

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNE EDİLENLERİNE

**Proje Türü** : Hızlandırılmış Destek Projesi (HDP)  
**Proje No** : 19H0237003  
**Proje Yürütücüsü** : Arş. Gör. Dr. Ecem Kaya Sezginer  
**Proje Başlığı** : Endometriozis Hastalarında Yeni Adipositokinlerin (Omentin, Visfatin, Vaspin, Irisin) Serum ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin İnflamasyon Belirteci ile İlişkisinin İncelenmesi

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

ST YORUM

STEM YORUM  GEREKÇESİ

..... / ..... / 20  
Arş. Gör. Dr. Ecem Kaya Sezginer  
İmza

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
SONUÇ RAPORU**

Endometriozis Hastalarında Yeni Adipositokinlerin (Omentin, Visfatin, Vaspın, İrisin) Serum ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin İnflamasyon Belirteci İle İlişkinin İncelenmesi

Arş. Gör. Dr. Ecem Kaya Sezginer

19H0237003

06.09.2019 - 06.09.2020

16.11.2020

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - 2020

## I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve zetleri

<b>Türkçe Adı</b>	: Endometriozis Hastalarında Yeni Adipositokinlerin (Omentin, Visfatin, Vaspin, irisin) Serum ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin inflamasyon Belirteci ile ilişkinin incelenmesi
<b>İngilizce Adı</b>	: The Investigation of Relationship between Serum and Gene Expression Levels of Novel Adipocytokines (Omentin, Visfatin, Vaspin and Irisin) and Inflammatory Marker in Patients with Endometriosis

## Özetleri

- : Endometriozis Hastalarında Yeni Adipositokinlerin (Omentin, Visfatin, Vaspın, irisin) Serum ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin İnflamasyon Belirteci ile İlişkinin İncelenmesi

Endometriozis, endometrium dokusunun rahim dışı ında büyümesi ile karakterize pelvik ağrı ve infertilite ile ilişkili bir hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalar, endometriozisin üreme ça ındaki kadınların %5-10'unu etkilediğini göstermektedir[1]. Kadınların yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan endometriozis hastalığının patogeneğinde inflamasyon önemli rol oynamaktadır [2]. Beyaz adipoz doku, metabolizma, immunité, endokrin sistem ve inflamasyon regülasyonunda rol oynayan adipositokinler olarak bilinen birçok çeşitli proteini salgılayan aktif bir organdır[3]. Birçok çalışmada endometriozisin patogeneğinde adipositokinlerin ve inflamasyon belirteçlerinin rolü olduğunu göstermiştir[4-7]. Ancak "yeni adipositokinler" olarak adlandırılan "omentin, visfatin, vaspın ve irisin" adipositokinlerin endometriozisteki rolü henüz bilinmemektedir ve bununla ilgili önceden yapılmış bir çalışmada literatürde bulunmamaktadır. Buradan yola çıkılarak, bu projede endometriozisin gelişiminde yeni adipositokinlerin rolünün ve bu adipositokinlerin serumdaki inflamasyon belirteci [C-reaktif protein (CRP)] ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada laparoskopi ile endometriozis teşhisi konulduktan sonra, endometriozis (n=20) ve kontrol grupları (n=20) oluşturulmuştur. ELISA metodu ile serumda omentin, visfatin, vaspın, irisin ve CRP düzeyleri ölçülmüştür. Plazmada visfatin ve vaspın gen ekspresyon düzeyi eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time PCR, RT-PCR) metodu ile tayin edilmiştir.

Endometriozis grubunda serumdaki irisin düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Serum omentin ve vaspın düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Endometriozis grubundan alınan plazma örneklerindeki visfatin ve vaspın gen ekspresyonu, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Endometriozis varlığında, serum ve gen ekspresyon düzeyi değişiklik gösteren yeni adipositokinlerin belirlenmesi, endometrioziste rol oynayan mekanizmaların tespitini kolaylaştırarak, endometrioziste hedefe yönelik tedavinin geliştirilmesine ön ayak olacaktır.

### The Investigation of Relationship between Serum and Gene Expression Levels of Novel Adipocytokines (Omentin, Visfatin, Vaspın and Irisin) and Inflammatory Marker in Patients with Endometriosis

Endometriosis is a disease associated with pelvic pain and infertility, characterized by the growth of endometrial tissue outside the uterus. Epidemiological studies show that endometriosis affects 5-10% of women of reproductive age [1]. Inflammation plays an important role in the pathogenesis of endometriosis, which significantly reduces the quality of life of women [2]. White adipose tissue is an active organ that secretes many kinds of proteins known as adipocytokines that play a role in metabolism, immunity, endocrine system and inflammation regulation [3]. Many studies have shown that adipocytokines and inflammatory markers play a role in the pathogenesis of endometriosis [4-7]. However, the role of "omentin, visfatin, vaspine and irisin" adipocytokines called "new adipocytokines" in endometriosis is not yet known and no previous study is available in the literature. Based on this, this project aimed to investigate the role of new adipocytokines in the development of endometriosis and the relationship of these adipocytokines with the inflammatory marker [C-reactive protein (CRP)] in

serum.

In this study, endometriosis (n=20) and control groups (n=20) were determined after diagnosing endometriosis by laparoscopy. By ELISA method, omentin, visfatin, vaspine, irisin and CRP levels were measured in serum. The gene expression level of visfatin and vaspine in plasma was determined by the real-time polymerase chain reaction (Real time PCR, RT-PCR) method.

Irisin levels in serum was significantly higher in the endometriosis group compared to the control group. There was no statistically significant difference between the control and endometriosis groups in serum omentin and vaspin levels. Visfatin and vaspin gene expression in plasma samples from the endometriosis group was found to be lower than the control group, and this difference was statistically significant.

The identification of new adipocytokines which demonstrate an alteration in serum levels and gene expression in the presence of endometriosis, will facilitate the detection of mechanisms involved in endometriosis and will lead to the development of targeted therapy in endometriosis.

## II. Amaç ve Kapsam

Projede endometriozis gelişiminde yeni adipositokinlerin rolünün ve bu adipositokinlerden omentin, visfatin, vaspin ve irisinin serum düzeylerinin ve plasma visfatin ve vaspin gen ekspresyon düzeylerinin ilk kez araştırılması amaçlanmıştır.

Endometriozis kadınların yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan ve sık görülen bir jinekolojik hastalıktır. Endometriozis, her yıl sağlık harcamalarının büyük kısmını oluşturması nedeniyle kamu sağlığı açısından önemli bir yere sahiptir. Endometriozisin patofizyolojisi hala tam olarak bilinmemektedir ve buna bağlı olarak endometriozisin hedefe yönelik tedavisi bulunmamaktadır. Bu proje, endometriozis oluşumunda rol oynayan yeni adipositokinleri belirleyerek, hedefe yönelik tedavi geliştirilmesi için yapılacak klinik çalışmalarına katkıda bulunacaktır. Aynı zamanda endometriozisin antiinflamatuar ajanlar ile semptomatik tedavisinin modifikasyonu açısından, inflamasyonda rol oynayan yeni adipositokinlerin endometriozisteki rolünün açıklanması önemlidir.

### III. Materyal ve Yöntem

Laparoskopi ile endometriozis te hissi konulduktan sonra kontrol (n=20) ve endometriosis (n=20) grupları olu turuldu. Ara tırmada a a ıda belirtilen yöntemler izlendi:

a) Gruplardan kan örneklerinin toplanması ve serum elde edilmesi

Çalı mada endometriozis (n=20) ve kontrol grupların (n=20) veninden alınan kan örnekleri BD Vacutainer SST II Advance serum ayırıcı tüplere alındı ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. Serumlar alikuatlanarak -80°C'ye konuldu.

b) Serumda adipositokin (Omentin, Visfatin, Vaspın, risin) ve inflamasyon belirteçlerinin (CRP) konsantrasyonlarının ELISA ile ölçülmesi

Tüm standartlar ve örnekler iki er tekrarlı olarak çalı ıldı. Her standart ve örnekten kuyucuklara 100 µL ilave edildi. Pla ın üstü yapı kan bantlı jelatin ile kapatıldı ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kuyucukların içeri i bo altıldı ve her bir kuyuya 100'er µL 1X konsantrasyonda biyotinlenmi Omentin, Visfatin, Vaspın, risin ve CRP antikorundan konuldu ve mikroplak 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar bo altıldı ve 3 kez 200 µL yıkandı. Her bir kuyucu a 100 µL 1X konsantrasyonda HRP konjugattan konuldu ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tekrar kuyucuklar 5 kez yıkandı. Kuyucuklara 90 µL substrat solüsyonundan konulduktan sonra pla ın üstü kapatıldı ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Her kuyuya 50 µL reaksiyonu durdurma solüsyonundan ilave edildikten hemen sonra kuyucukların absorbans de erleri 450 nm'de okundu. Standartların konsantrasyonları ve absorbanslarından yararlanılarak çizilen standart e ri yardımıyla serumdaki Omentin, Visfatin, Vaspın, risin ve CRP düzeyi hesaplandı.

c) Kandan total RNA izolasyonu

EDTA'lı tüplerde alınan 400 µl kan, 400 µl lizis tomponu ile 10 µl proteinaz K ile karı tırılarak oda sıcaklı ında 15 dakika inkibe edildi. Daha sonra, 400 µl %70'lik etanol eklenerek bu karı ım RNA izolasyon kitindeki NükleoSpin RNA kolonuna yüklendi ve 11000xg'de 30 saniye boyunca santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda toplama tüpünde kalan sıvı uzakla tırıldı ve NükleoSpin RNA kolonundaki silika membran üzerine 350 µl membrandaki tuzu uzakla tırmayı sa layan tampondan konuldu. Kolon 11000xg'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek membranın tuzdan kurtarılması sa landı. 90 µl DNase ve 10 µl DNase reaksiyon tamponu karı tırılarak NükleoSpin RNA kolondaki silika membranın merkezine yüklendi ve 15 dakika süresince silika membranın DNase reaksiyon karı ımı ile inkübe olması sa landı. NükleoSpin RNA kolonuna sırasıyla yüklenen 200 µl RAW2, 600 µl RA3 yıkama tamponları ile kolonun 11000xg'de 30 saniye boyunca santifüj edilmesi ile silika membran yıkandı. En son yıkama a aması ise kolona yüklenen 250 µl RA3'ün kolonun 11000xg'de 2 dakika boyunca santifüj edilmesi ile yapıldı. 50 µl RNase içermeyen suyun NükleoSpin RNA kolonundaki silika membranın merkezine yüklenip kolonun 11000xg'de 2 dakika boyunca santifüj edilmesi ile RNA izolasyonu yapıldı.

e) Total RNA'dan cDNA sentezi

cDNA sentezi, her bir örnekte 340 nanogram RNA olacak ekilde ve kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. Örnekler 65°C'de 5 dakika süresince su banyosunda inkübe edildi ve örnekler hızlı bir ekilde buz blo una alındı ve a a ıda belirtilen ekilde hazırlanan karı ımdan her bir tüpe 12 µl ilave edildi ve 42°C'de 1 saat ve 80°C'de 5 dakika olacak ekilde kitteki PCR protokolüne uygun olarak cDNA sentezi yapıldı.

f) E Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time PCR, RT-PCR) ile Plasmada Visfatin ve Vaspın Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Visfatin primer tasarımı, insana spesifik olarak "Ensembl genome browser" ve "Primer3 input" programları kullanılarak yapıldı. Son konsantrasyonları 10 µM konsantrasyonda olacak ekilde nükleaz içermeyen su ile visfatinin ileri ve geri primerlerinin dilüsyonları yapıldı. Visfatin geni için her bir örne e ait cDNA'lar 1/5 oranında dilüsyonu yapılarak RT-PCR optimizasyonu yapıldı. 95°C'de 2 dakika (1 siklus), 95°C 15 saniye ve 60°C 60 saniye (40 siklus) olacak ekilde GoTaq® qPCR Master Mix kiti protokolüne uygun olarak CFX374 Biorad cihazında RT-PCR sentezi yapıldı. Tüm reaksiyonlar iki er tekrarlı olarak yapıldı. Amplifikasyon reaksiyonlarının spesifitesi erime e risi (Tm) analizleri ile do rulandı. Hedef genlerin ekspresyonları relatif kantifikasyon metodu ile de erlendirildi.

Visfatin'in insana spesifik olarak sentezlenen ileri ve geri primerleri

Forward primer: TCGGTTCTGGTGGAGGTTTG

Reverse primer CAAAATTCCCTGCTGGCGTC

Vaspin'in insana spesifik olarak sentezlenen ileri ve geri primerleri

Forward primer: TACTGGGGATGTGGGGAGAG

Reverse primer: TGTAGGGCCGATGAGTCAGA

Beta aktin'in insana spesifik olarak sentezlenen ileri ve geri primerleri

Forward primer: ACCTGCATTTCTGGGAGTG

Reverse primer: GACAGCCACGATCCCATAGG

g) statiksel analiz

Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak sunulur ve iki grup arasındaki ortalama de erler Student t testi ile kar ıla tırıldı. Bildirilen tüm güven aralı ı de erleri % 95 seviyesinde hesaplandı. p de eri 0,05'in altında ise kar ıla tırma sonucu istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### IV. Analiz ve Bulgular

1) Kontrol ve endometriozis gruplarından alınan serum örneklerindeki omentin konsantrasyonu Kontrol grubundaki serum omentin düzeyi ( $26,26 \pm 5,48$  ng/mL) ile endometriozis grubu ( $26,5 \pm 3,3$  ng/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,861$ ). Dosya yükleme bölümünde Grafik 1’de sonuç verilmiştir.

2) Kontrol ve endometriozis gruplarından alınan serum ve plazma örneklerindeki vaspin konsantrasyonu ve gen ekspresyon düzeyi Kontrol grubundaki serum vaspin düzeyi ( $467,44 \pm 356,79$  pg/mL) ile endometriozis grubu ( $290,98 \pm 138,64$  pg/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,213$ ). Dosya yükleme bölümünde Grafik 2’de sonuç verilmiştir.

Kontrol grubu plazma vaspin gen ekspresyon düzeyi ( $1 \pm 0,797$ ) ile endometriozis grubu ( $0,474 \pm 0,473$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,042$ ). Endometriozis grubunda plazmadaki vaspin gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Dosya yükleme bölümünde Grafik 3’de sonuç verilmiştir.

3) Kontrol ve endometriozis gruplarından alınan serum örneklerindeki irisin konsantrasyonu Kontrol grubundaki serum irisin düzeyi ( $53,20 \pm 32,38$  ng/mL) ile endometriozis grubu ( $89,44 \pm 34,08$  ng/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,024$ ). Endometriozis grubunda serum irisin konsantrasyonu, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Dosya yükleme bölümünde Grafik 4’de sonuç verilmiştir.

4) Kontrol ve endometriozis gruplarından alınan serum ve plazma örneklerindeki visfatin konsantrasyonu ve gen ekspresyon düzeyi Visfatin düzeyinin tayini için Cusabio marka CSB E08940h katalog numaralı Elisa kiti kullanılmıştır. Ancak kitte sadece standartların olduğu kuyular çalışmamıştır. Serumların olduğu kuyulardaki absorbans değerleri görünür absorbansından düşük çıktı için deney tekrar yeni bir kit temin edilince tekrar edilecektir. Serumdaki visfatin düzeyi ölçülemediğinden, plazmada visfatin gen ekspresyonu tayin edilmiştir. Kontrol grubu plazma visfatin gen ekspresyon düzeyi ( $1 \pm 0,738$ ) ile endometriozis grubu ( $0,187 \pm 0,163$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,00097$ ). Endometriozis grubunda plazmadaki vaspin gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Dosya yükleme bölümünde Grafik 5’de sonuç verilmiştir.

5) Kontrol ve endometriozis gruplarından alınan serum örneklerindeki CRP konsantrasyonu CRP düzeyinin tayini için Elabscience marka E-EL-H0043 katalog numaralı Elisa kiti kullanılmıştır. Ancak serumların olduğu kuyulardaki absorbans değerleri, en yüksek konsantrasyondaki standartın absorbans değerinden yüksek çıktı için deney tekrar yeni bir kit temin edilince, serum örnekleri dilüe edildikten sonra tekrar edilecektir.

#### V. Sonuç ve Öneriler

Omentin, visfatin, vaspin ve irisin adipositokinlerinin endometriyozisteki rolü ile ilgili bir çalışmaya literatürde bulunmamaktadır. Endometriozis grubunda serumdaki irisin düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Serum omentin ve vaspin düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Endometriozis grubundan alınan plazma örneklerindeki visfatin ve vaspin gen ekspresyonu, kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İnflamasyonla ilgili bu adipositokinlerin, kronik inflamasyonun rol aldığı bir hastalık olan endometriyozisle ilgili kisinin açıklanması açısından daha ileri düzeyde moleküler teknikler kullanılarak literatüre katkıda bulunulmalıdır.



## VI. Gelece e li kin Öngörülen Katkılar

Yeni adipositokinlerin endometriozisteki rolünü anlamak için daha ileri düzeyde ve geni çapta klinik ara tırmaların yapılması gerekmektedir. Yeni adipositokinlerin etki mekanizmasının aydınlatılması ve bu adipositokinlerin di er inflamatuvar sitokinlerle ili kisinin de erlendirilmesi endometriozis patogenezinin anla ılmasında ve endometriozis tedavisinin modifikasyonu açısından önemli yer te kil etmektedir.

## VII. Sa lanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekle tirilen Projeler

Yoktur.

## VIII. Sa lanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve E itim Alanlarındaki Katkıları

Yoktur.

## IX. Kaynaklar

1. Zondervan, K.T., et al., Endometriosis. Nat Rev Dis Primers, 2018. 4(1): p. 9.
2. Oh, Y.K., et al., Increased expression of resistin in ectopic endometrial tissue of women with endometriosis. Am J Reprod Immunol, 2017. 78(5).
3. Juge-Aubry, C.E., E. Henrichot, and C.A. Meier, Adipose tissue: a regulator of inflammation. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. 19(4): p. 547-66.
4. Choi, Y.S., H.K. Oh, and J.H. Choi, Expression of adiponectin, leptin, and their receptors in ovarian endometrioma. Fertil Steril, 2013. 100(1): p. 135-41 e1-2.
5. Jin, C.H., et al., Chemerin Expression in the Peritoneal Fluid, Serum, and Ovarian Endometrioma of Women with Endometriosis. Am J Reprod Immunol, 2015. 74(4): p. 379-86.
6. Tuten, A., et al., Serum YKL-40 levels are altered in endometriosis. Gynecol Endocrinol, 2014. 30(5): p. 381-4.
7. Yi, K.W., et al., Resistin concentration is increased in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Am J Reprod Immunol, 2010. 64(5): p. 318-23.

## X. Ekler

### a) Mali Bilanço ve Açıklamaları:

Proje bütçesi kısmında ve proforma faturalarda yer alan tüm sarf malzemeler, bu proje kapsamındaki i paketlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılmı tır.

Harcanan 19.968,50 TL

Kalan 31,50 TL

Toplam 20.000 TL

### b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve lerindeki Kullanımına Dair Açıklamalar:

Yoktur.

### c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar :

Yoktur.

### d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı ve Yönlendirilmi Projeler için uygulanmaz):

Projeden elde edilen verilerden henüz poster sunumu (bildiri) yapılmamı tır.

### e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (Altyapı ve Yönlendirilmi Projeler için uygulanmaz):

Projeden elde edilen verilerden henüz yayın yapılmamı tır.