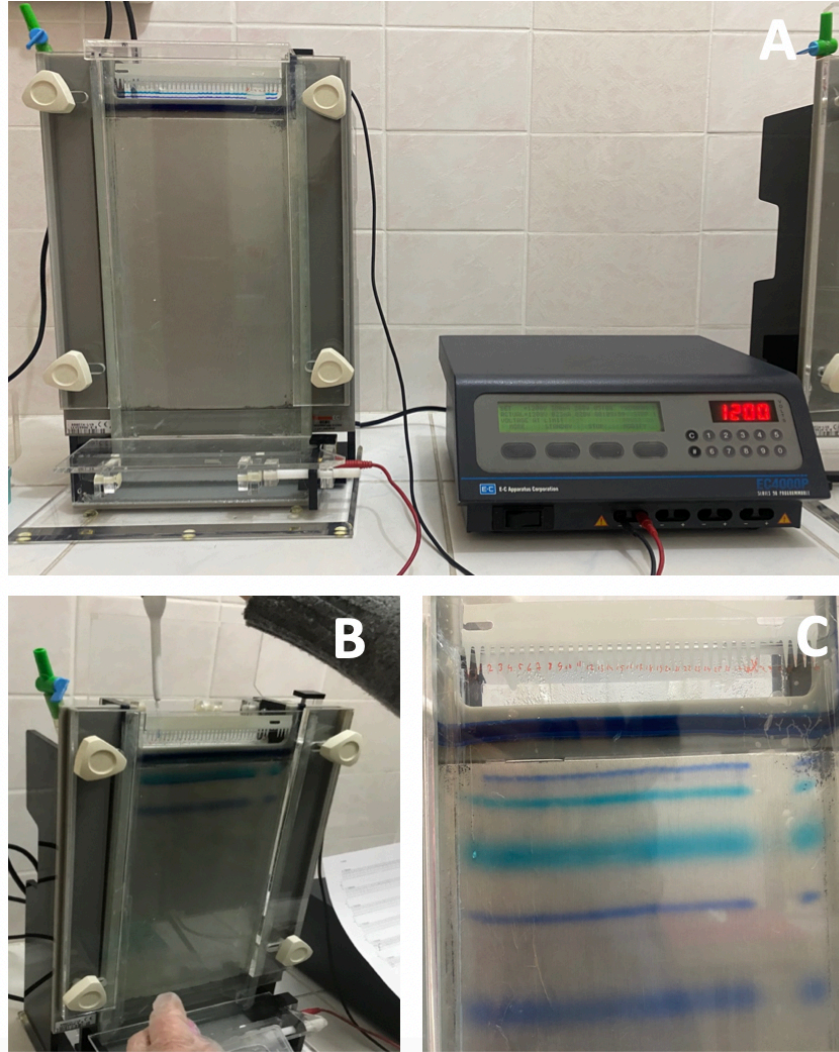
Çalışmamızda *BCL-2* geninin çoğaltılan bölgelerine ait PCR ürünlerinde mutasyon varlığı, ön mutasyon tarama yöntemi olan SSCP analizi ile araştırıldı. SSCP, bir bazlık değişimin dahi dikey elektrofrezde belirlenmesini sağlayan yöntemlerden biridir. Tek iplikli DNA'daki bir değişimin sebep olacağı yeni konformasyona bağlı olarak meydana gelen yürüme farklılığından yararlanır ve mutasyon varlığı konusunda ön bilgi sağlar. Bu sayede DNA dizi analizi öncesi, farklı bant özelliği gösteren örneklerde muhtemel baz değişiklikleri saptanabilir.

**SSCP Yöntemi:** Çoğaltılan çift zincirli DNA, 95°C sıcaklıkta denatüre edilerek, iki ipliğin birbirinden ayrılması sağlandı. İki ipliğin birbirinden ayrı kalabilmesi için örnekler buz içerisinde 5 dk, jele yükleme öncesi ise +4°C'de 5 dk bekletildi.

## 2.9. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması ve PAGE Yükleme

Poliakrilamid jel elektrofrezisi camları alkol ile silindi. Jelin yapıştırmak amacıyla karşılıklı camlara Bind silane (Promage) ve Sigma cote (Sigma) sürüldü. Camlar kapatılarak sabitlendi. Kenarları bantlandı. Poliakrilamid jel

camların arasına dökülerek tarak ters şekilde yerleştirildi. Jel polimerizasyonu amacıyla camlar yatay pozisyonda bir gece bekletildi. Ardından tarak çıkarılıp ters şekilde takıldıktan sonra her bir örneğin yürüyeceği kuyuya 4 µl stop solüsyonu kondu. Tüm örnekler her bir kuyuya 3 µl olacak şekilde yüklendi. 1200 V (12 mA)'ta 8 saat yürütüldü. Bu işlemlere ait görüntüler Şekil-7'de gösterilmiştir.



**Şekil-7: A) Poliakrilamid jelin hazırlanması B) Örneklerin jele yüklenmesi C) Örneklerin jelde yürütülmesi**

## 2.10. Gümüş Boyama

Bu yöntem gümüşün formaldehit ve sodyum karbonat varlığında indirgenmesi, böylece kahverengi görüntü oluşması prensibiyle çalışmaktadır. Normal bant özelliklerinden farklı görüntülere sahip örneklerin mutasyonu

olabileceği öngörülerek, mutasyonun lokalizasyonunun, tipinin ve anlamlılığının tespiti için DNA dizi analizi yapılır.

**Boyama ve Görüntüleme Protokolü:** İstenmeyen kimyasalların uzaklaştırılması ve DNA'nın jel matriksine difüzyonunu engellemek amacıyla %10'luk glasiyel asetik asit ile fiksasyon yapıldı. Jel artıklarının uzaklaştırılması amacıyla deiyonize su ile yıkama yapıldı. Kontrastı ve duyarlılığı artırmak amacıyla 1000 ml %0,3'lük gümüş nitrat çözeltisine 2 ml formaldehit eklenerek boyama yapıldı. 40 dk sonra kısa ve hızlı yıkama ile gümüş boya uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi %3,4'lük sodyum bikarbonat çözeltisiyle ani pH değişimi yaratılarak bantlar görünür hale getirildi. Gümüş tuzlarının uzaklaşması için sodyum karbonat çözeltisine, sodyumtiyosülfat eklendi. Boyama reaksiyonun durdurulması için ise pH değişimi yaratmak amacıyla fiksasyonda kullanılan çözeltiden yararlanıldı. Son aşamada jel deiyonize su ile yıkanarak asitten arındırıldı ve görüntülendi. Mutasyon değerlendirmesi yapıldı.

## **2.11. DNA Dizi Analizi ile Mutasyon Tayini**

### **A. Pürifikasyon Basamağı**

*BCL-2* geninin tüm ekzonlarına ait çoğaltılan gen bölgelerini içeren PCR ürünleri, E.Z.N.A.® Cycle Pure Kiti (Omega Bio-tek, ABD) kullanılarak reaksiyon içerisinde bulunan kimyasallardan arındırıldı. Saf PCR ürünü elde edildi.

**PCR Pürifikasyonu Kit Protokolü:** PCR ürünleri ve üzerlerine eklenen Membrane Binding Solution karışımı filtreli kolona aktarıldı. 14.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünde (kolonun altında) kalan kısım uzaklaştırıldı. Filtreli kolona 700 µl Membrane Wash Solution eklenerek 14.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve kolonlar yıkandı. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Filtreli tüpler 1,5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüplerine aktararak 35 µl dH<sub>2</sub>O eklendi, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 14.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek pürifikasyon ürünleri elde edildi. Pürifikasyon işleminden sonra örnekler %2'lik agaroz jelde 120 V 30 dk yürütüldü ve UV görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Almanya) kullanılarak görüntülendi.

## B. DNA Dizi Analizi

*BCL-2* genine ait DNA dizisinin incelenmesi amacıyla sekans reaksiyonu ve sekans analizi aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

**Sekans Reaksiyonu Yöntemi:** Elde edilen pürifiye PCR ürünlerinde GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kiti (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak sekans reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo-5) ve Tablo-6'da belirtilen PCR koşullarında ürünler amplifiye edildi.

**Tablo-5:** Sekans reaksiyonunun hazırlanması

Sekans Reaksiyonu	
DTCS Quick Start Master Mix	8 µl
F primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
R primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
Pürifiye DNA (50 ng/µl)	0.5-10 µl
Distile su	0-9.5 µl
Toplam hacim	20 µl

**Tablo-6:** Sekans reaksiyonu koşulları

PCR koşulları	
96°C'de 2 dk	} 30 döngü
96°C'de 20 sn	
50°C'de 20 sn	
60°C'de 4 dk	
4°C'de ∞	

**Alkol Uzaklaştırma ve Sekans Analizi Yöntemi:** Sekans reaksiyonu ile elde edilen PCR ürünlerine 2 µl Na-EDTA, 2 µl Na-Asetat, 1 µl Glikojen ve 60 µl %100'lük soğuk EtOH (etanol) eklenerek (-4°C) 14.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjle süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri üzerine 200 µl %70'lik soğuk etanol eklendi ve (-4°C) 14.000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi ve sonuncu alkol uzaklaştırmasından sonra örnekler 37°C'de 2 saat bekletilerek alkolün uçması sağlandı. Örneklerin üzerine 40 µl SLS (Beckman Coulter, ABD) eklenerek örnekler Beckman Sample Plate'e yüklendi ve plaka sekans cihazına (Beckman Coulter

CEQ8000 Genetic Analysis System) yüklendi. Örneklerin DNA dizi analizleri ileri ve geri olmak üzere iki yönlü olarak gerçekleştirildi.

Hastalara ait örneklerin DNA dizi analizleri, *BCL-2* geninin referans dizisi (Ensemble, OMIM, Gen Bank) ile karşılaştırılarak poliakrilamid jelde tespit edilen değişimler analiz edildi.

## 2.12. Parafinize Dokudan RNA İzolasyonu

Mevcut çalışmada *BCL-2* ve *LAMA1* ekspresyonunun mRNA düzeyinde incelenmesi amacıyla öncelikle RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Sonraki aşamada E.Z.N.A.® FFPE RNA Kit (Omega Bio-tek, ABD) protokolü gereği RNA'ların cDNA'ya çevirimleri gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, *BCL-2* ve *LAMA1* primerleri kullanılarak analiz edildi.

**RNA İzolasyonu Kit Protokolü:** Parafinize dokuların bulunduğu eppendorf tüpe 1 ml Ksilol eklendi. 3 dk vortekslenerek dokular parafinden arındırıldı. Örnekler 10.000 g'de 3 dk santrifüje edildi. Süpernatant atıldı. Ksilölü uzaklaştırmak için 1 ml %100 alkol eklenip 10 sn vortekslendi ve 10.000 g'de 3 dk santrifüje edildi. Etanolün uçması için örnekler 30 dk etüvde bekletildi. Önceki basamakla beraber bu işlem tekrarlandı. Dokular mekanik olarak parçalandı. Doku içeren her bir tüpe 200 µl Lysis buffer ve 20 µl proteinaz K karışımından eklenip vortekslendi. Örnekler önce 55 °C'de 30 dk sonra 80°C'de 15 dk inkübe edildi. 300 µl GFC Buffer eklendi ve vortekslendi. Lizis edilen dokular 2 ml'lik DNA Clearance Column'una eklendi. 13.000 g'de 1 dk santrifüje edildi. Santrifüj sonrası oluşan filtrata 675 µl etanol eklendi. İçerisinde presipitat barındırmayan 700 µl örnek, MicroElute LE RNA Column'a aktarıldı. 13.000 g'de 30 sn santrifüje edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem tekrar edildi. 500 µl RNA Wash Buffer eklendi. 13.000 g'de 30 sn santrifüje edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem tekrarlandı. Boş column en yüksek hızda 2 dk santrifüj edildi. MicroElute LE RNA Column, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 55 µl Diethylpyrocarbonate (DEPC) Water column membranının üzerine eklendi. Maksimum hızda 1 dk santrifüje edildi. Elde edilen RNA bir sonraki deney aşamasına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

### 2.13. cDNA (Komplementer DNA) Sentez Aşaması

Total RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

**cDNA Çevrimi için Kit Protokolü:** 2X RT master karışımı soğuk blok üzerinde hazırlandıktan sonra (Tablo-7), 10 µl RNA (2 µg) her bir PCR tüpüne eklenerek pipetaj yapıldı ve 25°C'de 10 dk, 37°C'de 2 saat ve 85°C'de 5 dk thermal cyclus cihazında cDNA çevrim reaksiyonu gerçekleştirildi. Deneyler gerçekleştirilene kadar cDNA'lar -20°C'de saklandı.

**Tablo-7:** Total RNA'dan cDNA sentezlemek için hazırlanan PCR karışımı

RT Master karışımı	
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µL
10X RT Random Primers	2.0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µL	1.0 µL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4.2 µL
Toplam hacim	10.0 µL

### 2.14. mRNA Ekspresyon Analizi

Seçilen genlerin ve bir referans genin mRNA ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi hedeflenir.

**Gen Ekspresyon Analizi Yöntemi:** Genlerinin mRNA ekspresyon analizleri için TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Referans (housekeeping) gen olarak GAPDH (normal şartlarda tüm hücrelerde eksprese olan gen) kullanıldı. Tablo-8 ve 9'da belirtildiği gibi RT-PCR karışımı ve koşulları gerçekleştirildi. RT-PCR analizi TaqMan problu primerler kullanılarak Step One Plus™ Real-Time PCR sisteminde (Applied Biosystems, ABD) analiz edildi (Şekil-8). Elde edilen veriler "RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5." (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) web tabanlı programda  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile değerlendirildi. Araştırılmak istenen genin Ct (eşik döngüsü) değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edildi ve delta Ct ( $\Delta Ct$ ) değeri hesaplandı. Sonrasında kontrol grubunun  $\Delta Ct$  değerleri, HH grubunun  $\Delta Ct$  değerlerinde çıkartılarak  $\Delta\Delta Ct$  değeri bulundu.

Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de Şeklinde hesaplandı. Artan ve azalan ekspresyon değerleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  'nin logaritmik analizi sonucu fold regülasyon değerlerinin  $[\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct} LAMA1)]$  eldesi ile tespit edildi.

**Tablo-8:** mRNA ekspresyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

	20 µl reaksiyon hacmi	
	1 reaksiyon	(n=4)
20X TaqMan® Gen Expression Assay	1 µl	5 µl
2X TaqMan® Gen Expression Master Mix	10 µl	50 µl
cDNA (1-100 ng)	4 µl	20 µl
RNase-free water	5 µl	25 µl

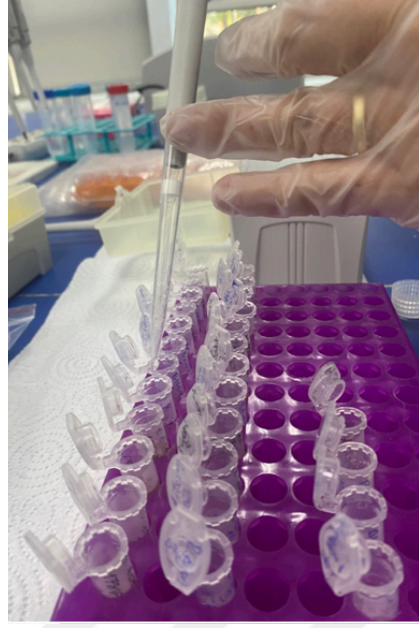
**Tablo-9:** mRNA ekspresyonu için RT-PCR koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz Aktivasyonu / Denatürasyon	50	2 dk
	95	10 dk
Amplifikasyon (40 döngü)	95	15 sn
	60	1 saat



**Şekil-8:** StepOnePlus System Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems, ABD)

Deneyisel işlemler esnasında kaydedilen görüntüler Şekil-9'da sunulmuştur.



**Şekil-9:** Dokudan DNA izolasyonu için gerekli protokoller uygulanırken, pipet yardımıyla dokular üzerine lizis tamponu eklenmesi sürecine ait görüntü

### 2.15. İstatistiksel Analizler

Mevcut çalışmada elde edilen tanımlayıcı istatistiksel analizler (varyans, medyan vb.) ve alınan kantitatif sonuçlara göre istatistiksel değerlendirmelerde, SPSS Statistics Data Editor.v25 paket veri programı kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında elde edilen verilerde aşağıda belirtilen analizler kullanılmıştır;

1. Delta CT analizi (Ekspresyon verilerinin anlamlandırılması)
2. Normalite testleri
3. t testleri (Bağımsız t testi, ANOVA, Mann-Whitney U testi vb.)
4. Ki-kare testi
5. Post hoc test (Tukey)

Tüm test sonuçları %95 güven aralığında  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde kabul edilmiştir. İstatistiksel analizlerin grafiklendirilmesi Graphpad 8 programı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler histogram grafikleri, kutu grafikleri, ısı haritası grafikleri ile sunulmuştur.

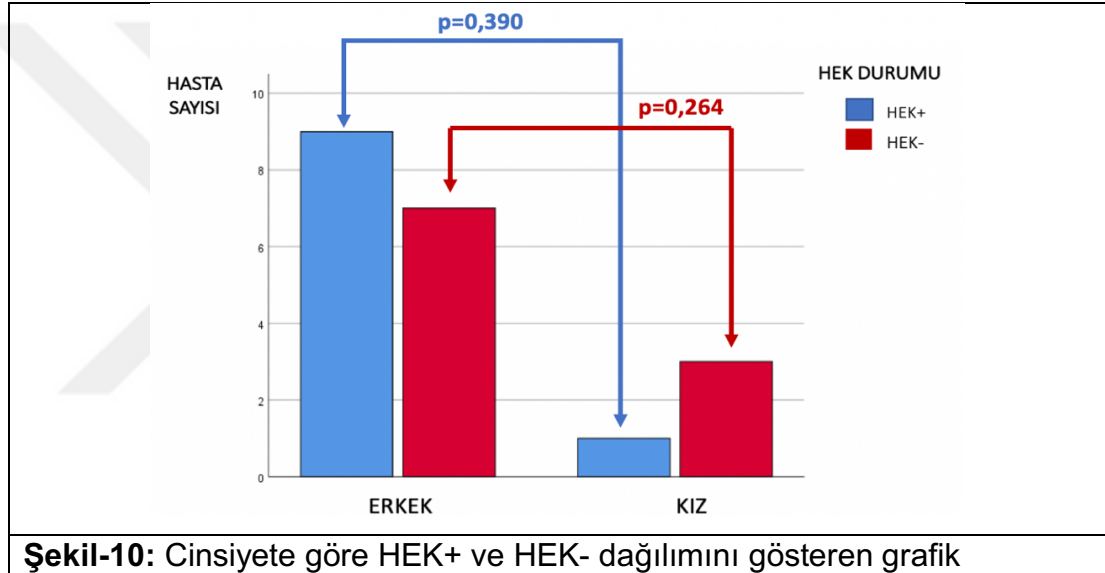
**Isı haritası grafiği:** Sayıların veya sayı değer aralıklarının renklerle ifade edilmesi amaçlanmaktadır. Sayıların renklerle ifade edilmesi sonucunda olası korelasyonların varlığı kolayca tespit edilebilmektedir (50).



## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 20 kişilik HH grubunun 16'sı erkek, 4'ü kızdı. Kontrol grubundaki cinsiyet dağılımı 4 erkek, 6 kız şeklindeydi. HEK+ grubunun 9'u erkek, 1'i kızdı. HEK- grubun 7'si erkek, 3'ü kızdı.

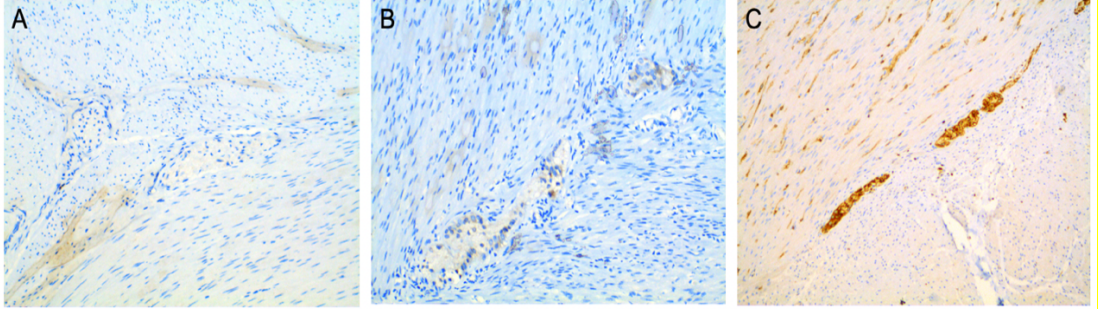
Toplamda 16 HH'li erkek hastanın 9'u, 4 HH'li kız hastanın ise 1'i HEK geçirmişti (Şekil-10). Yapılan analizler sonucunda cinsiyet ve HEK geçirme durumu arasında anlamlı ilişki olmadığı ( $p= 0,264$ ) görüldü.



HH grubunda toplamda 3 Down Sendromlu, 1 Movat-Wilson sendromlu, 1 Cri-du Cat sendromlu hasta yer alıyordu. 1 Down sendromlu hasta hariç tümü HEK geçirmişti. Ancak istatistiksel olarak sendromik olma ve HEK geçirme durumu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ( $p= 0,435$ ).

HEK+ ve HEK- 10'ar kişilik her iki gruba uygulanan ameliyat teknikleri eşdeğer olmadığı için tekniğe yönelik bir istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. (Toplam 12 TERPT, 4 Laparotomi / Laparoskopi yardımcı TERPT, 3 Soave, 1 Myektomi uygulandı.)

**A. İmmunohistokimyasal Çalışma Bulguları:** Mevcut çalışmadaki patoloji preparatlarının, BCL-2 immunohistokimyası ile boyanma sonuçları Şekil-11'te gösterildiği gibi kategorizasyon yapılarak değerlendirildi.



**Şekil-11:** BCL-2 immunohistokimyası **A)** G- dokuda negatif boyanma (x200), **B)** G+ dokuda hafif boyanma (x200), **C)** G+ dokuda şiddetli boyanma (x200)

BCL-2 immunohistokimyası ile boyanma özellikleri bakımından değerlendirildiğinde HEK+ grubun, G+ dokularına yönelik incelemede 9 hastanın hafif (Şekil-11B), 1 hastanın şiddetli (Şekil-11C) boyandığı görüldü. Aynı gruptaki tüm hastaların G- dokularının negatif (Şekil-11A) boyanma özelliği gösterdiği tespit edildi.

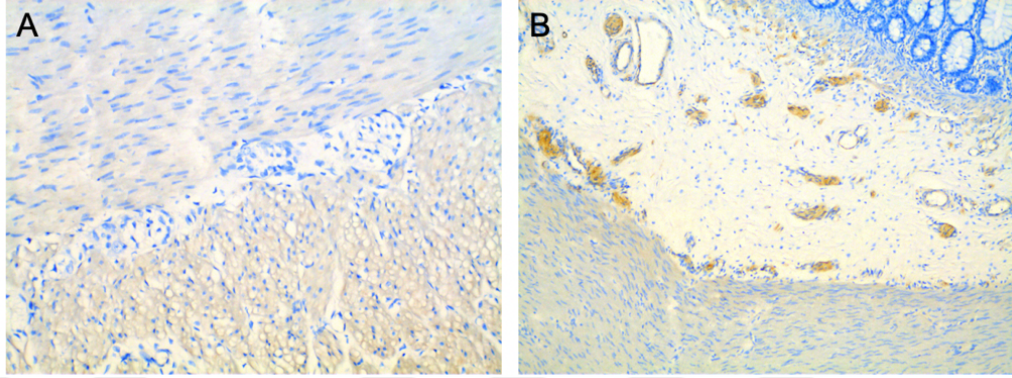
HEK- grubun, G+ dokularına yönelik incelemede 6 hastanın hafif (Şekil-11B), 4 hastanın şiddetli (Şekil-11C) boyandığı görüldü. Aynı grubun G- dokuları incelendiğinde 1 hasta hafif boyanırken, 9 hasta negatif (Şekil-11A) boyanma özelliği gösterdi.

Kontrol grubuna ait bağırsak dokuları incelendiğinde ise 9 hastanın hafif, 1 hastanın şiddetli boyandığı görüldü.

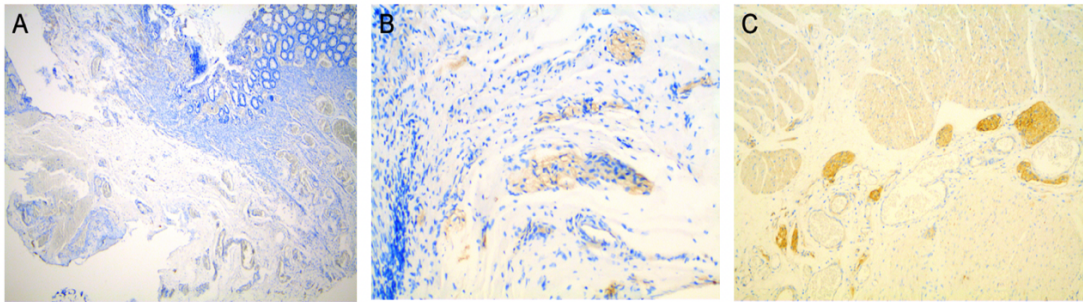
Hirschsprung hastalarının BCL-2 immunohistokimyasındaki boyanma özelliklerine göre yapılan değerlendirmede G+ dokular anlamlı düzeyde pozitif boyanma özelliği (pozitif boyanan hastalar = hafif boyanan ve şiddetli boyanan hastaların tümü) gösterirken, G- dokular boyanmadı ( $p \leq 0,001$ ).

BCL-2 immunohistokimyası ile boyanma özelliklerine göre HEK+ ve HEK- grupların, G+ bağırsak dokularında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ( $p = 0,153$ ). Bu iki grubun G+ bağırsak dokularının boyanma özellikleri, kontrol grubu ile farklılık göstermedi ( $p = 1$  ve  $0,121$ ).

Mevcut çalışmada patoloji preparatlarının incelenmesi ile elde edilen Laminin immunohistokimya boyamasının sonuçları ise Şekil-12 ve 13'te gösterildiği gibiydi.



**Şekil-12:** Laminin immunohistokimyası **A)** G+ dokuda Negatif boyanma (x200), **B)** G+ dokuda Hafif boyanma (x200)



**Şekil-13:** Laminin immunohistokimyası **A)** G- dokuda negatif boyanma(x100), **B)** G- dokuda hafif boyanma (x200), **C)** G- dokuda şiddetli boyanma (x200)

Laminin immunohistokimyası ile boyanma özellikleri bakımından HEK+ grubun G+ dokuları incelendiğinde 6 hastanın negatif (Şekil-12A), 3 hastanın hafif (Şekil-12B), 1 hastanın şiddetli boyandığı görüldü. Aynı grubun G- dokuları incelendiğinde 2 hastanın negatif (Şekil-13A), 5 hastanın hafif (Şekil-13B), 3 hastanın şiddetli (Şekil-13C) boyandığı görüldü.

HEK- grubun G+ dokularına yönelik incelemede 8 hastanın negatif (Şekil-12A), 2 hastanın hafif (Şekil-12B) boyanma özelliği gösterdiği görüldü. Bu grubun G- dokularınının 3'ü negatif (Şekil-13A), 6'sı hafif (Şekil-13B), 1'i şiddetli (Şekil-13C) boyandı.

Kontrol grubuna ait bağırsak dokularından 5'i hafif, 5'i negatif boyandı.

Hirschsprung hastalarının Laminin immunohistokimyasındaki boyanma özelliklerine göre yapılan değerlendirmede G- dokular anlamlı düzeyde pozitif boyanma özelliği gösterirken, G+ dokuların çoğu negatif ve bir kısmı da hafif boyanma özelliği gösterdi (p<0,016).

Laminin immunohistokimyası ile boyanma özelliklerine göre HEK+ ve HEK- grupların, G+ bağırsak dokularında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (p = 0,541). Bu iki grubun G+ bağırsak dokularının boyanma özellikleri, kontrol grubu ile farklılık göstermedi (p = 0,451 ve 0,160).

**B. Genetik Analiz Sonuçları:** Yapılan Real-Time PCR analizleri sonucunda, dokulardaki *LAMA1*, *BCL-2* ve bunların ekspresyonunun tayininde kontrol ifade geni olarak kullanılan *GAPDH*'in Ct değerleri ve bu değerlerin delta-delta Ct metodu ile logaritmik ekspresyon ölçüm verileri Tablo-10'da sunulmuştur.  $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct_{BCL-2}})$  ve  $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct_{LAMA1}})$  şeklindeki fold analizi sonuçlarından, negatif olan değerler ilgili gene ait ekspresyondaki azalmayı, pozitif değerler ekspresyondaki artışı ifade eder.

**Tablo-10:** HH ve kontrol grubunun incelenen doku özellikleri ve *GAPDH*, *BCL-2*, *LAMA1* gen ekspresyonlarına ait Ct değerleri ile bu genlerin ifadesini belirten logaritmik fold regülasyon analiz sonuçları.

Hasta No	Doku Özelliği	<i>GAPDH</i>	<i>BCL-2</i>	<i>LAMA1</i>	$\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct_{BCL-2}})$	$\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct_{LAMA1}})$
H1	HEK+,G+	31,93	32,78	28,47	-2,97	4,471
H2	HEK+,G+	32,25	34,11	33,36	-3,97	-0,099
H3	HEK+,G+	32,18	32,05	36,97	-1,98	-3,779
H4	HEK+,G+	34,18	30,8	34,17	1,27	1,021
H5	HEK+,G+	31,93	32,48	28,59	-2,66	4,351
H6	HEK+,G+	31,26	30,15	34,36	-1,00	-2,089
H7	HEK+,G+	30,88	31,46	32,66	-2,69	-0,769
H8	HEK+,G+	29,68	32,74	33,68	-5,17	-2,989
H9	HEK+,G+	30,38	30,53	33,48	-2,26	-2,089
H10	HEK+,G+	34,97	30,53	34,85	2,33	1,131
H1	HEK+,G-	31,43	33,36	30,46	-4,04	1,981
H2	HEK+,G-	29,21	30,26	33,4	-3,16	-3,179
H3	HEK+,G-	30,18	29,97	28,67	-1,90	2,521
H4	HEK+,G-	30,88	30,33	34,4	-1,56	-2,509

<b>H5</b>	HEK+,G-	31,45	35,65	36,61	-6,31	-4,149
<b>H6</b>	HEK+,G-	31,82	31,04	33,13	-1,33	-0,299
<b>H7</b>	HEK+,G-	35,18	31,64	34,25	1,43	1,941
<b>H8</b>	HEK+,G-	31,93	33,97	28,55	-4,15	4,391
<b>H9</b>	HEK+,G-	32,89	29,62	29,01	1,16	4,891
<b>H10</b>	HEK+,G-	30,89	31,18	36,96	-2,40	-5,059
<b>H11</b>	HEK-,G+	34,69	32,57	31,81	0,01	3,891
<b>H12</b>	HEK-,G+	29,89	29,78	31,16	-2,00	-0,259
<b>H13</b>	HEK-,G+	34,09	32,23	35,7	-0,25	-0,599
<b>H14</b>	HEK-,G+	30,43	31,02	31,98	-2,70	-0,539
<b>H15</b>	HEK-,G+	35,87	34,37	32,76	-0,61	4,121
<b>H16</b>	HEK-,G+	29,36	31,69	28,96	-4,44	1,411
<b>H17</b>	HEK-,G+	28,95	31,97	28,58	-5,13	1,381
<b>H18</b>	HEK-,G+	30	32,3	28,55	-4,41	2,461
<b>H19</b>	HEK-,G+	33,57	32,64	32,41	-1,18	2,171
<b>H20</b>	HEK-,G+	34,14	30,4	28,71	1,63	6,441
<b>H11</b>	HEK-,G-	34,32	33,12	31,18	-0,91	4,151
<b>H12</b>	HEK-,G-	32,51	30,43	36,5	-0,03	-2,979
<b>H13</b>	HEK-,G-	34,28	33,69	33,1	-1,52	2,191
<b>H14</b>	HEK-,G-	31,01	28,96	33,19	-0,06	-1,169
<b>H15</b>	HEK-,G-	33	32,7	28,46	-1,81	5,551
<b>H16</b>	HEK-,G-	29,9	32,93	33,47	-5,14	-2,559
<b>H17</b>	HEK-,G-	31,43	31,23	31,53	-1,91	0,911
<b>H18</b>	HEK-,G-	29,94	30,84	28,66	-3,01	2,291
<b>H19</b>	HEK-,G-	35,02	34,83	33,65	-1,92	2,381
<b>H20</b>	HEK-,G-	27,94	30,78	31,42	-4,95	-2,469
<b>K1</b>	Kontrol	27,98	29,28	33,17	7,618	-4,179
<b>K2</b>	Kontrol	31,81	28,65	37	3,158	-4,179
<b>K3</b>	Kontrol	30,76	31,02	34,99	6,578	-3,219
<b>K4</b>	Kontrol	34,01	29,52	28,61	1,828	6,411
<b>K5</b>	Kontrol	34,09	31,55	32,13	3,778	2,971
<b>K6</b>	Kontrol	32,62	29,2	32,14	2,898	1,491
<b>K7</b>	Kontrol	32,07	29,37	32,48	3,618	0,601
<b>K8</b>	Kontrol	31,16	31,24	33,71	6,398	-1,539
<b>K9</b>	Kontrol	29,19	29,68	33,42	6,808	-3,219
<b>K10</b>	Kontrol	37,08	30,2	33,23	-0,562	4,861

HEK+ grubun G+ dokuları ve G- dokuları, HEK- grubun G+ ve G- dokuları ile kontrol grubu dokularından oluşan toplamda beş ayrı doku grubu karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

*BCL-2* mRNA ekspresyonu düzeylerinin, HEK+ ve HEK- tüm çocukların yalnızca G- bağırsak dokularında değil, G+ bağırsak dokularında da kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi ( $p < 0,0001$ ).

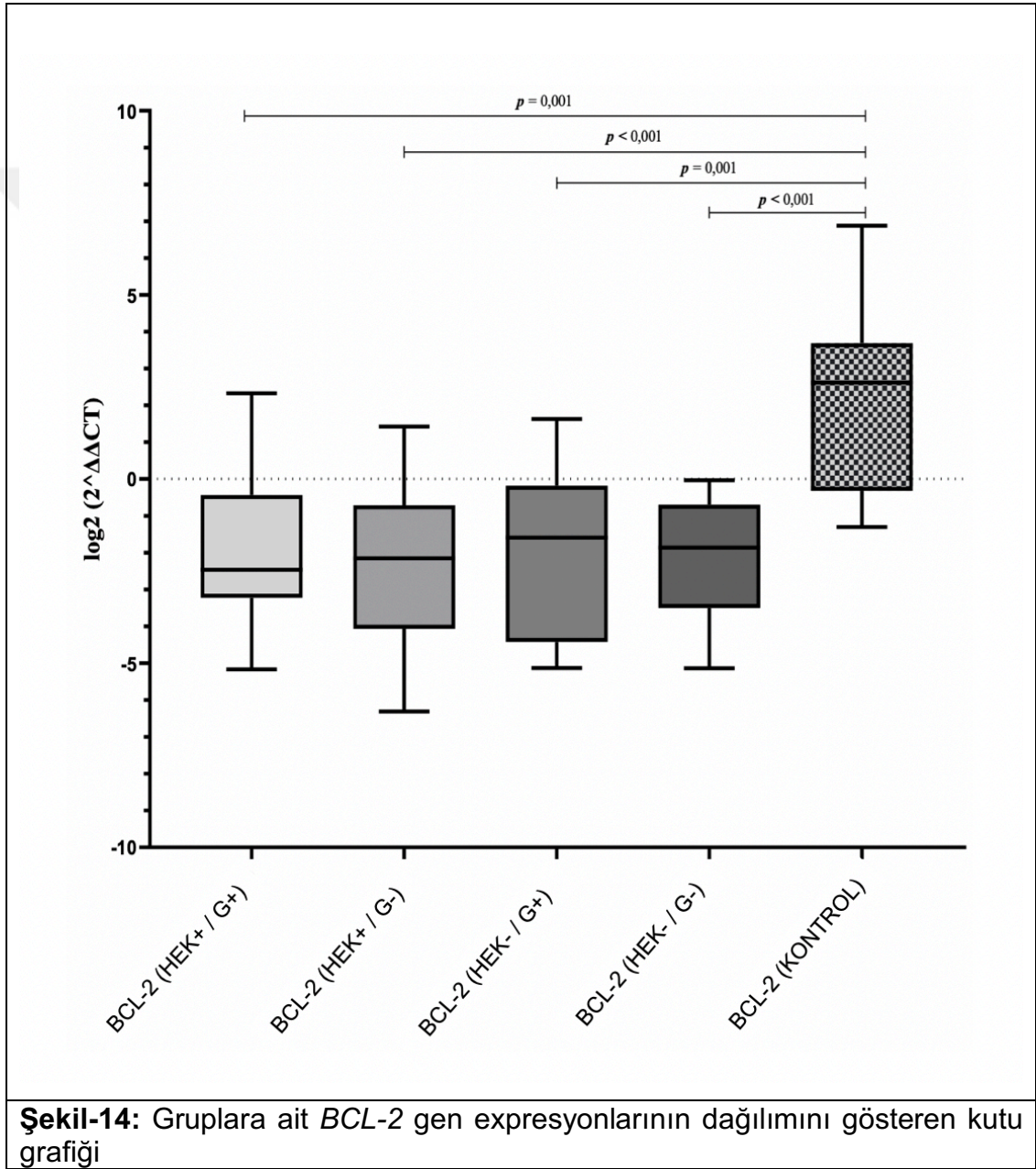
*BCL-2* mRNA ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırma sonuçları Tablo-11'de, p değerleri ile birlikte sunulmuştur ( $p < 0,05$  anlamlı kabul edilmiştir).

**Tablo-11:** *BCL-2* ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılıklarının anlamlılıklarını değerlendirmek üzere yapılan t testlerinin (ANOVA) analiz sonucu

Tek Yönlü Anova				
Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	95%'lik Güven Aralığındaki Dağılım	Anlamlılık	P Değeri
<i>BCL-2</i> (HEK+ / G+) <i>BCL-2</i> (KONTROL)	-6,122	-10,12 / -2,125	Evet	0,0001
<i>BCL-2</i> (HEK+ / G-) <i>BCL-2</i> (KONTROL)	-6,438	-10,43 / -2,441	Evet	<0,0001
<i>BCL-2</i> (HEK- / G+) <i>BCL-2</i> (KONTROL)	-6,12	-10,12 / -2,123	Evet	0,0001
<i>BCL-2</i> (HEK- / G-) <i>BCL-2</i> (KONTROL)	-6,338	-10,33 / -2,341	Evet	<0,0001
<i>BCL-2</i> (HEK+ / G+) <i>BCL-2</i> (HEK- / G+)	-0,002	-3,999 / 3,995	Hayır	>0,9999
<i>BCL-2</i> (HEK+ / G+) <i>BCL-2</i> (HEK+ / G-)	0,316	-3,681 / 4,313	Hayır	>0,9999
<i>BCL-2</i> (HEK+ / G-) <i>BCL-2</i> (HEK- / G-)	-3,056	-7,053 / 0,9410	Hayır	0,2931
<i>BCL-2</i> (HEK- / G+) <i>BCL-2</i> (HEK- / G-)	0,218	-3,779 / 4,215	Hayır	>0,9999

HEK+ ve HEK- grubun G+ ve G- dokuları arasındaki *BCL-2* mRNA ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi. Ancak HEK+ grubun G+ dokularında ortalama *BCL-2* ekspresyon seviyesi, G- dokulardaki seviyeye kıyasla bir miktar düşük belirlendi. Bunun aksine HEK- grupta G- dokulardaki ortalama ekspresyon seviyesi, G+ dokularından bir

miktar daha düşüktü. HEK+ hastaların G+ bağırsak dokuları ile HEK- olanların G+ dokuları arasında *BCL-2* ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülme de HEK+ grubun ekspresyon düzeylerinin ortalamasının, HEK- gruba kıyasla bir miktar düşük olduğu belirlendi. Şekil-14'te gruplara ait ekspresyon değerlerinin dağılımını (maksimum, minimum, ortalama değerler vb.) ifade eden kutu grafiği sunulmuştur.



Yapılan analizlerde *LAMA1* mRNA ekspresyonu düzeyleri açısından gruplar arası anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bu değerlendirme için yapılan analiz sonuçları Tablo-12'de verilmiştir.

**Tablo-12:** *LAMA1* ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılıklarının anlamlılıklarını değerlendirmek üzere yapılan t testlerinin (Anova) analizleri (p>0,05)

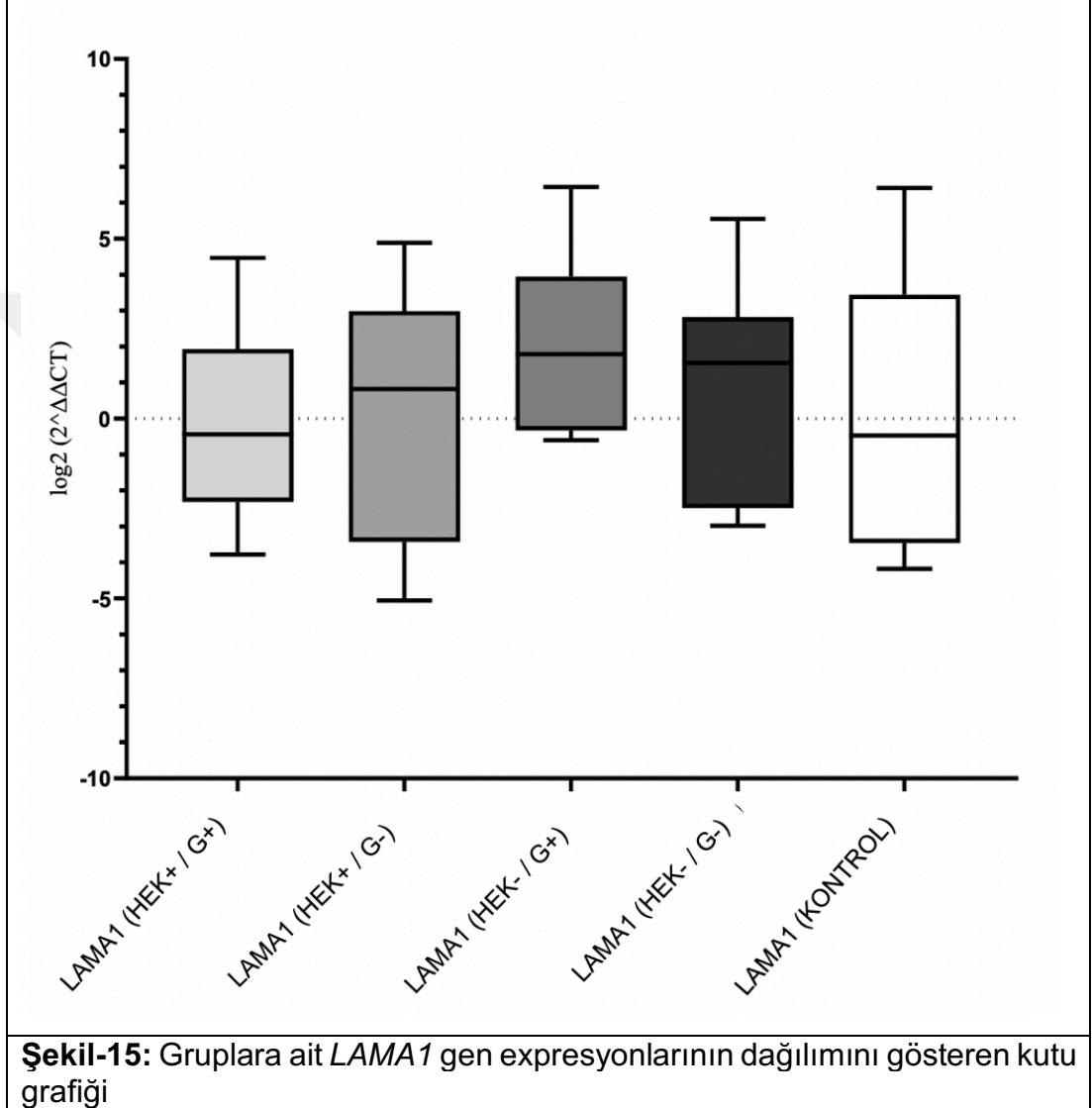
Tek Yönlü Anova				
Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	95%'lik Güven Aralığındaki Dağılım	Anlamlılık	P Değeri
<i>LAMA1</i> (HEK+ / G+) <i>LAMA1</i> (KONTROL)	-0,084	-4,081 to 3,913	Yok	>0,9999
<i>LAMA1</i> (HEK+ / G-) <i>LAMA1</i> (KONTROL)	0,053	-3,944 to 4,050	Yok	>0,9999
<i>LAMA1</i> (HEK- / G+) <i>LAMA1</i> (KONTROL)	2,048	-1,949 to 6,045	Yok	0,8131
<i>LAMA1</i> (HEK- / G-) <i>LAMA1</i> (KONTROL)	0,83	-3,167 to 4,827	Yok	0,9996
<i>LAMA1</i> (HEK+ / G+) <i>LAMA1</i> (HEK- / G+)	-2,132	-6,129 to 1,865	Yok	0,7751
<i>LAMA1</i> (HEK+ / G+) <i>LAMA1</i> (HEK+ / G-)	-0,137	-4,134 to 3,860	Yok	>0,9999
<i>LAMA1</i> (HEK+ / G-) <i>LAMA1</i> (HEK- / G-)	-0,777	-4,774 to 3,220	Yok	0,9998
<i>LAMA1</i> (HEK- / G+) <i>LAMA1</i> (HEK- / G-)	1,218	-2,779 to 5,215	Yok	0,9922

İstatistiksel anlamlılık göstermese de HEK+ grubun G- dokularındaki ve HEK- grubun hem G+ hem G- dokularındaki ortalama ekspresyon seviyesinin, kontrol grubunun ortalamasına göre bir miktar arttığı belirlendi. HEK+ grubun G+ dokularının ortalaması, kontrol grubunun ortalama ekspresyon seviyesine benzerdi. HH gruplarının kendi G+ ve G- dokuları arasındaki ekspresyon seviyeleri, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi. Ancak HEK+ grubun G+ dokularında ortalama *LAMA1* ekspresyonu seviyesi, aynı grubun G- dokularından bir miktar daha düşüktü. HEK- grupta ise G- dokuların ortalaması, G+ dokularinkine benzerdi.

HEK+ hastaların G+ dokuları ile HEK- olanların G+ dokuları arasında *LAMA1* ekspresyonu seviyesi düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık



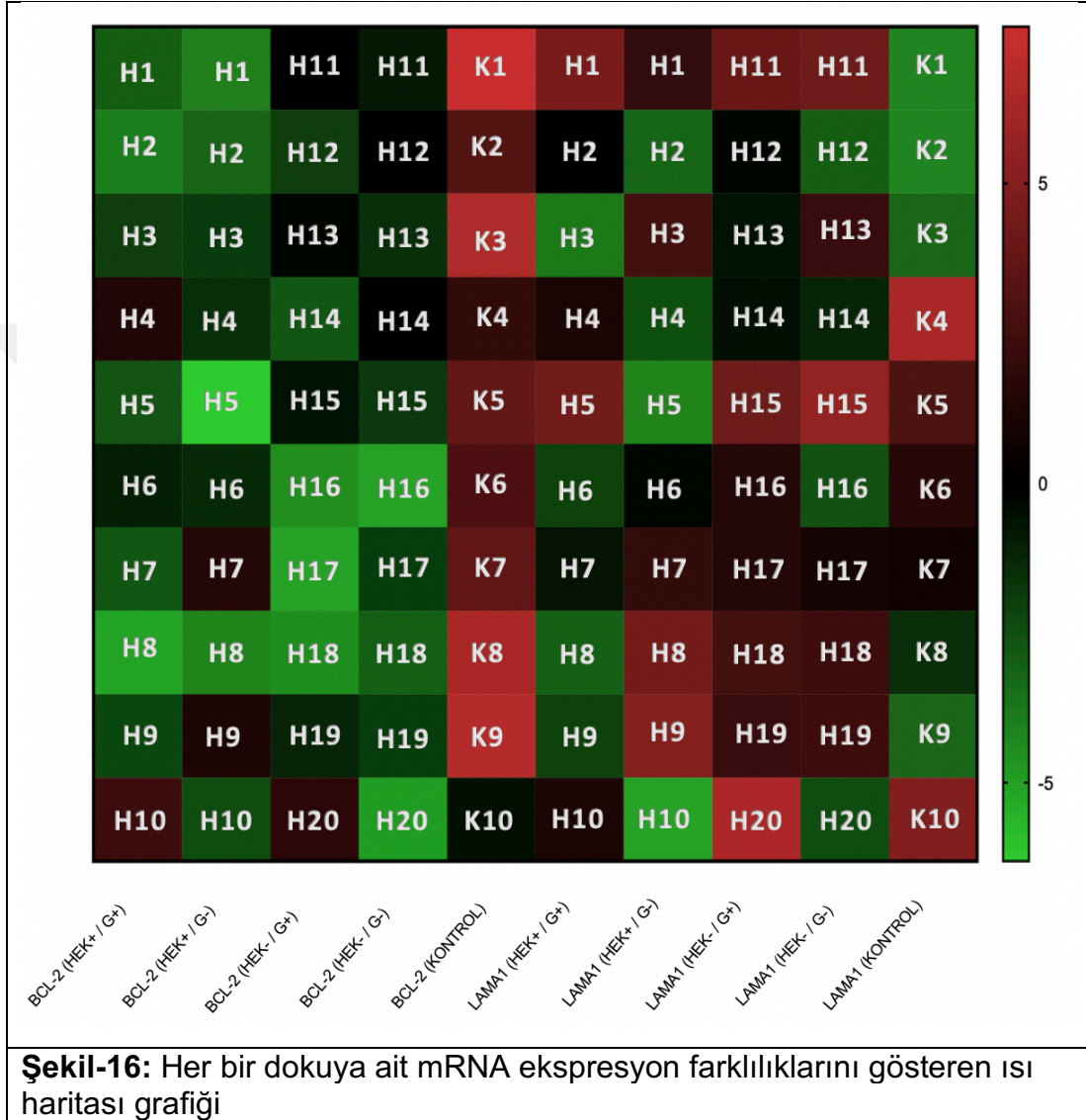
belirlenemese de HEK+ grubun ekspresyon düzeyleri ortalamasının, HEK-gruba göre bir miktar daha düşük olduğu belirlendi. Şekil-15'te gruplara ait ekspresyon değerlerinin dağılımını (maksimum, minimum, ortalama değerler vb.) ifade eden kutu grafiği sunulmuştur.



Gruplara ait karşılaştırmalara ek olarak tüm hastaların tüm dokularına ait değerlendirmeler de yapılmıştır. Sonuçlar ısı haritası grafiği şeklinde sunulmuştur.

**Isı Haritası Grafiği Sonuçları:** Şekil-16'da tüm grupların hasta bazında incelenen tüm dokularına ait mRNA ekspresyon farklılıklarını gösteren ısı

haritası grafiği sunulmuştur. Kırmızıya yakın renklendirilmiş olanlar ekspresyon artışını, yeşile yakın renklendirilmiş olanlar ekspresyon azalışını ifade etmektedir. Sınır değerinde bulunan siyah renk, değişim olmadığını ifade etmektedir.



Hastalar BCL-2 immunohistokimyası ile boyanma özelliklerine göre negatif ve pozitif olmak üzere iki grup olarak değerlendirildiğinde, BCL-2 ekspresyonunun da negatif grupta azalırken, pozitif grupta arttığı gözlemlendi. İmmunohistokimya ve *BCL-2* mRNA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık görüldü ( $p=0,019$ ). Ancak dokulardaki *LAMA1* ekspresyonu seviyesi

ile Laminin immunohistokimyası ile boyanma özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık olmadığı tespit edildi ( $p=0,563$ ).

Hasta cinsiyeti ile *BCL-2* ve *LAMA1* ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir ilişki tespit edilemedi ( $p = 0,433$  ve  $0,52$ ).

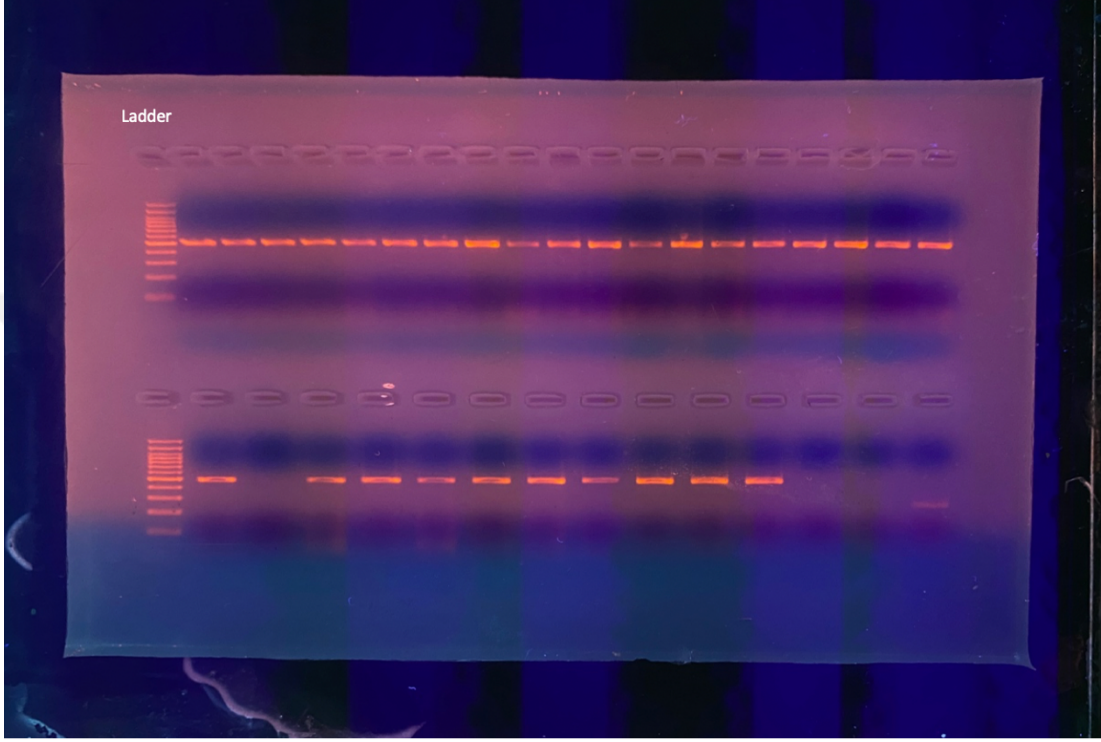
Hastaların *BCL-2* genine ait mutasyon durumunu değerlendirmek amacıyla yapılan DNA izolasyonu verileri Tablo-13'te belirtilmiş olup normal sınırdadır. (Maksimum 55  $\mu$ l elüsyon hacminde (stok) elde edilen DNA'ların kalite tayininde spektrofotometrik A260/A280 oranı ve  $\mu$ g/ml cinsinden konsantrasyonları analiz edilmiştir.)

**Tablo-13:** Elde edilen DNA'lara ait kalite ve konsantrasyon verileri

Hasta	Stok (dH <sub>2</sub> O)	Optik dansite (OD)	Konsantrasyon
H1	55 $\mu$ l	1,8	131,26
H2	55 $\mu$ l	1,9	271,71
H3	55 $\mu$ l	1,9	214
H4	55 $\mu$ l	1,7	185
H5	55 $\mu$ l	1,8	106
H6	55 $\mu$ l	1,9	216
H7	55 $\mu$ l	1,8	112
H8	55 $\mu$ l	1,8	60
H9	55 $\mu$ l	1,7	109
H10	55 $\mu$ l	1,9	181
H11	55 $\mu$ l	1,7	50
H12	55 $\mu$ l	1,6	45
H13	55 $\mu$ l	1,8	146
H14	55 $\mu$ l	1,9	108
H15	55 $\mu$ l	1,9	138
H16	55 $\mu$ l	1,8	112
H17	55 $\mu$ l	2	314
H18	55 $\mu$ l	1,9	303
H19	55 $\mu$ l	1,8	75
H20	55 $\mu$ l	1,8	82
K1	55 $\mu$ l	1,99	168
K2	55 $\mu$ l	1,8	339
K3	55 $\mu$ l	1,8	152
K4	55 $\mu$ l	1,9	192
K5	55 $\mu$ l	1,9	117
K6	55 $\mu$ l	1,99	181
K7	55 $\mu$ l	2	288
K8	55 $\mu$ l	1,9	145
K9	55 $\mu$ l	1,9	93
K10	55 $\mu$ l	2	278

DNA kalite tayininin ardından *BCL-2* geni ekzonlarına ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde uygunluğu değerlendirilmiştir.

*BCL-2* Ekzon 3'ün PCR ürünlerinin uygun bant özellikleri (parlak, tek bantlar) gösterdiğine dair örnek görüntü Şekil-17'de sunulmuştur.

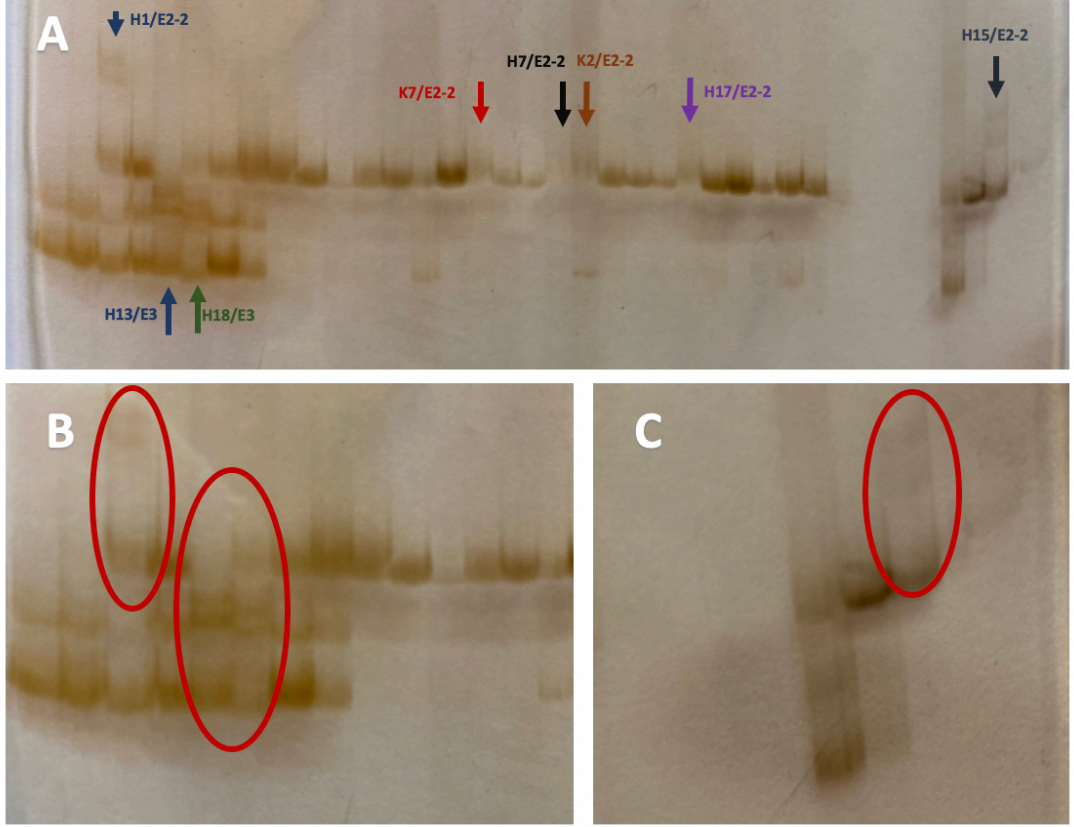


**Şekil-17:** *BCL2* geninin Ekzon 3 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

*BCL-2* geni, Ekzon 2'nin 1. bölgesinde PCR'da optimizasyon sonrası hala çoğaltılamayan DNA örnekleri agaroz jele yüklendi. 18 hastanın DNA'sının jelde smear yaptığı (uygunsuz olduğu) görüntüledi. Bu DNA'ların kırıklarının, çoğaltılmak istenen bölgelerde lokalize olduğu olasılığı öngörülerek bu örneklerin ileri analizleri yapılmadı.

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde uygunluğunun tespitinden sonra, tüm örneklerin PCR ürünlerine SSCP analizi uygulandı. SSCP analizi ile çalışmada yer alan tüm hastaların *BCL-2* Ekzon 2'nin 2. Bölgesine (E2-2) ve Ekzon 3'lerine ait görüntüleme ve değerlendirme yapıldı. SSCP sonucunda, Ekzon 3 için 2 HH'li hastada, Ekzon 2-2 için 4 HH ve 2 kontrol grubu

hastasında belirlenen farklı bant özellikleri nedeniyle DNA dizi analizi yapılmasına karar verildi (Şekil-18).



**Şekil-18:** SSCP analizi sonrası gümüş boyama yapılarak görüntülenen tüm hastaların *BCL-2* Ekzon 2-2 ve Ekzon 3'lerine ait görüntüleme ve değerlendirme **A)** H1,H7,H13,H15,H17,H18 ve K2, K7 numaralı hastalara ait mutasyon şüphesi olan anormal görünümlü bantlar **B)** Daire ile işaretli kırmızı alanlar: H1'e ait Ekzon 2'nin 2. Bölgesinin bantları(E2-2) ve H3'e ait Ekzon 3 ve H18'e ait Ekzon 3 bantlarının yakınlaştırılmış görüntüsü **C)** Daire ile işaretli kırmızı alan: H15'e ait Ekzon 2'nin 2. Bölgesinin bandının(E2-2) yakınlaştırılmış görüntüsü

SSCP'de farklı bant özelliği göstererek mutasyon şüphesi oluşturan hastalara DNA dizi analizi yapıldı. Bunların sonucunda;

18 numaralı hastanın *BCL-2* geni Ekzon 3'ündeki 3'UTR kısmında +37'de T>C değişimi saptandı, 3'UTR bölgesi kodlama yapmayan bir bölge olmasına karşın ekspresyon seviyelerini değiştirebilen, epigenetik faktörlerin etkileşimi ile ilişkili bir bölge olması nedeniyle önem arz etmektedir. Bu hastanın hem G- hem G+ dokusundaki *BCL-2* mRNA ekspresyonu benzerdir,

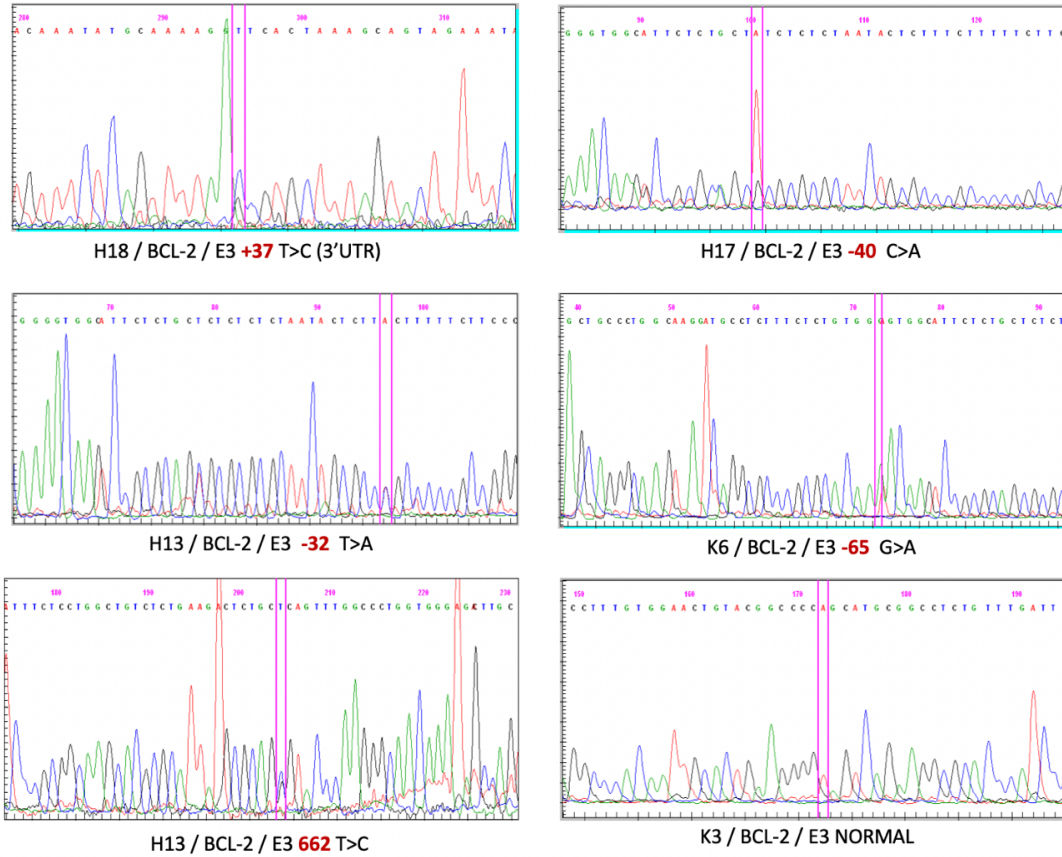
ancak kontrol grubuna göre belirgin azalma göstermiştir [ $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct \text{ BCL-2}})$  değeri = -4,41 (G+ dokuda) / -3,01 (G- dokuda)].

17 numaralı hastanın *BCL-2* geni Ekzon 3'ünde -40 (intronik) C>A değişimi tespit edildi.

6 numaralı kontrol grubu hastasının *BCL-2* gen Ekzon 3'ünde -65 (intronik) G>A değişimi tespit edildi.

13 numaralı hastanın *BCL-2* genine ait 3. ekzonunun 662. bazındaki T>C değişimi, literatürde tanımlanmamış (novel) bir değişimdir. Bu değişim, CTC>CCC kodon değişimi ile aminoasit ifadesinde "lösin" in "prolin" e dönüşümüne neden olmaktadır. Bu hastanın G- dokusundaki *BCL-2* mRNA ekspresyonu, G+ dokusuna göre 6 kat azalmıştır [ $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct \text{ BCL-2}})$  değeri = -0,25 (G+ dokuda) / -1,52 (G- dokuda)]. Ayrıca bu hastanın *BCL-2* geninin 3. ekzonunda -32 T>A intronik değişimi tespit edilmiştir.

Tespit edilen değişimlere ve bir kontrol grubu hastasına ait normal sekans görüntüleri Şekil-19'da verilmiştir

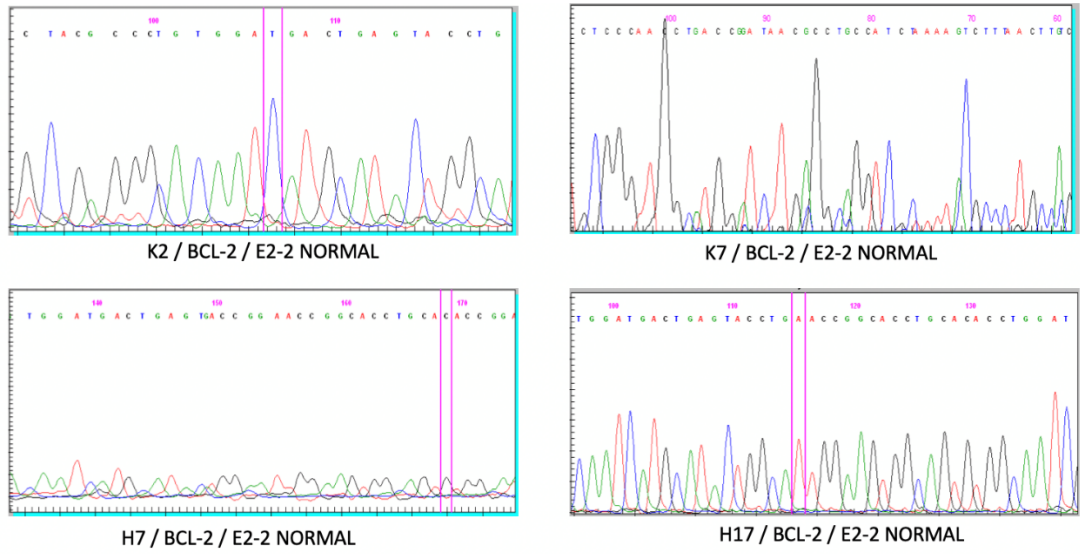


**Şekil-19:** *BCL-2* geninin 3. ekzonunun dizi analizi sonuçları hastalara ait görüntülerin altında hasta numarası (**H**), mutasyon incelemesi yapılan gen (***BCL-2***), inceleme yapılan ekzon (**E**), mevcut değişikliğinin baz sıralaması, baz değişikliği belirtilerek sunulmuştur.

SSCP'de Ekzon 2'nin 2. bölgesinde mutasyon açısından spesifik bant özelliği görülen, ancak analiz edilebilir düzeyde sekans görüntüsü elde edilemediği için okuması yapılamayan, 1 ve 15 numaralı hastaların *BCL-2* genine ait sekans analizinde ekzonun başlangıç bölgesi reaksiyondaki kirlilikten dolayı değerlendirilemedi. Ancak 1 numaralı hastanın hem G+ ve G-segmentindeki *BCL-2* mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı, hem G- dokusundaki *BCL-2* mRNA ekspresyonunun, G+ dokusuna göre 1,5 kat azaldığı [ $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct} BCL-2)$  değeri= **-2,97 (G+ dokuda) / -4,04 (G-dokuda)**], 15 numaralı hastanın ise G- dokusundaki *BCL-2* mRNA ekspresyonunun, G+ dokusuna göre 3 kat azaldığı [ $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct} BCL-2)$  değeri = **-0,61 (G+ dokuda) / -1,81 (G- dokuda)**] tespit edildi. Bu değişimlerin kaynağı olabilecek mutasyonun araştırılması hedeflenerek üç kez tekrar edilmesine rağmen okunamayan bu bölge için ileri analizlerin yapılması, MLPA gibi büyük

delesyon ve duplikasyonları analiz eden bir yöntem ile değerlendirilmesi planlandı.

SSCP'de şüpheli bant özelliği görülen 7 ve 17 numaralı hastalar ile, kontrol grubunda yer alan 2 ve 7 numaralı hastaların 2. ekzonlarının 2. bölgesine ait dizi analizinde mutasyon tespit edilmedi. Bu bölge için ilgili hastalara ait DNA dizi analizleri normaldi (Şekil-20).



**Şekil-20:** *BCL-2* geninin 2. ekzonunun 2. bölgesinin dizi analizi sonuçları hastalara ait görüntülerin altında hasta numarası (**H**), mutasyon incelemesi yapılan gen (**BCL-2**), inceleme yapılan ekzon (**E**) sunulmuştur.



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Hirschsprung hastalığındaki temel problem olan aganglionozis, muhtemelen nöral krest hücrelerinin göç edememeleri, anormal yapıda olmaları, yerleşeceği uygun bir mikroçevre bulamamaları, matriks proteinlerindeki anormallikler ve immatür nöral elemanların olgunlaşmamaları gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Nöronal göç herhangi bir nedenle duraksadığında, distaldeki bağırsaklar aganglionik olarak kalmaktadır (1,2).

İntrauterin dönemde nöral krest hücrelerinin enterik sinir sistemini oluşturmak üzere, kraniokaudal yönde ve bağırsak duvarında uygun yerlere göç etmesinde görevli ekstrasellüler matriks proteinlerinden olan Laminin (1-3,13,17-19) ve anti-apoptotik, nöroprotektif, nöral progenitörlerin farklılaşmasıyla ilişkili olan BCL-2'nin de bu mekanizmada görev aldığı düşünülmektedir (22-26).

Ge ve ark. 2017' de yaptığı çalışma ile BCL-2'nin bağırsaktaki rolünün, enterik nöronların hayatta kalmasını sağlamak ve hücreleri apoptotik sinyale karşı savunmak olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada 15 HH, 5 kontrol hastasına ait dar, transizyonel ve dilate segmentlere ait doku örnekleri; immunohistokimya (protein düzeyinde analiz), Real-Time PCR (mRNA düzeyinde analiz), TUNEL assay (apoptozis analizi) ve Western-blot (protein düzeyinde analiz) ile değerlendirilmiş olup, G+ segment ve geçiş segmentlerinde *BCL-2* ekspresyonunun doğrulandığı, en yüksek *BCL-2* ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile benzer düzeyde ve G+ segmentte tespit edildiği bildirilmiştir. G- dokuda ise, literatürle uyumlu şekilde düşük olduğu sonucu elde edilmiştir (31).

Bu tez çalışmasında, daha geniş bir hasta kohortunda (20 HH, 10 kontrol) çalışılmış olup, *BCL-2* ekspresyonu hem immünohistokimyasal olarak protein düzeyinde hem de RT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde analiz edildi. Ayrıca ilgili kohortun *BCL-2* geni DNA dizi analizi ile de incelendi.

İmmunohistokimyasal değerlendirmenin sonuçlarına bakıldığında, HH grubunda, hastaların G- dokularındaki *BCL-2* ekspresyonunun, G+ dokularına göre anlamlı şekilde azalmış olduğu tespit edildi. Bu azalmanın anlamlılığı RT-PCR ile mRNA düzeyinde istatistiksel olarak belirlenememiştir.

Hirschsprung hastalarının yalnızca G- dokularında değil, G+ dokularındaki *BCL-2* mRNA ekspresyonunun da kontrol grubuna kıyasla düşük olduğunun bulunmuş olması mevcut literatüre ek bir katkı sağlamaktadır. Literatürde bulunan verilerin ışığında, HH etyolojisinde *BCL-2*'nin azalmış ekspresyonunun etkili olmasının yanında, bu hastaların sağlıklı olduğu düşünülen G+ segmentlerinde de azalmış *BCL-2* düzeyleri tespit etmemiz, hasta bireylerde *BCL-2* ekspresyon probleminin, bölgesel bir sorun olmak yerine belki de tüm bağırsakları ve hatta başka organları da etkileyen bir patoloji olabileceğini düşündürmektedir.

Fonksiyonel bazal membranın önemli bir bileşeni olan Laminin, çalışmamızda *BCL-2*'nin kontrol nöral biyobelirteci olarak kullanılmıştır. Laminin izoformlarından 'Laminin-1' in enterik nöral gelişimi desteklediği bilgisi literatürde mevcuttur (17). Bu çalışmada da *LAMA1*'in mRNA ekspresyonu değerlendirilmiştir.

HH etyolojisini aydınlatmaya yönelik olarak Li ve ark. Laminin ve RET gen ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Her ikisi için de immunohistokimya ve RT-PCR kullanılarak HH'li çocuklarda G+, transizyonel ve G- segmentler incelenmiştir. Lamininin tüm segmentlerde eksprese edilirken, G- segmentlerde yoğun olan ekspresyonun G+ segmente doğru giderek azaldığını saptamışlardır. RT-PCR ile yapılan kantitatif *LAMA1* ekspresyon seviyesinin G- segmentte, G+ segmenttekinin iki katı olduğunu, RET geninin ekspresyonunun ise bunun tam tersi olduğunu ifade etmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak G- segmentte yüksek oranda artan Laminin ekspresyonunun, enterik sinir hücrelerinin erken farklılaşması, erken maturasyonu ve göçün erken sonlanmasına neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (50).

Bu çalışmada da Li ve ark.'nın çalışmalarına benzer şekilde Laminin molekülü kullanılmış, *RET* geni yerine ise *BCL-2* geni seçilmiştir. Her iki çalışmanın planı, hasta sayısı ve demografisi benzer niteliktedir. Laminin

immunohistokimyası anlamlı şekilde benzerlik göstermiş, G- dokularda G+ dokuya kıyasla artmıştır ( $p < 0,016$ ). *LAMA1* mRNA ekspresyonu bizim hasta popülasyonumuzda farklı özellikler göstermiştir. *LAMA1* ekspresyon seviyeleri bu çalışmaya benzer şekilde G- dokuda yüksek, G+ dokuda düşük olma eğilimi göstermiştir. Ancak Li ve ark. (50) bu düzeyler arasında anlamlı farklılık tespit etmişken, bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir.

Bir diğer deneysel çalışmada *LAMA1* ekspresyonu, HH oluşturulmuş farelerde hem RT-PCR hem de floresan immunohistokimya yöntemiyle araştırılmıştır. Hirschsprunglu farelerde, distal kolona kadar kolonizasyon olmasına karşın, proksimal kolondan itibaren aganglionozis görülmüş, G- proksimal ve distal kolonlarındaki *LAMA1* seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmış olduğu görülmüştür. Bu çalışmada G- dokularda değişen *LAMA1* ekspresyonunun, HH ile sonuçlanan enterik nöral krest göçünün bozulmasına katkıda bulunabileceğini düşünülmüştür (19). Bizim çalışmamız ve bu deneysel çalışma arasında Hirschsprunglu hastalarda *LAMA1* seviyesini değerlendirme ve elde edilen sonuçlar açısından benzerlik mevcuttur.

HH tanısı daha önce de bahsedildiği gibi Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyalı kesitlerdeki aganglionosisin görülmesi ile konur (1,2,52). Ancak H&E boyamasının bazı güçlükleri olması nedeniyle ganglion hücrelerinin tanımlanması için çok sayıda histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri tanımlanmaktadır (43,52,53).

Wester ve ark. anti-BCL-2'nin HH tanısında özellikle G+ dokularda sinir hücresi gövdesi görüntülenmesi için uygun olduğunu, G- dokularda ise myenterik pleksustaki sinir liflerini zayıf boyadığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda BCL-2'nin fetal dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca enterik nöronların hayatta kalmasını desteklediğini ileri sürmüşlerdir (23). Bizim çalışmamızda Hirschsprung hastalarının G+ bağırsak segmentlerindeki submukozal ve myenterik nöronlar BCL-2 immunohistokimyası ile pozitif boyanırken, G- bağırsak segmentlerinin immun boyama sonuçlarının negatif olması benzer şekilde BCL-2'nin nöronların hayatta kalmasında rolü olduğu fikrini desteklemektedir. Bu tez çalışması hasta grubunun homojen yapıda olması, yalnızca pediatrik hasta serisiyle çalışılmış olması, kontrol biyobelirteç

olarak Laminin tercih edilmesi açısından bahsi geçen çalışmaya göre farklılık arz etmektedir. Laminin immunohistokimyasında ise G- dokular anlamlı düzeyde pozitif boyanma özelliği gösterirken, G+ dokular daha çok negatif ve hafif boyanma özelliği göstermiştir. Bu durum, Laminin düzeyindeki değişimlerin anormal mikroçevreye yol açarak HH oluşumunda etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Song ve ark. HH'nin tanısında BCL-2'nin değerini araştırmak amacıyla yaptıkları immunohistokimya çalışmasında, BCL-2 proteininin normal erişkin ve HH'li çocukların G+ segmentlerinde eksprese edilirken, G- segmentte ekspresyonunun olmaması nedeniyle, BCL-2 değerlendirmesinin HH'de enterik nöronların tanımlanması için değerli olacağı sonucuna varmışlardır (22). Bizim çalışmamızda da 20 HH'li hastanın 19'unda G- segmentte BCL-2 ekspresyonu saptanmazken, yalnızca 1 hastada G- segmentte BCL-2 immunohistokimyası ile hafif boyanma özelliği görülmüştür. Bu çalışmanın sonucu Song ve ark.'nın çalışmasıyla benzerlik göstermektedir.

Hegazy ve ark., 2021'de yaptığı çalışmada Hirschsprung ve ilişkili hastalıklar nedeniyle opere edilmiş, obstrüktif semptomlarla başvuran hastalarda BCL-2 ekspresyonu ile ganglion hücre sayısı arasında oldukça önemli bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Çalışmada, BCL-2 protein ekspresyonu açısından hiperganglionik segmentler, hipoganglionik olanların aksine güçlü pozitiflik göstermiştir (24).

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz immunohistokimyasal sonuçlar BCL-2 için her iki çalışmaya da benzer özellik göstermekle beraber, bizim çalışmamıza ilave edilen moleküler genetik deneylerle elde ettiğimiz sonuçlar farklılık arz etmektedir. *BCL-2* mRNA ekspresyonunun G+ ve G- dokularda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir. Ancak *BCL-2* mRNA ekspresyon seviyeleri arasında bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Lamininde de immunohistokimyasal değerlendirmede anlamlı düzeyde farklılık görülürken, *Laminin (LAMA1)* mRNA ekspresyonu seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlılık olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda yer alan ve moleküler biyoloji alanında uzman araştırmacılar; immunohistokimyasal yöntemle protein düzeyinde tespit edilen

ancak moleküler yöntemlerle mRNA düzeyinde tespit edilemeyen bu farklılıkların; mRNA'nın post-transkripsiyonel veya post-translasyonel düzenlenmeleri nedeniyle protein sentezine yansımış olabileceğini öngörmektedir.

Izadi B ve ark. 2011 yılında ganglion hücrelerini BCL-2 immünohistokimyasal boyaması ile tanımlamak ve H&E boyaması ile karşılaştırmak için bir çalışma dizayn etmişlerdir. Bu çalışmada BCL-2 immunohistokimyasal yönteminin HH teşhisi için duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerlerinin daha yüksek olduğunu, her iki yöntemin birlikte kullanılmasıyla tanısal doğruluğun arttığını bildirmişlerdir (54).

Bu çalışmada rektosigmoid HH tanısı H&E histokimyası ile konmuş ve çeşitli immunohistokimyasal yöntemlerle doğrulanmış preparatların, BCL-2 immunohistokimyasal boyaması ile değerlendirmesi tekrar yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda BCL-2 immunohistokimyasının HH tanısına yardımcı, duyarlı bir yöntem olduğu, çalışmada yer alan patoloji alanında uzman araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

HEK, en ciddi ve potansiyel yaşamı tehdit edici HH komplikasyonudur. HEK'in hem pre-operatif hem de post-operatif dönemde görülebiliyor olması, etyolojisinde ganglion hücresi olup olmaması dışında başka sebeplerin de olabileceğini düşündürmektedir (1,2). Literatürde uzun segment HH, cinsiyet, ameliyat sırasındaki yaş, operasyon tipi, ailede HH öyküsü ve Down Senromu dahil olmak üzere HEK için pek çok risk faktörü de tanımlanmıştır (9,46,47).

Roorda ve ark., 2021 yılında, toplam 146 HH'li hastanın %21'inin (n:31) post-operatif HEK geçirdiğini saptamışlardır; ancak bu olgularda klinik özellikler ve risk faktörlerinin, HEK ile anlamlı ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir (48).

Bu tez çalışması retrospektif olarak planlandığından klinik olarak standardize edilmiş rektosigmoid HH olan toplam 20 hastanın 10'u HEK geçirmemiş, 10'u ise HEK geçirmiş hastalardan randomize şekilde seçilmiştir. Belirlenen gruplar incelendiğinde serimizde, HH grubunun %80'inin (n:16) erkek, %20'sinin (n:4) kız iken, HEK+ grubun %90'ının (n:9) erkek, %10'unun (n:1) kız olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde

cinsiyet ve Down Sendromlu olup olmamak ile HEK gelişimi arasında anlamlılık saptanmamıştır ( $p=0,264$  ve  $p=0,435$ ). Literatürde bildirilen bu risk faktörlerinin bizim serimizde anlamlılık göstermemesi hasta sayısının düşük olması ile ilişkilendirilebilir.

HH etyolojisinde BCL-2'yi inceleyen çalışmalar literatürde yer almasına rağmen (23-26), BCL-2'nin HEK gelişimi ile ilişkisini irdeleyen herhangi bir çalışma olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamız bu konuyu inceleyen ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmekte ve özgün değer taşımaktadır. Bu çalışmada immunohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle HEK geçiren hastaların G+ ve G- dokuları kendi arasında karşılaştırılmıştır. Aynı şekilde HEK geçirmeyen gruplarda da bu karşılaştırma yapılmıştır. İmmunohistokimyasal boyanma özellikleri ve BCL-2 mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında HEK geçiren grup ile geçirmeyen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Ancak G+ bağırsak segmentlerindeki BCL-2 mRNA ekspresyon seviyeleri HEK geçiren grupta, geçirmeyen gruba göre daha düşük bulunmuştur. HEK geçiren grupta G+ dokudaki BCL-2 mRNA ekspresyon seviyelerinin düşük olması, peroperatif alınacak biyopsi sonucuna göre olguların HEK geçirme ihtimalini öngörmeye fayda sağlayabilir. Fakat bu konunun moleküler genetik açısından daha detaylı incelenmesi ve bir cut-off değerinin belirlenmesi gerekmektedir.

HEK geçiren grubun G+ dokularındaki LAMA1 mRNA ekspresyon düzeylerinin ortalaması, geçirmeyen gruba göre daha düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. LAMA1 ekspresyon seviyelerinin dağılımı geniş bir yelpazede yer almaktadır. LAMA1 sonuçlarının geniş bir yelpazede yer alması, Lamininin değerlendirilmesinde daha hassas ve çok sayıda hasta üzerinde moleküler biyolojik çalışmaların planlanmasını gerektirmektedir.

Bu çalışma Hirschsprung hastalığının etyolojisine ışık tutmasının yanında Hirschsprung enterokolitinin moleküler düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayacak bir ön çalışma olması dolayısıyla değer arz etmektedir.

Tüm hastalarda BCL-2 genine ait mutasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Hirschsprung enterokoliti geçirmeyen 13, 17 ve 18 numaralı hastaların Ekzon

3 bölgelerinde mutajenik değişimler saptanmıştır. Yapılan DNA dizi analiz sonuçları değerlendirildiğinde; 13 numaralı hastanın *BCL-2* geninin 3. ekzonununun 662. bazında tespit edilen T>C değişimi, literatürde tanımlanmamış (novel) bir değişimdir. Bu değişim, CTC>CCC kodon değişimi ile aminoasit ifadesinde “lösin”in “prolin”e dönüşümüne neden olmaktadır. Aynı hastanın *BCL-2* geninin 3. ekzonundaki -32 (intronik) T>A değişiminin ise klinik anlamlılığı henüz belirtilmemiştir. Bu hastaya benzer şekilde 17 numaralı hastanın *BCL-2* geninin Ekzon 3’ündeki -40 (intronik) C>A değişimi klinik anlamlılık arz etmemektedir. 18 numaralı hastanın *BCL-2* geni Ekzon 3’ündeki 3’UTR kısmında +37’de saptanan T>C değişimi ise, 3’UTR bölgesinin kodlama yapmayan bir bölge olmasına karşın ekspresyon seviyelerini değiştirebilen, epigenetik faktörlerin etkileşimi ile ilişkili bir bölge olması nedeniyle önem arz etmektedir.

*BCL-2* geninin Ekzon 2 bölgesinde mutasyon araştırılması için yapılan SSCP analizinde de 1 ve 15 numaralı hastaların Ekzon 2’nin 2. bölgesinde, mevcut yöntemlerle ortaya konamayan ancak mutajenik olabileceği düşünölen değişimler saptanmıştır.

Moleküler genetik çalışmanın sonucu olarak *BCL-2* genine ait DNA dizi analizinde, 20 HH’li hastanın 3’ünde net, 2’sinde olası mutajenik değişim saptanmıştır. Mutajenik değişim saptanan olguların bir tanesi HEK geçiren hasta grubunda, diğer dört hasta ise HEK geçirmeyen hasta grubunda yer almıştır. Mutasyon saptanan bu olguların hiçbirisi bilinen sendromik özellik taşımamaktadır.

### **Sonuç olarak;**

1) Hirschsprung hastalığı ve Hirschsprung enterokoliti etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Antiapoptotik ve nöroprotektif bir molekül olan *BCL-2* ile nöral gelişimi destekleyen ekstrasellöler matris proteinlerinden olan Lamininin ekspresyonlarındaki farklılıkların bu etyolojide rol oynadığı düşünölmektedir.

2) Hirschsprung hastalığının tanısı H&E boyamasında ganglion hücrelerinin görölmemesiyle konmaktadır. Ancak çeşitli zorlukları olması nedeniyle farklı histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemler üzerinde

çalışılmaktadır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz BCL-2 ve Laminin immunohistokimyası ile boyanma özellikleri bakımından ganglionik ve aganglionik dokuların ayrımı mümkündür. Tanıda kullanıldığında anlamlı sonuç elde edilebilmektedir.

**3)** Çalışmamızda BCL-2 ve Laminin ekspresyonu açısından ganglionik ve aganglionik dokular arasındaki farklılıklar immunohistokimyasal yöntemlerle protein düzeyinde tespit edilirken, Real-Time PCR yöntemiyle mRNA düzeyinde tespit edilememiştir.

**4)** Hirschsprung hastalarının yalnızca aganglionik dokularında değil, ganglionik dokularındaki *BCL-2* mRNA ekspresyonları sağlıklı bireylere göre düşük bulunmuştur. Bu durum *BCL-2* mRNA ekspresyon probleminin, sadece aganglionik bağırsak bölgesini değil belki de tüm bağırsakları ve hatta başka organları da etkileyen bir patoloji olabileceğini düşündürmektedir.

**5)** Çalışmamızda BCL-2 ve Laminin ekspresyon farklılıkları ile HEK gelişimi arasında ilişki saptanmamıştır.

**6)** Bazı Hirschsprung hastalarının *BCL-2* geninde mutajenik değişimler tespit edilmiştir. Bu mutajenik değişimlerin klinik tablo üzerindeki etkisi ile ilgili ileri analizler gerekmektedir.

**7)** BCL-2 ve Laminin, Hirschsprung hastalığı ve Hirschsprung enterokoliti etyopatogenezinde üzerine düşülmesi gereken bir moleküldür. Elde edilen sonuçlar, daha geniş hasta serileriyle yapılacak çalışmalarla anlamlılık gösterebilecek potansiyelindedir.



## KAYNAKLAR

1. Başaklar AC. Hirschsprung Hastalığı. Başaklar AC (ed). Bebek ve çocukların cerrahi ve ürolojik hastalıkları. Birinci baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. 605-54.
2. Langer J. Hirschsprung Disease. Arnold G. Coran, Anthony Caldamone, N. Scott Adzick et al. (eds). Pediatric surgery. 7th Edition. New York: Mosby İmprint; 2012. 1265-78
3. Jiao C, Chen X, Feng J. Novel insights into the pathogenesis of Hirschsprung's-associated enterocolitis. Chinese Medical Journal 2016;129(12):1491-7.
4. Çelik A. Hirschsprung Enterokoliti (HEK). Çocuk Cerrahisi Dergisi 2018;32(3):136-47.
5. Austin K. The pathogenesis of Hirschsprung's disease-associated enterocolitis. Seminars in Pediatric Surgery 2012;21(4):319-27.
6. Sergi C. Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100(th) anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. World journal of clinical pediatrics 2015;4(4):120-5.
7. Yoshimaru K, Yanagi Y, Obata S. Acetylcholinesterase staining for the pathological diagnosis of Hirschsprung's disease. Surgery Today 2021;51(2):181-6.
8. Meier-Ruge W, Bruder E. Histopathological Diagnosis and Differential Diagnosis of Hirschsprung's Disease Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008. 185-94.
9. Murphy F. Enterocolitis Complicating Hirschsprung's Disease. Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008. 133-41.
10. Pastor A, Osman F, Teitelbaum DH, et al. Development of a standardized definition for Hirschsprung's-associated enterocolitis: a Delphi analysis. Journal of Pediatric Surgery 2009;44(1):251-6
11. Gosain A, Frykman PK, Cowles RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of Hirschsprung-associated enterocolitis. Pediatric Surgery International 2017;33(5):517-21.
12. Jensen A, Frischer J. Surgical history of Hirschsprung disease. Seminars in Pediatric Surgery 2022;31(2):151-74.
13. Ji Y, Tam P, Tang C. Roles of Enteric Neural Stem Cell Niche and Enteric Nervous System Development in Hirschsprung Disease. International Journal of Molecular Sciences 2021;22(18):96-9.
14. Gershon MD. Development of the Enteric Nervous System: A Genetic Guide to the Perplexed. Gastroenterology. 2018;154(3):478–80.
15. Adıgüzel Ü. Hirschsprung Hastalığı Tanısıyla Transanal Endorektal Pull-Through Ve Transanal Myektomi/Sfinkteromyektomi Yöntemleriyle Ameliyat Edilen Hastaların Sonuçlarının Değerlendirilmesi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2012.

16. Gershon MD. Functional Anatomy of the Enteric Nervous System Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008.21-41.
17. Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K et al. The effect of Laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatric Surgery International* 2018;34(2):143-7.
18. Fu M, Barlow-Anacker AJ, Kuruvilla KP, et al. 37/67-Laminin receptor facilitates neural crest cell migration during enteric nervous system development. *FASEB Journal* 2020;34(8):10931-47.
19. Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, et al. Altered expression of Laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International* 2018;34(2):137-41.
20. Swart C. Characterization Of The Interaction Between Acetylcholinesterase And Laminin: A Template For Discovering Redundancy (Dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy in Medical Sciences). Stellenbosch: Stellenbosch University; 2012.
21. Chalazonitis A, Gershon M, Greene L. Cell death and the developing enteric nervous system. *Neurochemistry International* 2012;61(6):839-47.
22. "Bcl-2 Family.jpg" dosyasına ulaşılacak web adresi: [https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Bcl-2\\_Family.jpg](https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Bcl-2_Family.jpg) (Erişim tarihi: 14/09/2007-şimdi)
23. Song Y, Li J, Li M. BCL-2 expression in enteric neurons of Hirschsprung's disease and its significance. *Shi yan sheng wu xue bao* 2002;35(2):155-8.
24. Wester T, Olsson Y, Olsen L. Expression of BCL-2 in Enteric Neurons in Normal Human Bowel and Hirschsprung Disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 1999;123(12):1264-8
25. Liu W, Yue W, Wu R. Overexpression of BCL-2 promotes survival and differentiation of neuroepithelial stem cells after transplantation into rat aganglionic colon. *Stem Cell Research and Therapy* 2013;4(1):7.
26. Hegazy NA, Ghazal F, El Din Zaki AM, et al. The Role of BCL-2 in Pediatric Functional Bowel Obstruction Cases with Ganglionated Specimens. *QJM: An International Journal of Medicine* 2021;114:280-1
27. "Gastrointestinal Wall" konu başlığı altındaki görsele ulaşılacak web adresi: [https://en.wikipedia.org/wiki/Submucosal\\_plexus#/media/File:Layers\\_of\\_the\\_GI\\_Tract\\_english.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Submucosal_plexus#/media/File:Layers_of_the_GI_Tract_english.svg) (Erişim tarihi: 02/03/2014-şimdi)
28. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational Research* 2013;162(1):1-15.
29. Lake JI, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2013;305(1):G1-24
30. Moore SW. Congenital Anomalies and Genetic Associations in

- Hirschsprung's Disease. Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008.115-25.
31. Ge X, Hu C, Guo Q, et al. Investigation of the expression of apoptosis-inducing factor-mediated apoptosis in Hirschsprung's disease. *Neuroreport* 2017;28(10):571-8
  32. Moore S, Johnson G, Schneider J. Elevated Tissue Immunoglobulins in Hirschsprung's Disease - Indication of Early Immunologic Response. *European Journal of Pediatric Surgery* 2000;10(02):106-10.
  33. Westfal M, Goldstein A. Pediatric enteric neuropathies. *Current Opinion in Pediatrics* 2017;29(3):347-53.
  34. Jabari S, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira AB. Chagasic megacolon: Enteric neurons and related structures. *Histochemistry and Cell Biology* 2014;142(3):235-44.
  35. Puri P, Montedonico S. Pathophysiology of Hirschsprung's Disease. Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008.95-103.
  36. Rolle U, Piotrowska AP, Nemeth L, Puri P. Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:928-33
  37. Parikh DH, Tam PK, Lloyd DA, Velzen DV, Edgar DH. Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, Laminin, in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1992;27(8):991-5.
  38. Saad S, Elseed M, AbouZeid A, et al. Histopathological perspective of the pulled-through colon in Hirschsprung disease: Impact on clinical outcome. *Journal of Pediatric Surgery* 2020;55(9):1829-33.
  39. Smith C, Ambartsumyan L, Kapur R. Surgery, Surgical Pathology, and Postoperative Management of Patients With Hirschsprung Disease. *Pediatric and Developmental Pathology* 2020;23(1):23-39.
  40. Kyrklund K, Sloots C, Blaauw I, et al. ERNICA guidelines for the management of rectosigmoid Hirschsprung's disease. *Orphanet journal of rare diseases* 2020;15:164-80.
  41. Puri P, Montedonico S. Hirschsprung's Disease: Clinical Features Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008.107-12.
  42. Meier-Ruge W, Bruder E. Current Concepts of Enzyme Histochemistry in Modern Pathology. *Pathobiology* 2008;75(4):233-43.
  43. Ekmekci S, Olguner M, Özer E. Hirschsprung hastalığındaki kantitatif morfolojik değişikliklerin immunohistokimya eşliğinde dijital morfometrik ölçümü. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2018;32(3):227-35.
  44. Wedel T. Electron Microscopic Studies of Hirschsprung's Disease Holschneider AM, Puri P(eds.) Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd edition. Berlin: Springer Verlag; 2008.221-7.
  45. Ke J, Zhu Y, Miao X. The advances of genetics research on Hirschsprung's disease. *Pediatric Investigation* 2018;17;2(3):189-95.
  46. Lewit RA, Kuruvilla KP, Fu M, Gosain A. Current understanding of Hirschsprung-associated enterocolitis: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Seminars in Pediatric Surgery* 2022;31(2):151-62.

47. Yulianda D, Sati AI, Makhmudi A, Gunadi. Risk factors of preoperative Hirschsprung-associated enterocolitis. *BMC Proceedings* 2019;13(S11):18.
48. Roorda D, Oosterlaan J, van Heurn E, Derikx JPM. Risk factors for enterocolitis in patients with Hirschsprung disease: A retrospective observational study. *Journal of Pediatric Surgery* 2021;56(10):1791-8.
49. Wang SQ, Zhu J, Wang Y et al. Utilization of RET, Bcl-2 and CR immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease and its allied disorders. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016;9(10):10390-7
50. Li AW, Zhang WT, Wang R, Feng JB, Ruan Y. The relationship between expressions of the Laminin gene and RET gene in Hirschsprung's disease. *World J Pediatr* 2008;4(2):135-9
51. İnanç A. Görselleştirme Çeşitleri. İnanç A (ed). İletişim ve İletişim Araştırmalarında R Studio ile Veri Görselleştirme. Birinci Baskı. Ankara: İKSAD Publishing House; 2021. 29-125.
52. Galazka P, Szyberg L, Bodnar M, Styczynski J, Marszalek A. Diagnostic Algorithm in Hirschsprung's Disease: Focus on Immunohistochemistry Markers. *in vivo* 2020;34:1355-9
53. Puri P. Intestinal Dysganglionosis and Other Disorders of Intestinal Motility. In: Coran AG (eds). *Pediatric Surgery*. 7th ed. Philadelphia: Mosby; 2012: 1279-87.
54. Izadi B, Kamkar N, Kanani M. Diagnostic validity of BCL-2 in ganglion cell staining and its application in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 2011;13(3):60-4

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım kıymetli hocalarım Prof. Dr. Hasan Doğruyol, Prof. Dr. Mehmet Emin Balkan, Prof. Dr. Arif Nuri Gürpınar, Prof. Dr. İrfan Kırıştioğlu ve Prof. Dr. Nizamettin Kılıç'a kendilerinden öğrendiğim her şey için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama sağladıkları destek için Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, tez danışmanım ve proje yürütücümüz olan Prof. Dr. İrfan Kırıştioğlu'na, çalışmamıza sundukları değerli katkılar için Tıbbi Biyoloji AD'ndan Prof. Dr. Gülşah Çeçener ve ekibi ile Tıbbi Patoloji AD'ndan Prof. Dr. Ömer Yerci ve Doç. Dr. Nesrin Uğraş'a teşekkür ederim.

Mesleğimizin detay ve inceliklerini öğretme anlamında karşılığı ödenemez emekleri için Uzm. Dr. Fatih Çelik'e, zor süreçlerdeki yol arkadaşlığı için Uzm. Dr. Ayşe Parlak'a, medikal ve paramedikal her konuda yanımda hissettiğim Uzm. Dr. Bilge Türedi Sezer'e, farklı bakış açıları kattığı için Uzm. Dr. Mehmet Uğur Yılmaz'a, aktardığı değerli bilgiler için Uzm. Dr. Mehmet Mazhar Utanğaç'a, yalnızca bir telefon kadar uzağımda olacağını bildiğim Uzm. Dr. Ayşegül Akbulut'a ömür boyu müteşekkir olacağım.

Çalışmanın ve öğrenmenin yükünü paylaştığı değerli asistan arkadaşlarıma, eğitimime büyük katkı ve desteği olan tüm Uludağ Çocuk Cerrahisi ailesi hemşire, sekreter, tekniker ve personellerine teşekkür ederim. Kendilerinden çok şey öğrendiğim pediatri, anestezi ve genel cerrahi ekiplerine teşekkürü borç bilirim.

Başarılı bir öğrencilik hayatım olmasını sağlayan ilkokul öğretmenim Berna Bediz Şahin'e ve eğitim hayatım boyunca gösterdiği gayretlerle bu noktaya ulaşmamda payı olan tüm hocalarıma sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Canım aileme; annem, babam, ablam ve erkek kardeşime benim ailem oldukları için, sabrı, iyiliği, onurlu bir yaşamın kıymetini öğrettikleri için minnettarım.

## ÖZGEÇMİŞ

Yılında doğdum. Nuri Erbak İlköğretim Okulu, Bursa Anadolu Lisesi, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi mezuniyetimin ardından Ardahan Devlet Hastanesi'nde hekimlik mesleğine başladım. 2017 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Çocuk Cerrahisi uzmanlık eğitimi almaya hak kazandım. Tıp ve uzmanlık eğitimim süresince birçok kongre ve sempozyumda yazılı-sözlü bildiri sunumları gerçekleştirdim. Küçük yaşlardan itibaren özellikle Türk Halk Müziği olmak üzere farklı türlerde eserler seslendirdiğim konserler ve mekanlarda sahne aldım. Kafkas dansları üzerine eğitim aldım. Şarkı söylemeyi, dans etmeyi, öğrenmeyi, yeni şeyler keşfetmeyi, kültür ve doğa gezileri yapmayı, sorunları çözmeyi severim.