

**ADAM NAJAFI**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2018**

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BOY KISALIĞININ GENETİK ETİYOLOJİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ADAM NAJAFLI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. BİRSEN KARAMAN**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BOY KISALIĞININ GENETİK ETİYOLOJİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ADAM NAJAFLI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. BİRSEN KARAMAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN  
DR. GÜVEN TOKSOY**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

**TEZ ONAYI****YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Adam NAJAFLI tarafından Doç. Dr. Birsen KARAMAN'ın danışmanlığında hazırlanan **“Boy Kısalığının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması”** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17.08.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

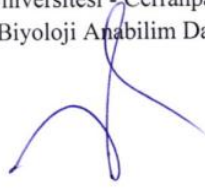
**Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER**

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



**Prof. Dr. Ayhan DEVİREN**

İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Tıp Fak.  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



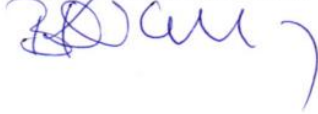
**Prof. Dr. Firdevs BAŞ**

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağ. ve Hast. A.D.



**Doç. Dr. Birsen KARAMAN**

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



**Dr. Öğr. Üyesi Yaman SAĞLAM**

Maltepe Üni. Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ADAM NAJAFLI



## İTHAF

Dedeme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Aileme ve başta danışman hocam sayın Doç. Dr. Birsen KARAMAN olmak üzere yüksek lisans eğitimimde, bu tezin hazırlanmasında emeği geçen, desteğini esirgemeyen bütün hocalarıma, arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-26405

## İÇİNDEKİLER

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI .....                                              | İİ   |
| BEYAN.....                                                   | İİİ  |
| İTHAF.....                                                   | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                            | VI   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                        | İX   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                       | X    |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                        | Xİ   |
| ÖZET .....                                                   | Xİİ  |
| ABSTRACT.....                                                | Xİİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                        | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                      | 3    |
| 2.1. Büyüme .....                                            | 3    |
| 2.2. Büyümeyi ve Gelişmeyi Etkileyen Faktörler.....          | 3    |
| 2.2.1. Doğum Öncesi Dönem.....                               | 4    |
| 2.2.1.1. Genetik Yapı .....                                  | 4    |
| 2.2.1.2. Büyüme Faktörleri ve Hormonlar .....                | 4    |
| 2.2.1.3. Uterus içi ortam faktörleri.....                    | 5    |
| 2.2.2. Doğum Sonrası Dönem.....                              | 6    |
| 2.2.2.1. Genetik Yapı .....                                  | 6    |
| 2.2.2.2. Beslenme ve Metabolizma ile İlişkili Etmenler ..... | 6    |
| 2.2.2.3. Hormonal Faktörler.....                             | 6    |
| 2.2.2.4. Kronik Hastalıklar .....                            | 7    |
| 2.3. Büyümenin Değerlendirilmesi ve Referans Değerler .....  | 8    |
| 2.4. BOY KISALIĞI.....                                       | 9    |
| 2.4.1. Boy Kısaliğına Yaklaşım .....                         | 15   |
| 2.4.2. Boy Kısaliğının Sınıflandırılması .....               | 18   |
| 2.4.2.1. Klinik Sınıflandırma.....                           | 19   |
| 2.4.2.2. Genetik Sınıflandırma .....                         | 30   |
| 2.5. Tanıda Kullanılan Yöntemler .....                       | 34   |
| 2.5.1. Sitogenetik Yöntemler .....                           | 34   |

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.1.1. Klasik Sitogenetik Yöntemler .....                                                                                                 | 35 |
| 2.5.1.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler .....                                                                                              | 35 |
| 2.5.2. Moleküler Yöntemler .....                                                                                                            | 37 |
| 2.5.2.1. DNA Dizileme Yöntemleri .....                                                                                                      | 37 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                                                                                    | 43 |
| 3.1. Yöntemler .....                                                                                                                        | 43 |
| 3.1.1. Klinik Değerlendirmeler .....                                                                                                        | 43 |
| 3.1.2. Moleküler Yöntemler .....                                                                                                            | 43 |
| 3.1.2.1. DNA Eldesi .....                                                                                                                   | 43 |
| 3.1.2.2. DNA Kalite Değerlendirme, Seyreltme ve DNA Yoğunluğunun Ölçümü ..                                                                  | 43 |
| 3.1.2.3. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi .....                                                                                  | 44 |
| Ion Torrent Platformu .....                                                                                                                 | 44 |
| Hedef Genlerin Belirlenmesi .....                                                                                                           | 46 |
| Primer Havuzlarının Oluşturulması .....                                                                                                     | 47 |
| Hedef Bölgelere Ait <i>Hotspot</i> Mutasyon Dosyasının Oluşturulması .....                                                                  | 48 |
| Kütüphane Hazırlanması .....                                                                                                                | 49 |
| <i>Barkodlanan Ürünlerin Saflaştırılması</i> .....                                                                                          | 51 |
| <i>Saflaştırılmış Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçümü ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama</i> .....                                            | 51 |
| Taslak Hazırlanması .....                                                                                                                   | 53 |
| Dizileme .....                                                                                                                              | 56 |
| Verilerin Analizi .....                                                                                                                     | 57 |
| 3.1.2.4. YND ile Saptanan Değişimlerin ve Panel-Gen Testi ile Kapsanmayan veya Derinliği Düşük Bölgelerin Sanger Dizileme Çalışmaları ..... | 58 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                                           | 62 |
| 4.1. Olguların Fizik Muayene, Laboratuvar ve Genetik Analiz Sonuçları .....                                                                 | 62 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                                                           | 72 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                             | 81 |
| HAM VERİLER .....                                                                                                                           | 86 |
| ETİK KURUL KARARI .....                                                                                                                     | 87 |
| FORMLAR .....                                                                                                                               | 90 |
| PATENT HAKKI İZNİ .....                                                                                                                     | 98 |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI .....                                                                                                            | 99 |

|                |     |
|----------------|-----|
| ÖZGEÇMİŞ ..... | 101 |
|----------------|-----|

## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2-1. Turner stigmatları.....                                                                                                   | 21 |
| Tablo 2-2. Büyümeyi etkileyen kronik hastalıklar. ....                                                                               | 26 |
| Tablo 2-3. Dizileme platformlarının karşılaştırılması [44]’ten alınarak yeniden düzenlenmiştir.....                                  | 40 |
| Tablo 2-4. Yeni Nesil Dizileme uygulamalarının karşılaştırılması [57].....                                                           | 42 |
| Tablo 3-1. <i>In silico</i> analiz yazılımları. ....                                                                                 | 46 |
| Tablo 3-2. Panel tasarımında yer alan genler. ....                                                                                   | 47 |
| Tablo 3-3. Panel-gen testinde yer alan genler, kapsam oranları, ilişkili olduğu hastalıklar ve hastalıkların kalıtım kalıpları. .... | 47 |
| Tablo 3-4. Primer havuzu (2x) için hazırlanan karışım. ....                                                                          | 49 |
| Tablo 3-5. Kütüphane PZR için hazırlanan karışım. ....                                                                               | 49 |
| Tablo 3-6. Hedef bölge amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.....                                                       | 50 |
| Tablo 3-7. Primerlerin kesimi için kullanılan termal döngü programı. ....                                                            | 50 |
| Tablo 3-8. Barkod-adaptör karışımı.....                                                                                              | 50 |
| Tablo 3-9. Barkod-adaptör ligasyon karışımı ve termal döngü programı. ....                                                           | 51 |
| Tablo 3-10. Kütüphane amplifikasyonu için termal döngü programı. ....                                                                | 52 |
| Tablo 3-11. Kütüphane seyreltilmesi.....                                                                                             | 54 |
| Tablo 3-12. emPZR çözeltisi. ....                                                                                                    | 54 |
| Tablo 3-13. 8 kuyulu levhanın doldurulması.....                                                                                      | 56 |
| Tablo 3-14. Dizileme planı. ....                                                                                                     | 57 |
| Tablo 4-1. Genetik analiz sonuçlarına genel bakış. ....                                                                              | 63 |
| Tablo 4-2. Olgularda saptanan kromozom anomalileri. ....                                                                             | 63 |
| Tablo 4-3. Olguların YND analizi sonuçları. ....                                                                                     | 64 |
| Tablo 4-4. Olguların fizik muayene bulguları. ....                                                                                   | 65 |
| Tablo 4-5. Olguların laboratuvar ve görüntüleme bulguları.....                                                                       | 65 |
| Tablo 4-6. Moleküler analiz uygulanan hastaların başvuru ve son değerlendirme sırasındaki bulguları.....                             | 66 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1. BH sinyal yolağı.....                                                      | 7  |
| Şekil 2-2: Normal dağılım eğrisi. ....                                                | 9  |
| Şekil 2-3. Boy persantil eğrisinde patolojik alt sınırın gösterilmesi [4]. ....       | 11 |
| Şekil 2-4. 2-18 yaş aralığındaki boy uzunluğu persantil eğrileri [14]. ....           | 12 |
| Şekil 2-5. İlk 5 yaşta kemik olgunlaşması. ....                                       | 14 |
| Şekil 2-6. 6-13 yaş arası kemik olgunlaşması.....                                     | 15 |
| Şekil 2-7: ACMG sınıflandırma ve tanı algoritması.....                                | 19 |
| Şekil 2-8. Büyümenin regülasyonunda bazı genetik faktörlerin etkisi. ....             | 34 |
| Şekil 2-9. Sanger Dizileme'nin aşamaları. ....                                        | 38 |
| Şekil 3-1. <i>Ion Torrent</i> platformunda sinyal işleme ve baz isimlendirme. ....    | 45 |
| Şekil 3-2. <i>Ion OneTouch 2</i> cihazında emülsiyon PZR.....                         | 55 |
| Şekil 3-3. <i>Ion OneTouch<sup>TM</sup> ES</i> cihazında zenginleştirme aşaması. .... | 56 |
| Şekil 4-1. FISH incelemesinde saptanan <i>SHOX</i> delesyonu. ....                    | 62 |
| Şekil 5-1. Kromozom analizinde saptanan <i>de novo</i> 18p delesyonu. ....            | 74 |
| Şekil 5-2. <i>LHX4</i> proteini [96]. ....                                            | 78 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

|              |                                                      |
|--------------|------------------------------------------------------|
| <b>a-CGH</b> | : Microarray-based Comparative Genomic Hybridization |
| <b>BAM</b>   | : Binary Alignment Map                               |
| <b>bç</b>    | : Baz çifti                                          |
| <b>BH</b>    | : Büyüme hormonu                                     |
| <b>BHE</b>   | : Büyüme hormonu eksikliği                           |
| <b>ÇHHE</b>  | : Çoklu hipofiz hormon eksikliği                     |
| <b>dNTP</b>  | : Deoksiribonükleotid trifosfat                      |
| <b>ddNTP</b> | : Dideoksinükleotid                                  |
| <b>DSÖ</b>   | : Dünya Sağlık Örgütü                                |
| <b>dn</b>    | : <i>de novo</i>                                     |
| <b>EDTA</b>  | : Etilendiamin tetraasetik asit                      |
| <b>ExAC</b>  | : Exome Aggregation Consortium                       |
| <b>FISH</b>  | : Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon              |
| <b>FSH</b>   | : Folikül stimulan hormon                            |
| <b>HGMD</b>  | : Human Gene Mutation Database                       |
| <b>HRBT</b>  | : High-Resolution Banding Technique                  |
| <b>IGF</b>   | : Insulin-like growth factor                         |
| <b>IGFBP</b> | : IGF bağlayıcı protein                              |
| <b>IUBG</b>  | : İntrauterin büyüme geriliği                        |
| <b>LH</b>    | : Luteinizan hormon                                  |
| <b>OMIM</b>  | : Online Mendelian Inheritance in Man                |
| <b>PZR</b>   | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                        |
| <b>SDS</b>   | : Standart deviasyon skoru                           |
| <b>TED</b>   | : Tüm Ekzom Dizleme                                  |
| <b>TGD</b>   | : Tüm Genom Dizileme                                 |
| <b>TSS</b>   | : Torrent Suit Server                                |
| <b>VCF</b>   | : Variant Call Format                                |
| <b>YND</b>   | : Yeni Nesil Dizileme                                |

## ÖZET

Najafli, A. Boy Kısalığının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018.

Boy uzunluğunun 3. persantilin, boy uzama hızının 25. persantilin altında olması, öngörülen boyun hedef boya göre 8,5 cm veya daha kısa olması ve kemik yaşının kronolojik yaşa göre ileri ( $> 2$  SD) olması gibi durumlar boy kısalığının tanımında yer alan başlıca kriterlerdir. Klinik olarak patolojik ve non-patolojik olmak üzere iki ana sınıf altında toplanan boy kısalıkları genetik olarak kromozomal, tek gen ilişkili ve multifaktoriyel olarak incelenmektedir. Birçoğu muayene sırasında klinik tanı alsa da kesin tanı amacıyla genetik etkeni bilinenlere sitogenetik ve moleküler testlerin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada klinik olarak idiyopatik boy kısalığı tanısı alan 189 olguda sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler kullanılarak genetik etiyojinin araştırılması planlandı. Normal kromozom kuruluşu saptanan 41 olguda ilişkili 10 gen (*GH1*, *GHR*, *GHRH*, *GHSR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *IGFBP3*, *SHOX* ve *STAT5B*) ve çoğul hipofiz hormon eksikliği (ÇHHE) ile ilişkili 15 gen panel-gen testi ile Ion Torrent platformunda yeni nesil dizileme (YND) yöntemi ile incelendi. Beş olguda beş farklı gende (*BMP4*, *GHR*, *IGSF1*, *LHX4* ve *PROKR2*) (biri boy kısalığı, dördü ÇHHE genlerinde) biri yeni, biri daha önce ilişkilendirilmiş ve üçü veri tabanlarında yer alan olmak üzere anlamlı olduğu düşünülen toplam beş varyant saptandı. Klinik öneme sahip olduğu düşünülen bu değişimler Sanger dizileme yöntemi ile doğrulandı ve segregasyon analizi yapıldı. Dört heterozigot değişimin ailedeki sağlıklı bireylerde de bulunduğu, homozigot değişim saptanan bir olguda ise ebeveynlerin heterozigot taşıyıcı oldukları gösterildi. Türkiye’de boy kısalığı ile ilişkili ilk panel-gen test uygulaması olan çalışmamızın etiyojide rol oynayan genetik faktörlerin açıklanmasına, fenotip-genotip ilişkilerin açıklanmasına ve özgün genetik danışmaya katkı sağlaması beklendi. Boy kısalığının geniş bir genetik spektruma sahip olması nedeniyle hedefli panellerle çalışmanın araştırmada yeterli olmadığına, bu tür incelemelerin indeks olgu ve ebeveynleri içeren, sağlıklı kontrol grubuyla paralel olarak tüm ekzom veya tüm genom dizileme çalışmaları ile yapılmasının daha doğru bir yaklaşım olacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** boy kısalığı, genetik, yeni nesil dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-26405

## ABSTRACT

Najafli, A. Investigation of Genetic Etiology of Short Stature. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis in Genetics. Istanbul. 2018.

The main criteria of short stature are: height below 3<sup>rd</sup> percentile, growth rate below 25<sup>th</sup> percentile, height being 8.5 cm shorter than the target stature, and the bone age being older than the chronological age ( $>2$  SD). Short stature is divided into two categories as being clinically pathological and non-pathological, and are further divided into subgroups associated with different level of genetic factors such as chromosomal, single gene and multifactorial. Although many of the cases are clinically diagnosed during physical examination, cytogenetic and molecular tests are recommended if genetic cause is expected.

In this study, we aimed to elucidate the genetic etiology of 189 clinically diagnosed short stature patients. All of the patients are first evaluated with cytogenetic analysis that followed with molecular tests for the cases with normal karyotypes. Molecular test compromised of the investigation of 10 genes associated with short stature (*GH1*, *GHR*, *GHRH*, *GHSR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *IGFBP3*, *SHOX* and *STAT5B*) and 15 genes associated with combined pituitary hormone deficiency (CPHD) packed as panel-gene on Ion Torrent platform. Five different variants in five cases expected to have significant clinical impact (*BMP4*, *GHR*, *IGSF1*, *LHX4* and *PROKR2*) are identified. Only one of those was previously associated, three were rare variants annotated in databases and one was novel. Mutations that were thought to have clinical importance are confirmed by Sanger sequencing. Segregation studies had revealed that four of the heterozygous alterations were also identified in healthy family individuals and one homozygous change was shown to be inherited from heterozygous parents. Our panel-gene test for short stature was in-house designed for the first time in Turkey and our findings are expected to elucidate genetic factors that play a role in the etiology of this phenotype, to reveal genotype-phenotype correlations and to contribute to the personalized genetic counseling. Since short stature has a high genetic heterogeneity, we determined that gene panel is not competent and that proper approach should be to investigate index individuals, their parents and healthy controls by means of whole exome or whole genome sequencing.

**Key Words:** short stature, genetic, next generation sequencing

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2017-26405

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağında boy uzamasında yavaşlama, duraklama çoğu zaman önemli bir sağlık sorunu veya hastalığın habercisidir. Boy kısalığı, boyun yaş ve cinsiyete göre 3. persantilin (veya  $-2$  SDS) altında olması, boy uzama hızının düşük olması ( $<25$ . persantil), öngörülen boyun, hedef boydan 8.5 cm'den daha kısa olması, yaşa göre boy kısa olmasa da kemik yaşının kronolojik yaşa göre çok ( $>2$  SDS) ileri olması (bü-yüme potansiyelinde azalma) gibi parametrelerle açıklanmaktadır. Ağır boy kısalığı vakalarında boy, genellikle  $-3$  SDS'nin altında olmaktadır [1-3].

Ülkemizde de boy kısalığı nedeniyle çocuk hekimlerine, sağlık kuruluşlarına başvuru sıklığı son yıllarda giderek artmaktadır. Boy kısalığı sebebiyle başvuran olgularda etiyoolojiye yönelik yapılan çalışmalarda olguların %85-95'inde patolojik olmayan, normalin varyantı olarak değerlendirilen boy kısalığı olduğu bildirilmiştir [4]. Okul çağındaki çocuklarla yapılan bir çalışmada çocukların %5.1'inde boy kısalığı saptanmıştır [5].

Etiyoolojiye yönelik çalışmalarda genetik yapının ve non-genetik etmenlerin boy kısalığı ile olan ilişkisi kadar çevresel faktörlerin de geniş bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Tüm incelemelere rağmen olguların önemli bir bölümünde etiopatogenez halen tam olarak aydınlatılamadığından açıklanamayan boy kısalıklarında yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [6, 7].

Boy kısalığı, normalin varyantı (patolojik etmeni bilinmeyen) ve patolojik boy kısalığı (patolojik etmeni bilinen) olarak iki ana grup altında incelenmektedir. Birinci grup genellikle konstitusyonel, ailevi ve idiyopatik boy kısalığı olan olgulardan oluşmaktadır. İkinci grup ise etiyoojisinde genetik ve endokrinolojik nedenlerin bulunduğu olgulardan oluşmakta ve kendi içinde orantılı ve orantısız boy kısalıkları olarak sınıflandırılmaktadır. Her iki grupta da öykü, fizik muayene ve ölçümlerden sonra olası tanıya yönelik testler planlanarak patolojik olan ve olmayan durumların ayırt edilmesi önem taşımaktadır. Etiyoolojiye yönelik tetkiklerin başında kronik hastalık taramalarının yapılması, kemik olgunlaşmasının belirlenmesi gereklidir.

Büyüme hormonu (BH) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1) sisteminin incelenmesi normal ve patolojik büyümenin anlaşılması için yol gösterici olmaktadır. Ancak normal büyümenin anlaşılması için BH-IGF-1 ekseninin tek başına yeterli olmadığı bilinmektedir, Çok sayıda hormon, parakrin faktörler,

ekstrasellüler matriks molekülleri ve intrasellüler proteinler büyüme plağına etki ederek büyümeyi düzenlemekte, BH-IGF-1 eksenini dışındaki birçok mekanizmanın ve çok sayıda genin büyümeyi etkilediğı düşünülmektedir. Lokal proteinleri kodlayan bazı genlerdeki mutasyonların da boy kısalığının nedeni olabildiğı gösterilmiştir. Tüm genom incelemeleri ile her geçen gün büyümeyi düzenleyen yeni genler ve bu genlerdeki mutasyonlar tanımlanmaktadır. Yeni gen/mutasyonların anlaşılması ise etiyopatogenezin aydınlatılması, yeni yolların belirlenmesinin yanı sıra yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada, kronik hastalıklar, hormonal bozukluklar veya iskelet displazisi dışlanmış idiyopatik boy kısalığı olgularında, algoritmik bir yaklaşım ile ilk aşamada sitogenetik incelemeler yapıldı ve kromozom anomalisi dışlanan olgularda *SHOX* geni delesyonları fluoresan in situ hibridizasyon tekniğı ile araştırıldı. Bu çalışmalarda anomali saptanmayan olgular, boy kısalığı ile ilişkili olduğu bilinen genlerdeki olası mutasyonları araştırmak amacıyla Yeni Nesil Dizileme (YND) tekniğı kullanılarak kendi tasarladığımız panel gen yaklaşımı ile incelendi.

Bu çalışmanın sonucunda, toplumumuzdaki boy kısalığı etiyolojisinde rol oynayan genetik faktörlerin belirlenmesi ve etiyopatogenezin aydınlatılabildiğı olgularda aileye özgün genetik danışma verilebilmesi ve saptanan anomali sıklığına göre yeni bir tanı algoritması oluşturulabileceğı öngörüldü.

## 2. GENEL BİLGİLER

Boy uzunluğunun toplumda sosyal statü kazandırdığı, sağlıklı, başarılı ve prestijli olmayı sembolize ettiği birçok sosyolojik çalışmada ortaya konmuştur. I. Dünya Savaşı sırasında Britanya'da askere alınma kriterleri içinde boy uzunluğunun minimum 160 cm olması gerektiği yer alıyordu. Bu nedenle boyları 160 cm'nin altında olan binlerce erkek orduya alınmadı. Baskılar sonucunda onların da savaşa katılmasına izin verildi, hatta 152-160 cm'lik erkeklerden oluşan özel Bantam Taburları oluşturuldu. Savaşın sonunda, her biri yaklaşık 1000 erkekten oluşmak üzere 29 tane Bantam Taburu oluşturulmuştu [8].

Boy kısalığı ile ilgili yapılan PUBMED taramasında ilgili kayıtlı ilk çalışmanın Dwarfizm konulu olup 1910 yılında yayınlandığı görülmektedir [9]. Daha sonra 1947 yılında yayınlanan Ovarian agenesis with dwarfism başlıklı çalışma ise boy kısalığı ile ilişkili ilk yayın kabul edilmiştir [10].

Büyümeyi etkileyen genetik ve nongenetik birçok faktör bulunmaktadır. Bu da boy kısalığı ile ilgili çalışmaları güçleştirmektedir.

### 2.1. Büyüme

Zigot olarak başlayan yaşam hücre bölünmeleri, organogenez gibi süreçlerden geçerek doğuma ve sonrasında ölüme kadar devam eder. Bu sürecin başından itibaren vücut hacminde ve kütlesinde görülen artış büyüme, biyolojik işlevlerin kazanılması için hücre ve organların yapı bileşimindeki değişimler ise gelişme olarak ifade edilir. Sağlıklı bir çocuk kronolojik yaşa uygun vücut büyümesi, fizyolojik olgunlaşma ve zeka gelişimi gösteren, hastalık belirtileri göstermeyen çocuktur.

### 2.2. Büyümeyi ve Gelişmeyi Etkileyen Faktörler

Büyüme süreci doğum öncesi ve doğum sonrası olarak iki evrede incelenir. Her iki dönemde de genetik faktörler ve hormonlar, dokuya özgü büyüme faktörleri, çevre faktörleri gibi genetik olmayan birçok etmen bu süreci etkilemektedir. Hangi etmenin ne zaman etkin olduğu, süresi ve ağırlığı büyüme-gelişme bozukluğunun derecesi hakkında fikir verir.

## 2.2.1. Doğum Öncesi Dönem

### 2.2.1.1. Genetik Yapı

Çocuğun ebeveynlerden edindiği genetik yapı, genlerin karşılıklı ilişkisi büyüme-gelişme potansiyelini belirler. Hem cinsiyet kromozomları, hem de otozomlar üzerinde büyümeyi etkilediği bilinen birçok gen bulunmaktadır. Embriyo döneminde büyüme genetik olarak programlanmış olaylar sonucu gelişir. Erken embriyonal dönemde bile olumsuz ortam koşullarının etkisiyle genetik programlama ve ekspresyonda değişiklikler oluşabileceği, bunun düşük doğum ağırlığı ve ileri yaşlarda kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon ve tip 2 diyabet gibi hastalıkların gelişmesine neden olabileceği bildirilmektedir. Uzun boylu ailelerin çocukları uzun, kısa boylu ailelerin çocukları kısa olmaya eğilimlidir [1].

### 2.2.1.2. Büyüme Faktörleri ve Hormonlar

Konjenital hipotiroidi ve çoğul hipofiz hormon eksikliklerinde (ÇHHE) doğum ağırlığı normal aralıklarda olduğu için tiroid ve büyüme hormonu ile prenatal büyüme arasında ilişki olmadığı düşünülmektedir. Ancak hücre bölünmesi ve farklılaşmasını uyaran insüline benzer büyüme faktörlerinin (IGF) fetal büyümeye önemli etkileri vardır. Fetal dönemde IGF-2, IGF-1'e göre daha etkilidir. Plasental somatomamotropinler (laktojenler) IGF-1 ve IGF-2 sentezini uyarır. Prenatal dönemde büyüme hormonunun IGF-1 üzerine etkisi hemen yok gibidir. IGF'lerin etkinliği IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) tarafından düzenlenir. IGFBP-1 ve IGFBP-2 düzeyleri fetal kanda ve amniyotik sıvıda yüksektir. IGF'ler dışında epidermal büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü, fibroblast pnömonosit faktör, fibroblast büyüme faktörü, endotelin gibi faktörlerin de fetal büyüme üzerinde etkisi olduğu bildirilmektedir. İnsülin de fetal büyüme ve doğum ağırlığı üzerine etkilidir. İnsülin, anabolik etkisi ile besinin alımı ve kullanımını sağlar. Fetal dokudan büyüme faktörlerinin salınmasına neden olur. İnsülinin fetal lipojenik etkisi, gebeliğin 3. trimesterinde yağ dokusunun oluşumunu sağlayarak, protein sentezinin ve hepatik glikojen deposunun oluşumuna neden olur.

Yağ hücrelerinden salgılanan ve iştahı düzenleyen hormon olan leptin'in de fetusun büyümesi ve beslenmesinin düzenlenmesi üzerine etkisi vardır. Doğum ağırlığı ve vücut kitle indeksi (VKİ) ile leptin arasında güçlü pozitif bir ilişki vardır.

Gebeliğin ikinci yarısında fetusta östradiol, testosteron ve dihidroepiandrosteron düzeyleri ergen erkeklerdekine eşit veya daha yüksetir. Östrojen fetal kemik

olgunlaşmasını, androjenler ise daha belirgin anabolik etkileriyle gestasyon yaşına göre ağırlığın erkek çocuklarda kızlara göre yüksek olmasına neden olur.

### 2.2.1.3. Uterus içi ortam faktörleri

Sağlıklı bir çocuk için anneden çocuğa zararlı olabilecek bozuklukların bulunmaması, uterus ve plasenta işlevlerinin normal olması gerekir. Özellikle organogenez çağı olan ilk 8 haftadaki zararlar, embriyo ölümü, gelişme bozuklukları ve doğumsal anomalilere yol açar. Gebelikte yetersiz beslenmenin sonucu olarak doğum ağırlığının düştüğü, ölü doğum ve düşük oranlarının arttığı, canlı doğan çocukların ise ilk 6 ayda enfeksiyonlara dirençsiz oldukları bildirilmiştir. Örneğin, demir eksikliği anemisi olan annelerin çocukları demir depoları eksik olarak, iyot eksikliği olan annelerin çocukları ise guatr'lı doğarlar.

Uterus duvarına implantasyonun iyi olmaması veya ektopik gebelik gibi durumlarda embriyo beslenemez ve gelişemez. Amniyotik bandların varlığı ve oligohidramniyos (amniyon sıvısı azlığı) embriyo veya fetusun normal gelişimini engeller. Fetal pozisyonda anormallik, bazen ayaklarda içe dönüklük (pes ekinovarus) gibi anomalilere yol açar.

Gebelik süresince travmalar da erken doğum, düşük veya fetusta beslenme bozukluğu nedeni olabilir. Özellikle ilk haftalarda annenin aldığı ilaçlara dikkat edilmelidir. Gebelikte alınan bazı ilaçlar çocukta doğumsal anomalilere yol açar. Röntgen, radyum gibi ışınlara maruz kalma çocukta mikrosefali, spina bifida, zeka geriliği, ekstremitte bozuklukları gibi doğumsal anomalilere yol açabilir.

Gebeliğin ilk 3 ayında annenin geçirdiği kızamıkçık gibi viral enfeksiyonlar da çocuğa zarar verebilir. Embriyonal yaşamda anneden plasenta yoluyla bulaşan kızamıkçık enfeksiyonu çocukta kalp anomalisi, sağırılık, katarakt, mikrosefali ve zeka geriliği gibi belirtiler yapan rubella sendromuna yol açar. Doğumsal sifilis, gebeliğin ikinci yarısında anneden çocuğa geçen, vücut ve zeka gelişmesi düzenini bozan bir spiroket enfeksiyonudur.

Toksoplazmozis gondii, annede belirti vermeden çocukta hastalık yapabilir. Doğumsal toksoplazmozis, mikro veya makrosefali, kafa içi kireçlenmeler, göz anomalileri ve sistemik belirtilerle ağır bir tabloya yol açabilir. Bunların dışında, gebelikte hormon bozuklukları da fetusa zarar verebilir. Örneğin, diyabetli annelerin

çocukları iri doğar, kalp, akciğer ve metabolizma bozuklukları gösterebilirler. Ölüm oranları yüksektir.

Plasenta bozuklukları (dolaşım yetersizliği, enfeksiyon vb) prematüre ve ölü doğumlarm, doğumsal enfeksiyonların, intrauterin gelişme geriliğinin etiyolojisinde önemli rol oynar.

## **2.2.2. Doğum Sonrası Dönem**

### **2.2.2.1. Genetik Yapı**

Genetik altyapı ve faktörlerin hem prenatal, hem de postnatal büyüme üzerine etkileri vardır.

### **2.2.2.2. Beslenme ve Metabolizma ile İlişkili Etmenler**

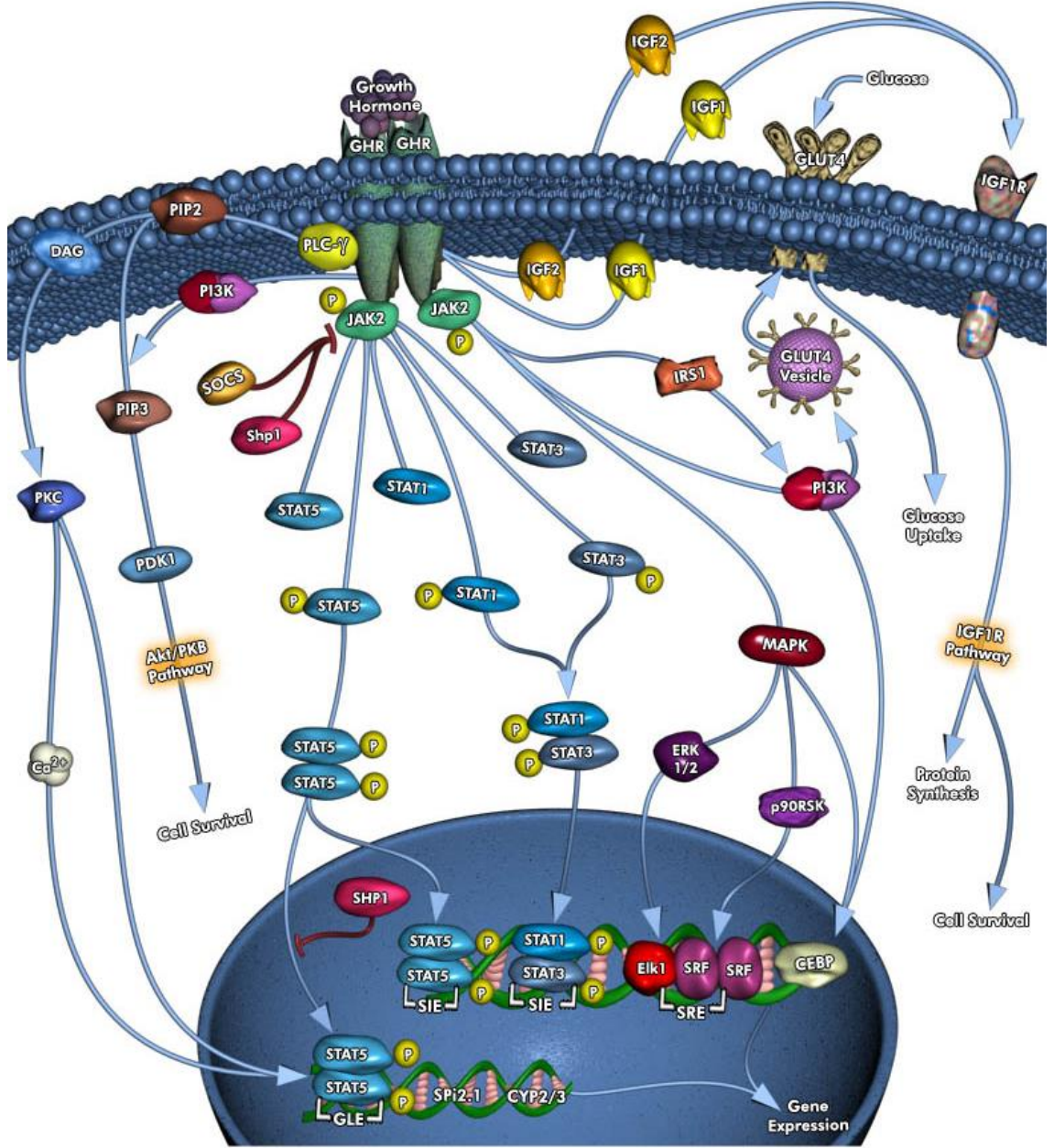
Normal büyüme yeterli beslenme ile mümkün olabilir. Büyümenin hızlı olduğu dönemlerde besinle alınan enerjinin %10'undan fazlası büyümeye harcanır. Normal hücre büyümesi için protein alımı da önemlidir. Kemik mineralizasyonu için dengeli bir kalsiyum-fosfor metabolizması gereklidir. A ve D vitaminleri de normal büyüme için önemlidir. Çinko ve bakır gibi eser elementler birçok enzim için kofaktör olduğundan normal büyüme ve cinsel gelişim için gereklidirler. Yapı ve enerji maddeleri yeteri kadar sağlanamayan çocuğun organizması ilk önce büyüme ve gelişmesini durdurarak yaşamını sürdürmeye çalışır.

### **2.2.2.3. Hormonal Faktörler**

Büyüme hormonu (BH) hücre çoğalması için oldukça önemlidir. Hipofizden salgılanan bu hormonun etkisi IGF-1 ve ana bağlayıcı proteini IGFBP-3 aracılığı ile gerçekleşir. IGF-1 karaciğerden salgılanır ve normal beslenen bir organizmada IGF-1'in esas düzenleyicisi büyüme hormonudur. Beslenmesi normal olmayan olgularda IGF-1 düzeyi de düşük olur. BH'a ek olarak insülin, kortizol ve tiroid hormonlarının da IGF-1 düzeyine etkisi vardır. Tiroid hormonları osteogenez ve BH-IGF-1 eksenini uyararak büyümeyi etkiler. Ergenlik döneminde başta östrojen olmak üzere artan cinsiyet steroidleri BH-IGF-1 eksenini uyarır ve büyümeyi hızlandırır. Östrojen ve androjen epifizi doğrudan etkileyerek uzun kemiklerdeki büyümeyi sağlar, ancak epifizlerin kapanmasından yalnız östrojen sorumludur. Glükokortikoidlerin fazlası ise büyümeyi negatif yönde etkilemektedir. Aşırı glükokortikoid salınımı somatostatini artırarak BH

salgılanmasını baskılamakla birlikte kondrositlerde BH-IGF-1 eksenini baskılamaktadır. BH sinyal yolağında rol alan proteinlerden bazıları Şekil 2-1’de gösterilmiştir.

Parathormon ise kalsiyum ve fosfor metabolizmasının ana düzenleyicisidir.



Şekil 2-1. BH sinyal yolağı

#### 2.2.2.4. Kronik Hastalıklar

Normal bir büyüme-gelişme süreci için sağlık durumunun da normal olması gerekmektedir. Sağlık durumunu bozan doğumsal veya edinsel kronik hastalıklar büyümeyi de negatif etkilemektedir. Kronik hastalıklar ve sekonder olarak gelişen

hipoksi, beslenme bozukluğu, immün yetersizliğe bağlı enfeksiyonların sıklığı, radyoterapi ve steroid tedavisi gibi tedavilerin yan etkileri büyümeyi kötü etkileyen önemli faktörlerdir.

### 2.3. Büyümenin Değerlendirilmesi ve Referans Değerler

Çocuklarda sağlığı etkileyen anormal durumlar büyüme sürecini de anormal etkilemektedir. Bu nedenle büyüme süreci düzenli takip edilerek olası aksaklık durumunda tanı ve tedavi yaklaşımları belirlenir. Çocuk polikliniklerinde genel olarak büyüme ve gelişme 1-6. aylar arası ayda bir, altıncı aydan iki yaşına kadar üç ayda bir, iki yaşından altı yaşına kadar altı ayda bir, altı yaşından erişkin döneme kadar ise yılda bir sıklıkla izlenmeli ve değerlendirilirdir. Büyümenin değerlendirilmesinde aşağıdaki ölçütler kullanılmaktadır:

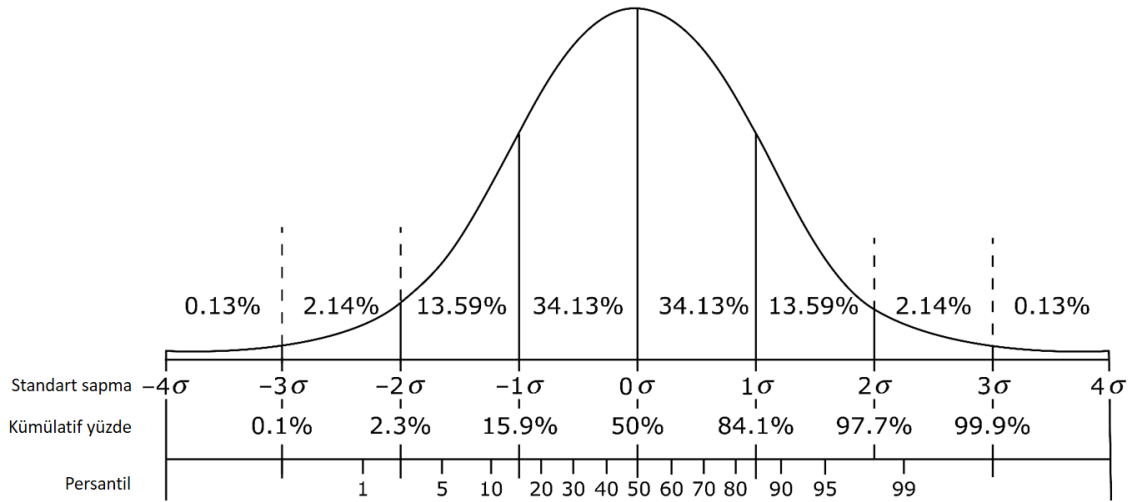
- Vücut ağırlığı ve artış hızı,
- Boy uzunluğu ve uzama hızı,
- Baş çevresi ve artış hızı,
- Vücut bölümlerinin birbirine oranı.

Sağlıklı, iyi beslenen ve iyi ortam koşullarında yetişmiş aynı yaştaki çocuklardan oluşan gruplarda yapılan ölçümlerden çıkarılan istatistiksel değerlendirmeler referans değerlerin temelini oluşturmaktadır. Ortalamanın dışına çıkan ölçümler standart sapma (SS) değerlerini veya persantil (yüzdelik) eğrilerini oluşturur. Normal dağılım, ortalama ve ortalamadan sapma ilişkisi Şekil 2-2’de gösterilmiştir. Ölçülen parametrenin toplumun ortalama değerinden sapma derecesi Z-skor terimi ile ifade edilmektedir. Bu terimin yerine standart sapma skoru (SSS) veya standart deviasyon skoru (SDS) da kullanılmaktadır. Ölçümlerin Z-skora dönüştürülmesi ile küçük değişiklikler de dahil, büyüme durumu yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak anlaşılabilir. Bu nedenle büyümenin ve boy ölçümlerinin değerlendirilmesinde günümüzde de en seçkin yöntem olarak kabul edilmektedir. Z-skor kabaca aşağıdaki gibi hesaplanabilir [1]:

Z-skor(SSS)=

$$\frac{\text{boy (cm)} - \text{yaş ve cinsiyete göre toplumun boy ortalaması (cm)}}{\text{yaş ve cinsiyete göre toplumun boy sapması (cm)}}$$

Yaşa göre boy uzunluğu toplum ortalamasına eşit olan çocukta Z-skor 0’dır.



**Şekil 2-2: Normal dağılım eğrisi.**

## 2.4. BOY KISALIĞI

Boy uzaması büyümenin en önemli göstergesidir. Bu nedenle, boy uzamasında görülen aksamalar önemli sağlık sorunlarının habercisi olabilir.

Çocuğun boy persantilinin önceki kontrollere göre düşük çıkması veya büyüme hızının 25. persantilin ( $-0.8$  SDS) altına düşmesi, boy uzunluğu normal sınırlarda olsa bile büyüme temposunun bozulmuş olduğu anlamına gelir. Bu da büyümeyi etkileyen bir patolojik durumun işaretidir.

Boyun yaş ve cinsiyete göre toplumda  $-2$  SDS'nin veya 3. persantilin, boy uzama hızının  $-0,8$  SDS veya 25. persantilin altında olması, öngörülen boyun hedef boydan 8.5 cm'den daha kısa olması boy kısalığı olarak tanımlanmaktadır.

Boy kısalığı, özellikle çocuk hekimlerinin sıklıkla karşılaştığı bir sorun olmakla birlikte etiyolojisi açısından oldukça heterojen bir gruptur. Çocukta boyla ilgili bir sorun olup olmadığını belirlemenin ilk adımı doğru ölçümler almak ve bu ölçümleri uygun referans değerler ile karşılaştırmaktır. Bunun en iyi yolu ölçülen değer persantil eğrisine işlenmesidir. Sıklıkla Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) sekiz ülke verilerine dayanarak beş yaşına kadarki çocuklar için oluşturduğu uluslararası büyüme standartları kullanılmaktadır [11]. Ancak, DSÖ standartlarının bu kadar küçük yaşlardaki bütün çocuklar için geçerli olduğu düşünülse de, yenidoğan döneminde bile toplumlar arası farklılıklar göze çarpmaktadır [12, 13]. Bu nedenle ülkemizde de Neyzi ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada Türkiye toplumu için güncel referans değerler ve

persantil eğrileri oluşturulmuş ve günümüzde çocuk polikliniklerinde çocukların değerlendirilmesinde bu veriler kullanılmaktadır [14].

Boy kısalığının değerlendirilmesi için gereken en temel ölçütler aşağıda sıralanmıştır [4]:

#### 1) Takvim yaşının hesaplanması

Boy kısalığı ile gelen çocuğun boyunu doğru değerlendirmek için öncelikle doğum tarihinin bilinmesi ve kronolojik yaşının ay ve yıl olarak doğru hesaplanması gerekmektedir.

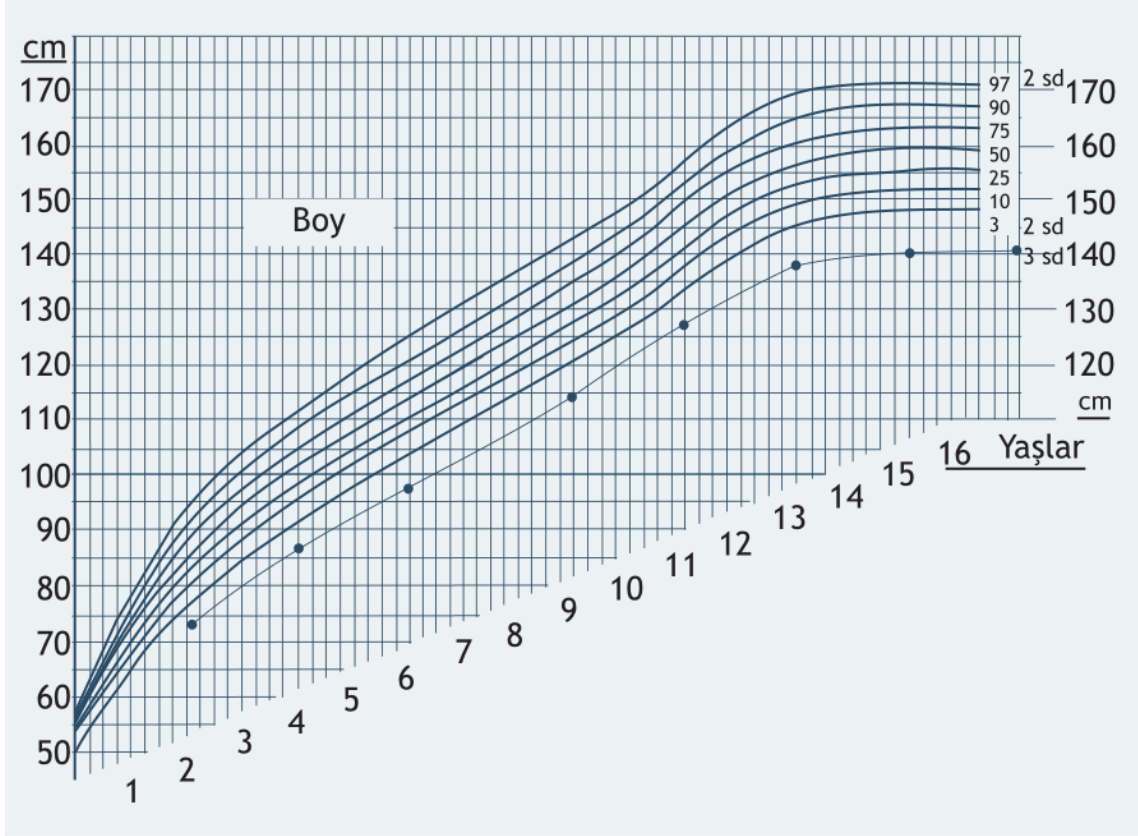
#### 2) Ölçümlerin doğru alınması

Ölçüm için mm'e duyarlı hassas bir stadiometre kullanılması önerilmektedir. Kullanılan ölçüm aletinde dikkat edilmesi gereken nokta başa temas eden düzlemin geniş olmasıdır. Ayrıca hata payını en aza indirmek için ölçümlerin aynı kişi tarafından, günün aynı saatlerinde ve aynı aletle yapılması önerilmektedir. Boy uzunluğu standart aletler ile 2 yaşa kadar sırtüstü yatar konumda, daha büyük yaşlarda ise ayakta, dik pozisyonda ölçülür.

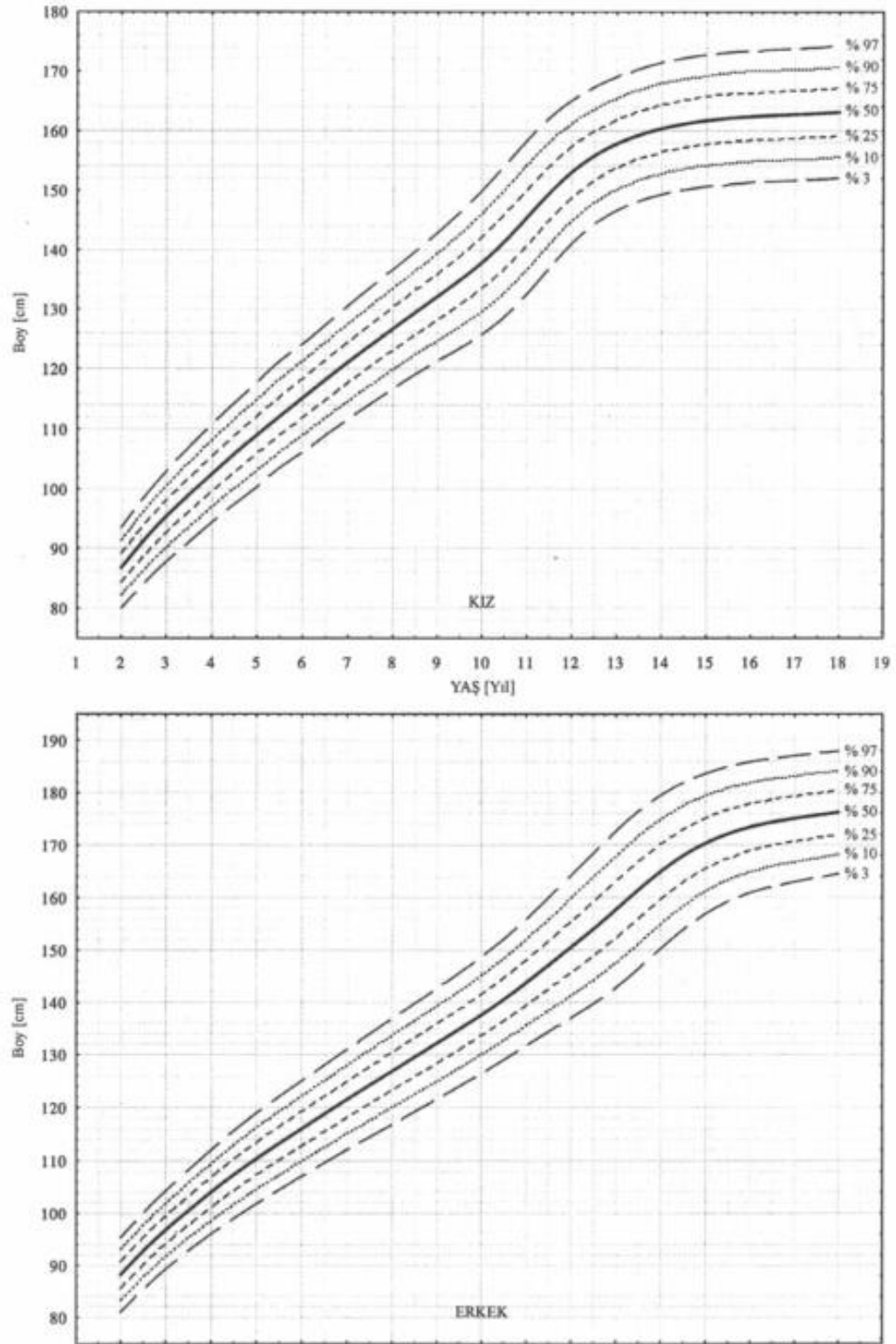
#### 3) Boy persantil eğrilerinin kullanılması

Çocuğun yaş ve cinsiyetine göre boyu uygun persantil eğrisinde işaretlenerek toplumda hangi yüzdeye dahil olduğu saptanır. Kullanılan persantil eğrileri boyu ölçülen çocuğun ait olduğu toplumdan çıkarılmış ise daha anlamlı sonuçlar verecektir.

Mutlak boy uzunluğu boy kısalığına yaklaşımda çok önemli bir değer olsa da büyüme hızı patolojinin erken farkedilmesi açısından en az onun kadar önemlidir. Boy normal aralıkta olsa bile büyüme hızının düşük olması çocuğun zamanla normal persantil aralığının altına düşmesi ile sonuçlanabilir. Dolayısıyla, bu da altta yatan bir patoloji varlığına işaret edebilir. Mevsimsel büyüme farklılıkları ve ölçüm hataları yorumu etkileyebildiği için büyüme hızı ölçümü 1 yıl üzerinden değerlendirilmelidir.



Şekil 2-3. Boy persantil eğrisinde patolojik alt sınırın gösterilmesi [4].



Şekil 2-4. 2-18 yaş aralığındaki boy uzunluğu persantil eğrileri [14].

#### 4) Anne-baba boyu

Çocuğun boyunun değerlendirilmesinde en önemli faktörlerden biri de genetik etkidir. Bu yüzden persantil eğrilerinde mutlaka anne-baba boyu ölçülerek 18 yaş

hizasında işaretlenmelidir. Kız çocuklarda anne boyu olduğu gibi alınırken, baba boyu 13 cm çıkartılarak hesaplanır. Erkeklerde ise baba boyu olduğu gibi, anne boyu 13 cm eklenerek hesaplanır. Hedef boy, anne-baba boylarının arasına, orta noktadan  $\pm 7$  cm farkla denk gelecek şekilde hesaplanır ve beklenen değerlere ulaşamazsa bir problemin varlığına işaret eder. Hedef boy matematiksel olarak aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\text{Kız çocuk için hedef boy} = \frac{\text{Anne boyu} + (\text{Baba boyu} - 13)}{2} \pm 7$$

$$\text{Erkek çocuk için hedef boy} = \frac{\text{Baba boyu} + (\text{Anne boyu} + 13)}{2} \pm 7$$

##### 5) Kemik olgunlaşması

Kemik yaşının doğru hesaplanması boy kısalığına yönelik araştırmalarda oldukça önemlidir. Kemik yaşı büyümenin tamamlanıp tamamlanmadığını ve daha ne kadar devam edeceğini gösteren bir değerdir. Uzun kemiklerin büyümesi kıkırdak dokusunun proliferasyonu (kondroplazi) ile oluşur. Kıkırdak veya bağ dokusunun kemik dokusuna dönüşmesi sürecine osteogenez (kemikleşme) denir. Ön hipofizden salgılanan BH kondroplaziyi, tiroid hormonu ve cinsiyet hormonları ise osteogenezi etkiler. Büyüme hormonunun eksikliği olgunlaşmayı, tiroid hormonunun eksikliği boy uzamasını etkiler. Kemik yaşı, kemiklerin olgunlaşma derecesini (osteogenez) ifade eder. Kemik olgunlaşması sağlıklı çocuklar arasında da cinsiyet ve ırka göre farklılıklar gösterir. Kız çocuklarında her zaman kemik olgunlaşması erkeklere göre daha erken olmakla birlikte, yenidoğan döneminde siyah ırkta da beyaz ırka göre daha ileridedir. Kemik yaşının ileri olması hemen her zaman hormonal bir bozukluğun işaretidir. Bunun erken puberte, hipotalamo-hipofizer bölgeden kaynaklı germ hücreli tümör ve gonad tümörleri, konjenital adrenal hiperplazi gibi nedenleri olabilir. Kemik yaşının geri olması daha sık rastlanan bir durumdur ve bunun nedenleri arasında tiroid hormonu eksikliği, BH eksikliği, kronik enfeksiyonlar, mukopolisakkaridozlar, akondroplazi, kondrodistrofi ve Turner sendromu bulunmaktadır. Kemik olgunlaşması ilk 3 ayda diz ve ayak kemiklerinin, daha sonra sadece sol el ve el bileğinin grafisi çekilerek değerlendirilir. Epifizlerin sayısı, büyüklüğü, diafizle olan ilişkisi gibi parametreler Greulich-Pyle veya Tanner atlası eşliğinde değerlendirilir ve kemik yaşı hesaplanır [1, 15] (Resim 2-5, 2-6).

|                    | Doğum                        | 6 ay                               | 1 yaş                                         | 2 yaş | 3 yaş                                          | 4 yaş                 | 5 yaş               |
|--------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Omuz               |                              |                                    |                                               |       |                                                |                       |                     |
| Dirsek             |                              |                                    |                                               |       |                                                |                       |                     |
| El - el bileği     |                              |                                    |                                               |       |                                                |                       |                     |
| Kalça              |                              |                                    |                                               |       |                                                |                       |                     |
| Diz                |                              |                                    |                                               |       |                                                |                       |                     |
| Ayak - ayak bileği |                              |                                    |                                               |       |                                                |                       |                     |
| Omuz               |                              | Korakoid<br>Humerus başı<br>(3 ay) |                                               |       | Büyük<br>tüberosite                            |                       | Küçük<br>tüberosite |
| Dirsek             |                              |                                    | Kapitulum                                     |       | Triquetrum                                     |                       |                     |
| El - el bileği     |                              | Hamatum<br>Kapitatum               | Radius epifizi                                |       | Metakarp<br>epifizleri                         | Lunatum               | Trapezium           |
| Kalça              |                              |                                    | Femur başı<br>(9 ay)                          |       | Falanks epifizleri                             |                       |                     |
| Diz                | Femur ve tibia<br>epifizleri |                                    |                                               |       |                                                | Fibula başı           | Patella             |
| Ayak - ayak bileği | Talus<br>Kalkaneus<br>Küboid | Lateral<br>küneiform               | Tibia<br>alt epifizi<br>Fibula<br>alt epifizi |       | Naviküler<br>Metatars<br>Falanks<br>epifizleri | Küneiform<br>kemikler |                     |

Şekil 2-5. İlk 5 yaşta kemik olgunlaşması.

|                    | 6 yaş                                       | 7 yaş               | 18 yaş | 9 yaş                         | 10 yaş             | 11 yaş                                     | 12-13 yaş            |
|--------------------|---------------------------------------------|---------------------|--------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|----------------------|
| Omuz               |                                             |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| Dirsek             |                                             |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| El - el bileği     |                                             |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| Kalça              |                                             |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| Diz                |                                             |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| Ayak - ayak bileği |                                             |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| Omuz               | Baş ve büyük<br>tüberositenin<br>birleşmesi |                     |        |                               |                    |                                            |                      |
| Dirsek             | Radius başı                                 | Medial<br>epikondil |        |                               | Medial troklea     | Olekranon                                  | Lateral<br>epikondil |
| El - el bileği     | Trapezoid<br>Skafoid                        | Ulna epifizi        |        |                               | Pisiform           |                                            |                      |
| Kalça              |                                             |                     |        | İskium ve pubis<br>birleşmesi | Küçük<br>trokanter |                                            |                      |
| Diz                |                                             |                     |        |                               |                    | Tibia tüberositesi<br>bazen ayrı<br>olarak |                      |
| Ayak - ayak bileği |                                             |                     |        | Kalkaneus<br>epifizi          |                    |                                            |                      |

Şekil 2-6. 6-13 yaş arası kemik olgunlaşması.

#### 2.4.1. Boy Kısallığına Yaklaşım

Boy kısallığına yaklaşımda öykü, fizik muayene ve laboratuvar testleri önem taşımaktadır. Bu süreçler etiyolojik nedenlerin aydınlatılmasında önemli katkı sağlamaktadır.

Öykü: Antenatal ve natal öykünün doğru alınması gerçekten bir problemin olup olmadığını gösterir. Doğum tartısı, doğum boyu ve baş çevresi hastanın başvurduğu dönemdeki ölçülerle karşılaştırılır. Düşük doğum tartısı sorunun intrauterin dönemde başladığına işaret eder. Ancak, annenin gebelik dönemindeki sigara ve ilaç kullanımı, rubella, sifiliz, toksoplazmozis enfeksiyonları gibi çeşitli nedenlerle de ilişkili olabileceğinden bu durum dışlanmalıdır. Boy kısalığı postnatal dönemde başlamışsa hastalık öyküsü, kronik ilaç, özellikle kortikosteroid kullanımı, beslenme öyküsü, psikososyal çevre, ailenin sosyo ekonomik durumu, ailedeki puberte başlama yaşları ve ailede benzer öykünün olup olmadığı detaylı bir şekilde öğrenilmelidir.

Fizik muayene: Muayene sırasında ölçülen boy, vücut oranları, tartı ve 5 yaşa kadar baş çevresi kaydedilmelidir. Oran bozukluğu iskelet displazilerini, boya göre tartının düşük olması kronik hastalıklar, psikososyal sorunlar ve malnutrisyon gibi nedenleri, tartının boya göre yüksek olması ise BH eksikliği (BHE), hipotiroidi ve Cushing sendromu gibi endokrin bozuklukları düşündürür. Bunların dışında belirli bir sendroma özgül klinik bulgular da saptanabilir. Örneğin, konjenital BHE ve Laron sendromu küçük yüz, basık burun kökü, geniş ve çıkık alın, seyrek saç ve küçük alt çene gibi tipik bulgularla seyretmektedir. Orta hat defektlerinde BH eksikliğine dikkat edilmesi gerektiği gibi, akiz büyüme duraklamasında da görme ve göz dibi muayenesi yapılmalıdır. Çünkü papilödem ve görme alanında daralma optik veya hipotalamik tümörü akla getirir.

Laboratuvar: Öykü ve fizik muayenenin tanı için yetersiz kaldığı durumlarda laboratuvar tetkikleri yardımcı olabilir. İlk aşamada kemik yaşı değerlendirilir. Kısa boylu bir çocukta kemik yaşı kronolojik yaşa uygun ise bu çocuğun büyüme potansiyelinin azlığına işaret eder. Bu durumda intrauterin büyüme geriliği (IUBG), iskelet displazileri, kromozom anomalileri gibi genetik hastalıklar ve diğer sendromlar düşünülür. Bu çocukların hedef boya ulaşma olasılığı neredeyse yoktur. Kemik yaşının geri olması ise malnutrisyon, psikososyal nedenler, endokrin nedenler, kronik hastalıklar ve konstitüsyonel boy kısalığına işaret eder. Bu çocukların büyüme potansiyelleri nedeniyle uygun tedavi ile hedef boya ulaşabilme imkanları bulunmaktadır. Boy kısalığı ve büyümede duraklama birçok kronik hastalığın da ilk bulgusu olduğundan ilk olarak olguda kronik hastalık olup olmadığı araştırılmalıdır. Bunun için tam kan sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı, tam idrar tahlili, sodyum, potasyum, kalsiyum, fosfor, üre, albumin,

alkalen fosfataz, karaciğer fonksiyon testleri, kan pH, dışkı tetkiki, tüberkülin testi (ve gerekirse akciğer grafisi) gibi birinci aşama tetkikleri istenir.

Kronik hastalığı açıklayan bir bulgu saptanmazsa ikinci aşama tetkiklere geçilir. Vücutta orantısız bozukluk olması durumunda iskelet displazileri açısından iskelet grafileri çekilir.

Boy kısalığı bulunan kız çocuklarında Turner sendromunu dışlamak açısından serum luteinizan hormon (LH) ve folikül stimulan hormon (FSH) tayini yapılır. Çünkü primer gonadal yetmezlikle giden Turner sendromunda LH ve FSH'nin yüksek olması beklenir. Eğer olguda da yüksekse kromozom analizi istenir. Ancak puberte öncesi, orta çocukluk döneminde Turner sendromlu olgularda da LH ve FSH'nin düşük olabileceği unutulmamalıdır.

Büyümede akiz bir duraklama söz konusu ise kraniyofaringioma gibi bir beyin tümörü olasılığı da göz önünde bulundurularak serum prolaktin (PRL) düzeyini de görmek gerekir. PRL düzeyinin yüksek çıkması hipofiz sapının basıya maruz kaldığı olasılığını artırır. Bu bölgedeki tümörler çoğul hipofiz hormon eksikliğine yol açabileceği için sekonder hipotiroidi, BHE, ACTH eksikliği açısından hormonal tetkiklerin yapılması gerekebilir. Ayrıca kraniyografi çekilerek sella tursikada hasar veya kalsifikasyon varlığı aranır. Beyin tümörü olasılığı baskınsa ileri tetkik olarak manyetik rezonans veya tomografi gibi görüntüleme yöntemleri kullanılır.

IGF-1 tayini de boy kısalığının tanısında öncelikli yere sahip bir tetkiktir. IGF-1 düzeyini değerlendirirken çocuğun yaşını ve puberte durumunu da göz önünde bulundurmak gerekir. IGF-1 tayini özellikle BHE'de tarama testi olarak kullanılmaktadır. IGF-1'in -2 SDS'ten daha düşük olması BHE olasılığını %75'e kadar öngörmektedir. IGF-1 düzeyinin -1 ile -2 SDS arasında olması BHE'yi kuşkulu durumda tutmaktadır. Hipotiroidi, malnutrisyon, Crohn ve çölyak hastalığında da IGF-1 düzeyinin düşük olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır [16, 17].

Tüm boy kısalıklarında rutin olarak tiroid hormonlarına bakmak önerilse de, özellikle tartısı boya göre yüksek veya zeka geriliğinin eşlik ettiği olgularda mutlaka bakılmalıdır.

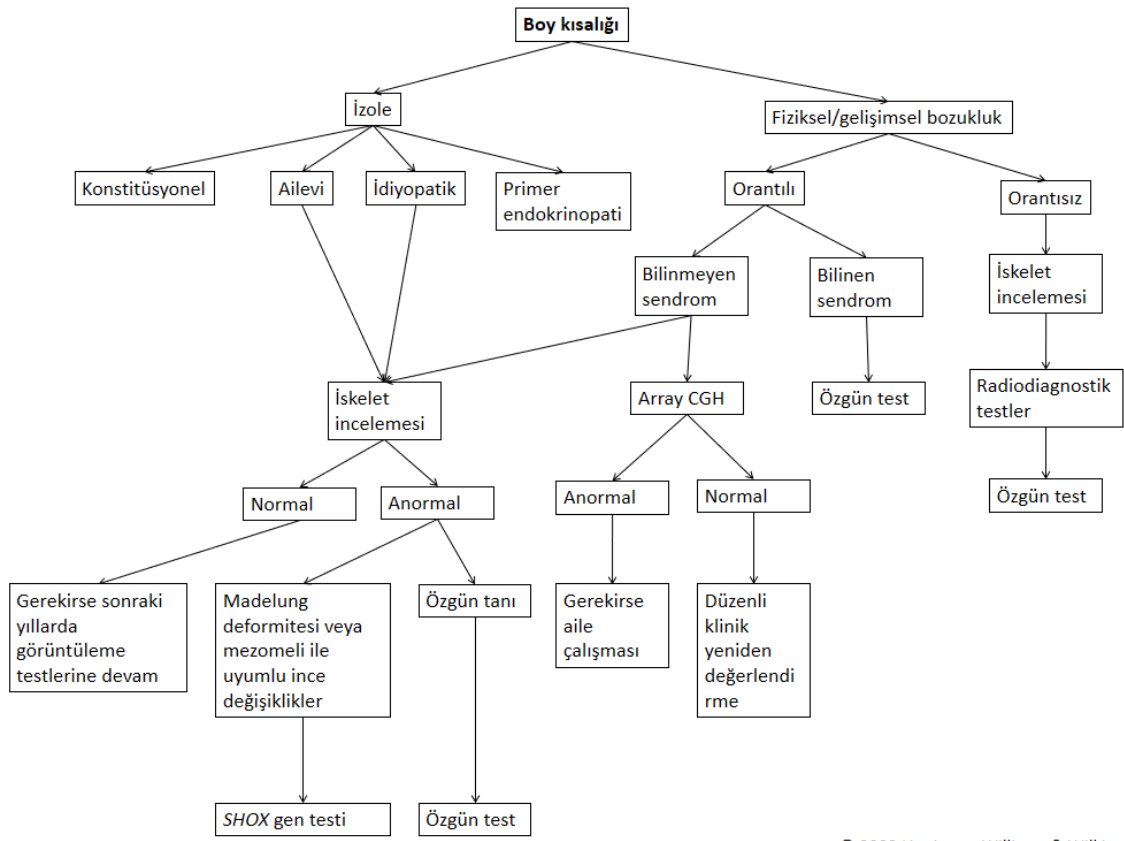
Büyümede duraklama, kilo alımı, strialar ve hipertansiyon gibi Cushing bulguları varsa bazal ve diüurnal kortizol düzeylerine bakılır ve sonraki aşamada deksametazon supresyon testleri yapılabilir.

BHE düşünülüyorsa bazal BH düzeyine bakılması açıklayıcı olmayacaktır. Bu durumda, insulin hipoglisemisi, klonidin, L-dopa gibi uygulamalar ile BH salınımının uyarılması ve uyarılı BH düzeylerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu değerlendirme, uyarıcı yöntemlerden en az ikisi kullanılarak yapılmalıdır. Puberteden önceki dönemde BH düzeyleri normal çocuklarda da düşük olduğu için BH testlerine yanıt alınmayabilir. Bu nedenle, puberte yaşındaki ve daha küçük çocuklarda BH testleri kızlara östradiol, erkeklere testosteron verilerek (cins steroid uyarılı) yapılmalıdır. BHE saptanırsa merkezi sinir sistemindeki bir bozukluğu araştırmak için beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemi ile incelenir. IGF-1 düzeyinin düşük olduğu durumlarda Laron sendromu gibi BH direncinin olduğu durumlar düşünülmelidir.

#### **2.4.2. Boy Kısallığının Sınıflandırılması**

Büyümeyi etkileyen faktörler doğal olarak boy uzunluğunu da etkilemektedir. Boy kısallığının sınıflandırılmasında etiyoloji temel dayanaktır.

Etiyolojiye yönelik ayrıntılı sınıflandırma ve tanı algoritması Şekil 2-7’de görülmektedir[3].



Şekil 2-7: ACMG sınıflandırma ve tanı algoritması.

#### 2.4.2.1. Klinik Sınıflandırma

Boy kısalığı normalin varyantı (patolojik etmeni bilinmeyen) ve patolojik boy kısalığı (patolojik etmeni bilinen) olarak iki ana grup altında toplanmaktadır. Boy uzunluğu 1-3. persantillerin veya -3 SDS ile -2 SDS arasındaki bireylerin çoğunda (%85-95) normalin varyantı olarak tanımlanan, fizyolojik nedenlerle ortaya çıkan boy kısalığı söz konusu iken 1. persantilin veya -3 SDS'nin altı patolojik boy kısalığı olarak tanımlanır [18, 19]. 2013 tarihli Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (TNSA-2013) verilerine göre 18 yaş altı bireylerin %10,1'inde patolojik boy kısalığı (-3 SDS'nin altı) saptanmıştır [20].

**a) Patolojik boy kısalığı:** Vücut oranlarının bozulup bozulmamasına göre orantılı ve orantısız olarak ikiye ayrılır.

##### 1) Orantılı boy kısalıkları

###### Prenatal

**İntrauterin büyüme geriliği (IUBG, SGA)** doğum tartısı gestasyon yaşına göre -2 SDS'ten daha düşük çocuklar için kullanılan bir terimdir. Düşük doğum ağırlığı (SGA)

ile doğan çocuklarda boy genellikle normaldir ve bu durumda düşük tartının gebeliğin son haftalarındaki sorunlarla ilgili olduğu bilinmektedir. Ancak doğum boyunun kısa olması gebeliğin erken dönemlerinde büyümeyi baskılayan problemlerin varlığına işaret eder. Bu kural preterm doğan çocuklar için geçerli değildir (özellikle çoğul gebelikler). Çünkü bu çocuklardaki boy kısalığı başka bir bozuklukla birlikte değilse, boy uzunluğu iyi bir bakım sonucunda iki yaşına kadar yaşitlarına yetişecektir.

Toksoplazmozis, rubella gibi enfeksiyonlar, alkol, kokain, hidantoin, varfarin gibi teratojen ve ilaçlar, IUBG-boy kısalığı birlikteliğinin nedenlerindendir. Bu olgularda doğumsal anomali ve zeka geriliği sıklığı yüksektir. Doğumda boy ve baş çevresi normalin altındadır ve genellikle sonradan da normal büyüme değerleri yakalanamaz. BH ve diğer hormon düzeyleri genellikle normaldir.

### **Kromozom anomalileri**

**Turner sendromu:** Canlı doğan kız bebeklerde sıklığı 1:2000-1:5000 olan Turner sendromu'nda ya X kromozomunun tamamının, ya da p kolunun monozomisi vardır. Konsepsiyonda sıklığı %1-2 olan pür monozomi X yaşamla bağdaşmaz ve gebeliklerin %99'u erken evrelerde abortusla sonlanır. Fetal ultrasonografide kistik higroma bulgusu Turner sendromu'nu düşündürmelidir. Olguların doğum ağırlıkları düşüktür, el ve ayaklarda ödem ve yele boyun görülebilir. Boy kısalığı her yaşta belirgin olup, yenidoğan döneminde de saptanabilir. Erişkin boyu 130-150 cm arasında değişir. Turner sendromunun stigmatları Tablo 2-1'de gösterilmiştir. Turner sendromlu olgularda zekâ normal veya hafif etkilenmiştir. Adolesan yaşlarda psikolojik sorunlar görülebilir. Otoimmün tiroidit ve/veya hipotiroidi genel topluma oranla daha siktir. Vakaların bir kısmında görülen renal anomalilerden bağımsız hipertansiyon gelişebilir.

**Tablo 2-1. Turner stigmatları**

|                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kraniofasiyal</b>                                                                           |
| Epikantus, yüksek damak, görme kusurları, iç kulak bozuklukları                                |
| <b>Boyun</b>                                                                                   |
| Yele boyun, düşük ense saç çizgisi, kısa boyun                                                 |
| <b>Göğüs</b>                                                                                   |
| Birbirinden uzak meme başları                                                                  |
| <b>Kardiyovasküler</b>                                                                         |
| Aort koarktasyonu veya ventriküler septal defekt                                               |
| <b>Renal</b>                                                                                   |
| Atnalı böbrek, anormal üreter (çift, vb), unilateral aplazi ve hipoplazi                       |
| <b>Gastrointestinal</b>                                                                        |
| Telanjiektaziler                                                                               |
| <b>Deri ve lenf</b>                                                                            |
| Pigmente nevuslar, el-ayaklarda lenfödem                                                       |
| <b>Tırnak</b>                                                                                  |
| Hipoplazi veya malformasyon                                                                    |
| <b>İskelet</b>                                                                                 |
| Kubitusvalgus, kısa metakarp, metatars (nadir), tibiada medial kondil deformitesi, osteoporoza |

İntrauterin evre ve yenidoğan evresinde overlerde primordial foliküller bulunsa da daha sonra dejenere olurlar ve puberte döneminde onların yerini tümüyle fibröz bantlar alır. Bu nedenle ergenliğe özgü biyolojik olaylar gelişmez ve çoğu kez menstrüasyon olmaz. Menstrüasyonun başladığı hastalarda ise siklus düzensizdir ve hastalar erken menopoza girerler. Turner sendromlu hastalar çok nadir olarak fertil olabilir. Bu olguların başka dokularında mozaik olarak normal hücre serisinin bulunduğu düşünülmektedir. Kanda östrojen düzeyleri çok düşük, gonadotropinler yüksektir. Sürrenal androjenlerin etkisiyle pubiste kıllanma oluşursa da menstrüasyon ve meme gelişimi için hormon tedavisi gerekir.

Hastaların %40-60'ında 45,X karyotipi, diğerlerinde X kromozomunun yapısal anomalileri, X/XX veya XY mozaizmi görülmektedir.

Gonozomlardan birinin bulunmadığı klasik 45,X tipi ağır klinik bulgularla seyreder. Bu olgularda boy kısalığı daha belirgin olup, bulgulara sıklıkla yele boyun ve aort koarktasyonu eşlik eder. Turner sendromuna yol açan yapısal X kromozomu anomalileri içinde en sık görüleni X kromozomlarından birinin q kolunun izo kromozomudur. Bu durumda X kromozomlarından birinin kısa kolu tek kopya, uzun kolu

üç kopyadır. Bu hastalar fenotipik olarak 45,X grubuna benzerler. Bazı olgularda karyotip 46,X,del(Xp) dir. Bu durumda X'lerden birinin kısa kolu kısmen veya tümüyle kaybolmuştur. Delesyon terminal ya da intersisyel olabilir. Turner sendromlu hastaların önemli bir bölümünde ise X kromozom anomalileri mozaik olarak bulunur. Mozaiklik 45,X/46,XX veya 45,X/47,XXX veya 46,XX/46,X,iXq şeklinde olabilir. Bu hastalarda klinik bulgular genellikle daha hafiftir.

Turner sendromunun klinik bulgularını gösteren bazı olgularda mozaik olarak Y kromozomu veya derivatları bulunabilmektedir (45,X/46,XY,45,X/47,XYY veya 45,X/46,X,r(Y) gibi). Mikst gonadal disgenezi olarak adlandırılan bu durumda hastaların klinik bulguları Turner sendromu'ndan normal erkek görünümüne ya da kuşkulu genital yapıya kadar değişkenlik gösterebilir [21].

Turner sendromunda sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması için önce sürekli, ilk menstrüasyondan sonra ise siklik olarak östrojen/progesteron tedavisi uygulanmalıdır. Boy kısalığının tedavisi için tek başına veya oksandrolon ile birlikte büyüme hormonu verilmektedir [1].

**Prader-Willi sendromu (PWS):** PWS, hipotoni, yenidoğan döneminde emme ve yutma güçlüğü, hipogonadizm (erkeklerde kriptorşidizm olarak kendini gösterir), küçük el ve ayaklar, kısa boy, erken çocukluk döneminde başlayan morbid obeziteye yol açan hiperfaji, gelişimsel gecikme/zihinsel yetersizlik ve obsesif kompulsif bozukluk gibi davranışsal sorunlarla giden bir sendromdur. Ortalama erişkin boyu kadınlarda 147 cm, erkeklerde 155 cm'dir. PWS, 15. Kromozomun paternal allelindeki tipik bir delesyon (q11.2-13 bölgesi) veya bu bölgeyi içeren bir inaktivasyon söz konusu olduğunda ortaya çıkar.

BH tedavisinin erkenden başlanabilmesi boy prognozu ve vücut kompozisyonunun düzeltilmesine önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Ayrıca morbid obezite gelişme riski azaltılabilir. Bu nedenlerden dolayı, birçok uzman erken BH tedavisini (4 ay ile 2 yaş arasında başlayarak) PWS'de bakım standardı olarak kabul etmektedir. Tedavinin ilk aylarında üst solunum yolu tıkanıklığından ani ölüm oranında olası bir artış olduğuna dair bazı bildiriler nedeniyle, tedaviye başlamadan önce uyku apne sendromu açısından ayrıntılı değerlendirme, uyku çalışması yapılması önerilebilir. Uyku çalışması, tedaviye başladıktan 6-12 hafta sonra tekrarlanmalı, daha sonra olgu her yıl takip edilmelidir.

### Diğer bazı sendromlar

**Short Stature Homeobox (SHOX) geni mutasyonları:** *SHOX* geni X ve Y kromozomlarının psödootozomal bölgelerinde bulunur. Bu bölge X-inaktivasyonundan kaçır ve normal dişilerde her iki X kromozomundan, erkeklerde ise X ve Y'den ifade edilir. *SHOX* geninin haployetmezliği, Madelung deformitesi, mezomeli, cubitus valgus, ulna dislokasyonu gibi iskelet bulguları ile giden ve kısa boyun da eşlik ettiği Léri-Weill diskondrotozuna yol açabilir. Bu hastalık kadınlarda daha yaygındır. *SHOX* geninin homozigot mutasyonları ise Langer Mezomelik Displazi (LMD) ile ilişkilidir.

**Russel-Silver sendromu (RSS):** RSS postnatal yaşamda da devam eden ağır IUBG ile karakterizedir. Bu çocukların orantılı boy kısalığı, normal baş çevresi, üçgen yüzleri, gerilimli ağız köşeleri ve belirgin bir alını vardır. Diğer klinik bulgular arasında 5. parmak kinodaktili ve vücudun 1 ya da daha fazla uzvunun daha zayıf büyümesi (hemihipotrofi) yer alabilir. Bu çocuklar genellikle beslenme güçlüğü çeker ve hafif gelişimsel gecikme sergilerler. Olguların %35-50'sinde hastalık 11p15.5 bölgesinde yerleşik paternal imprinting merkezi 1'deki (IC1) hipometilasyon ile ilişkilidir. %7-10'unda ise RSS 7. Kromozomun maternal uniparental disomisi (UPD) ile ortaya çıkmaktadır[22]. Kalan olguların tanısı şimdilik klinik ile sınırlıdır. BH ile tedavi, boy uzunluğunu artırır, ancak gerekli doz, BH direnci nedeniyle ortalamanın üstünde olabilir.

**Noonan sendromu:** Sendrom, minör fasiyal dismorfizm (hipertelorizm, aşağı doğru göz eğimi ve düşük kulaklar), orantılı kısa boy, sağ kalp hastalığı, sıklıkla pulmonar stenoz ve hipertrofik kardiyomiopati ile karakterizedir. Diğer yaygın bulgulara kısa yele boyun, göğüs deformitesi (pektus ekskavatum), kriptorşidizm, zihinsel yetersizlik, kanama diyatezi ve lenfödem örnek verilebilir. Olguların %50'sinde *PTPN11*, %13'ünde *SOS1*, %5'inde *RAF1*, %5'inde *RIT1*, %5'ten daha azında *KRAS* mutasyonları saptanmıştır. Kalan çok küçük bir kısmını ise *NRAS*, *BRAF* ve *MAP2K1* mutasyonları oluşturmaktadır [23].

### Postnatal

#### Endokrin Bozukluklar

Endokrin bezlerin büyüme üzerine hızlandırıcı (büyüme hormonu, tiroksin) ve baskılayıcı (kortizol) etkileri vardır. Androjen ve östrojenler büyümeyi hızlandırma yönünde etki ederler, ancak kemik olgunlaşmasına etkileri, kemik büyümesine olan

etkilerinden daha çok olduğu için büyüme kıkırdağının erken kapanmasına, böylece erişkinde boy kısalığına neden olabilirler. BHE, hipotiroidi, Cushing sendromu, psödohipoparadiroidi, diabetes mellitus, erken puberte, boy kısalığına yol açan başlıca endokrin bozukluklardır.

**Büyüme hormonu eksikliği (BHE):** Konjenital ya da edinsel olabilir. Çoğunlukla idiyopatiktir. Konjenital BHE olgularında doğum ağırlığı ve boyu genelde normaldir. Büyümenin yavaşlaması sütçocukluğu döneminin sonuna doğru başlar. Kemik yaşı geridir. Baş çevresi normal, burun küçük, ince, yüz kemiklerinin gelişimi geridir. Ergenlik genellikle gecikir. Konjenital form diğer hipofiz hormonu eksiklikleri (çoklu hipofiz hormon eksikliği [ÇHHE]) ve orta hat kranyofasiyal defektlerle (septum pellucidum yokluğu ve optik sinir hipoplazisi [septo-optik displazi]), yarık damak, holoprozensefali) ilişkili olabilir. Genetik testler, bu vakaların bir kısmında ön hipofiz gelişmesine dahil olan transkripsiyon faktörlerinde mutasyonların varlığını ortaya çıkarmıştır. İzole konjenital BHE nispeten nadirdir (yani konjenital BHE'nin ÇHHE'lerin bir bileşeni olarak görülmesi daha yaygındır). Bu izole vakalardan bazıları BH salgılatıcı hormon reseptöründeki (GHRHR) mutasyonları, bazıları da *GH1* genindeki mutasyonlara ilişkilidir. BH reseptörünü veya sinyal moleküllerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, çeşitli nadir BH direnci formlarına yol açabilir [24]. Konjenital olmayan, edinsel BHE nedenleri başında kraniofaringeoma gelir. Diğer nedenler arasında histiyositoz, malign tümör (özellikle lösemi) infiltrasyonu, travmalar, enfeksiyonlar (tübörküloz vb), sarkoidoz yer almaktadır. Tanı farmakolojik uyarılara büyüme hormonu salgısı yanıtına bakılarak konur. Organik beyin lezyonlarını ortaya çıkarmak amacıyla lateral sella grafisi, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gerekebilir. *GH1* geni eksikliği, reseptör yokluğu, postreseptör defekt veya *IGF1* geni eksikliği gibi nadir durumlarda da bulgular büyüme hormonu eksikliğine benzer. Tedavi için ergenlik döneminin sonuna kadar büyüme hormonunun günlük enjeksiyonlar biçiminde uygulanması gerekir. Erken tanı koyulan ve tedavinin düzenli yapıldığı olgularda erişkin boyu normal sınırlara erişebilir.

**Hipotiroidi:** Boy uzamasında yavaşlama, hipotiroidinin ana bulgularından biridir. Geç tanı koyulan ve tedaviye geç başlanan konjenital hipotiroidi, ağır boy kısalığı, zeka geriliği, birçok metabolik ve morfolojik bozukluklara neden olur. Bu bozukluklara örnek olarak nöromotor gecikme, kabızlık, deri kuruluğu, fontanellerin kapanmasında ve

diş çıkışında gecikme gösterilebilir. Tiroid hormonu özellikle uzun kemiklerin büyümesi üzerine etkin bir hormon olduğu için geç tanı konulan hastalarda vücut oranları gövde lehine bozulmuş olabilir. Büyüme hızının azalmasının yanı sıra kemik yaşı belirgin biçimde geridir. Tanı klinik bulgular yanında kemik yaşı ve kanda tiroid hormon düzeylerine bakılarak konur. Konjenital primer hipotiroidinin etiyolojik ayırıcı tanısı için tiroid ultrasonografisi ve sintigrafisi, iyot yakalama ve perklorat testi gibi değerlendirmelere ihtiyaç duyulur. Biyokimyasal, hormonal testler ve görüntüleme ile birlikte tiroid disgenezisi veya dishormonogenez için moleküler analiz yapılarak kesin etiyolojik tanıya gidilebilir. Tedavisi ise tiroid hormonlarının yerine konmasıdır. Düzenli olarak tiroid hormonlarının verilmesine genellikle yanıt iyidir.

**Cushing sendromu:** Glükokortikoid hormonlarının fazlalığı sonucunda oluşan Cushing sendromunda ilk belirti olarak büyümede duraklama, daha sonra aydede yüzü, kıllanma artışı, obezite, hipertansiyon gibi bulgular ortaya çıkar. Çocuklarda Cushing sendromu nedenleri sürrenal bezin hiperplazisi, karsinomu, adenomu veya tedavi amacı ile kortikosteroid ilaçların uzun süre kullanımıdır. Boy uzaması normal olan şişman bir çocukta Cushing sendromu olasılığı çok zayıftır. Tedavi nedene yöneliktir.

**Psödohipoparatiroidi:** Tipik yüz yapısı, kısa parmaklar ve kanda parathormon düzeyinin yüksek olmasına karşın kalsiyum düzeyinin düşük olması ile karakterizedir. Boy kısalığının tedavisi yoktur. Hipokalsemi yüksek doz D vitamini ile kontrol altına alınabilir.

**Diabetes mellitus:** İnsüline bağımlı diyabet hastası çocuklarda uygun tedavi ile büyüme genellikle normaldir. Ancak birçok diyabetli çocukta büyüme ile ilgili sorunlar görülebilmektedir. İnsülin anabolik bir hormondur ve protein metabolizmasma ve mitoza uyarıcı etkisi vardır. Büyüme geriliği kötü kontrollü diyabetlilerde ve küçük yaşta başlayan diyabetlilerde daha belirgindir. Diyabetli çocuklarda BH düzeyi normal, hatta yüksektir. Somatomedin (IGF-1) düzeyi azalmış olabilir. Standart tedavi ve iyi kontrol sağlanamayan diyabetik çocuklara insülinin pompa aracılığı ile yoğun ve düzenli uygulanması gibi yöntemlerde büyüme hızlandırılabilir. Hipotiroidi ve çölyak gibi büyüme geri bırakan bazı durumlar diyabetik çocuklarda daha sık görülür.

**Erken puberte:** Erken ergenliğe giren çocuklarda boy erken dönemde yaşlılarından uzun olsa da, hızlı kemikleşme sonucunda erişkin boyu kısa kalır.

### **Kronik hastalıklar**

Kronik hastalığı bulunan çocukta besin alımında ve emiliminde yetersizlik, kullanımında bozukluk, kronik doku hipoksisi, asidoz, metabolizmada hızlanma, hipotalamusun baskılanması veya psikolojik nedenler ile büyüme hızı düşebilir. Büyüme geriliği bulguları malnütrisyonunda görülene benzer. Genellikle hastalığın tedavisinden ya da kontrol altına alınmasından sonra büyüme hızlanır. Bu, tedavinin etkin olduğunun önemli bir göstergesidir. Büyümeyi yavaşlatan başlıca kronik hastalıklar Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2-2. Büyümeyi etkileyen kronik hastalıklar.**

|                                                    |
|----------------------------------------------------|
| <b><u>Gastrointestinal sistem hastalıkları</u></b> |
| Crohn hastalığı                                    |
| Ülseratif kolit                                    |
| Malabsorpsiyon sendromları                         |
| Çölyak hastalığı                                   |
| Ameliyat sonrası “kısa bağırsak” sendromu          |
| Kistik fibroz                                      |
| Kronik gastroenterit                               |
| <b><u>Kronik karaciğer hastalıkları</u></b>        |
| <b><u>Böbrek hastalıkları</u></b>                  |
| Doğumsal anomaliler (polikistik böbrek, vb)        |
| Kronik glomerülonefrit                             |
| Piyelonefrit, obstrüktif üropati                   |
| Nefrotik sendrom                                   |
| Renal tübüler asidoz                               |
| Fanconi sendromu, Lowe sendromu                    |
| Bartter sendromu, Liddle sendromu                  |
| Nefrojen diabetes insipidus                        |
| <b><u>Kalp ve dolaşım sistemi hastalıkları</u></b> |
| Duktus arteriyozus açıklığı                        |
| Ventriküler septal defekt                          |
| Fallot tetralojisi                                 |
| Atriyoventriküler kanal                            |
| Aort stenozu                                       |
| Pulmoner stenoz                                    |
| Büyük arter transpozisyonu                         |
| Aort koarktasyonu                                  |
| <b><u>Kronik anemiler</u></b>                      |
| <b><u>Metabolizma hastalıkları</u></b>             |
| <b><u>Solunum sistemi hastalıkları</u></b>         |
| Bronşektazi                                        |
| Bronşiyal astım                                    |

### **Duygusal yoksunluk (Psikososyal boy kısalığı)**

Çevresel psikolojik koşulların kötü olduğu çocuklarda büyümenin durakladığı bilinir. Bunun en iyi örneği uzun süre hastanede yatırılan çocuklarda anneden ayrılmaya bağlı olarak içe kapanma ve büyümenin duraklamasıdır (hospitalismus). Evdeki ebeveynlerden birinin gerçek anne veya baba olmaması, ev içi ilişkilerin sağlıklı olmaması sonucu çocukta büyüme yavaşlaması görülebilir. Hiçbir neden bulunmayan büyüme bozukluklarında bu durum dikkate alınmalıdır. Bu çocuklarda anne ve babanın çocuğa davranışı kusurludur. Çoğu hırpalanan, dövülen çocuklardır. Bu çocuklar, daha sütçocukluğu döneminde hırçın ve iştahsızdır. Kilo alımları yetersizdir. İki yaşından sonra boy duraklaması daha belirgin olur. Çocuk çoğu kez içine kapalı olup aşırı su içme isteği, pis yerlerden su içme alışkanlığı, yiyecek çalma gibi davranış bozuklukları gösterebilir. Evdekilerin çocuğa davranışları konusunda doğru bilgi almak çoğu zaman olası değildir. Genellikle beslenmesinde de bozukluk olan bu çocukların bulundukları ortamda beslenme düzeltilse bile büyümedeki bozukluğun düzeltilmediği, buna karşın ortam değişikliği ile görece düzelmeye olabileceği bildirilmektedir. Büyüme bozukluğunun patogenezi iyi bilinmemektedir [1].

### **Malnutrisyon**

Dünya çapında yoksulluktan kaynaklanan malnütrisyon hala kısa boyun en yaygın nedenidir. Büyüme için gerekli besin elemanlarının, özellikle protein ve kalori alımının yetersizliği boy kısalığına neden olmaktadır. Malnutrisyon olgularında açlıkta BH düzeyi genellikle yüksektir. Buna karşın, IGF-1 yapımı bozulmuştur. Bu çocuklarda kemik yaşı da boy gibi kronolojik yaşa göre geridir. Ancak kemik yaşındaki gerilik boy kısalığı kadar belirgin değildir.

## **2) Orantısız boy kısalıkları**

**İskelet sistemi bozuklukları:** Bu gruba dahil olan hastalıkların çoğu kalıtsal geçiş göstermektedir. Hipokondroplazi gibi bazı durumlar haricinde belirtiler doğumdan itibaren görülebilir. Klinik tanı genellikle radyolojik görüntüleme yöntemleri ile koyulsa da günümüzde kesin tanı genetik tanı yöntemleri ile yapılmaktadır. İskelet sistemindeki bozukluk uzun kemiklerin epifizinde, metafizinde olmasına, vertebranın katılıp katılmamasına göre farklı isimler alabilmektedir [1]. İskelet displazileri iskelet sistemi bozukluklarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Akondroplazi (OMIM: #100800), otozomal dominant geçişli kondrodisplazinin klasik örneğidir. Orantısız kısa boy, kısa ekstremiteler, hipotoni, orta yüz hipoplazisi ve nispeten büyük bir baş ile doğan bu olgularda büyüme hızı kademeli olarak yavaşlamaya yenidoğan döneminde başlar. Humerus ve femur kısalığı özellikle göze çarpmaktadır (rizomeli, yani uzuvların proksimal kısalması). Hastalığın isidansı yaklaşık 1/20,000'dir[24]. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (*FGFR3*) genindeki fonksiyon kazanımı mutasyonları hastalığa yol açmaktadır. Olguların %98'inde c.1138G>A (p.Gly380Arg), %1'inde ise c.1138G>C (p.Gly380Arg) mutasyonu bulunmaktadır. Bunların da yaklaşık %80'i *de novo* oluşmaktadır [25].

Hipokondroplazi (OMIM: #146000), akondroplazinin allelik bir varyantıdır ve akondroplaziye göre daha hafif boy kısalığı ve dismorfik özelliklerle kendini gösterir. Özellikle, birkaç kraniyofasiyal anomali vardır ve vücut orantısızlığı daha hafiftir. Yeni doğanlar biraz küçük olabilir, ancak kısa boy genellikle 3 yaşında belirginleşir. El ve ayaklarda genellikle brakidaktili (tübüler kemiklerin kısalması) gözlenmektedir

Spondiloepifizyel displaziler, özellikle epifizleri ve omur gövdelerini etkileyen heterojen bir displazi grubudur. Çoğu formu, kısa gövde ve vertebral anomaliler ile karakterizedir. Bu koşullar servikal omurganın subluksasyonu nedeniyle omurilik sıkışmasına neden olabilmektedir.

**Radyasyon:** 1500 rad'ın üzerindeki radyasyon dozu büyüme plağı kondrositlerine geri dönüşümsüz hasar verir. Büyüme çağındaki akut lenfoblastik lösemi hastası çocuklarda medulla spinalis ışınlamasının gövde büyümesini durdurduğu gözlemlenmiş ve bu nedenle günümüzde bu uygulamadan vazgeçilmiştir. Kraniyal irradiasyon alan olgularda hipotalamik nörosekretuar disfonksiyon gelişebilir. Bu çocukların uzama hızı düşük, kemik yaşı geridir. Farmakolojik uyarılara BH yanıtı normal, fakat uykuda BH salınımı ve serum IGF düzeyleri düşüktür.

**Raşitizm:** Tedavi görmemiş, D vitaminine dirençli vakalarda alt ekstremiteler kısalığı görülebilir. Bu olgularda epifizlerde mineralizasyon azalmış, büyüme kıkırdağı genişlemiş ve metafiz düzensizdir.

#### **a) Patolojik olmayan (patolojik etmeni bilinmeyen) boy kısalığı**

**Konstitüsyonel boy kısalığı:** Boy kısalığı dışındaki diğer muayene bulguları normal, ancak kemik yaşı geri olan çocuklar konstitüsyonel büyüme/gelişme gecikmesi

kategorisine dahil edilmektedirler. Bu gruba giren çocuklar normal doğum ağırlığı ile doğmakta, büyüme hızı ilk aylarda normal seyretmekte, daha sonra vücut ağırlığı ve boy giderek 3. persantilin altına düşmektedir. Olgunlaşma geri kalsa da sonradan erişkin boyu normal değerlere erişir. Endokrin nedenlere bağlı olmasa da ergenlik yaşlarında büyüme hormonu (BH) yanıtı ve gonadotropin düzeyinin düşük olmasıyla BHE ve hipogonadotropik hipogonadizmden ayırt edilmesi güç olabilir. BHE ile ayırt edilmesi için BH uyarı testleri yapılırken kızlara etinil östradiol, erkeklere ise testosteron verilmesi gerekmektedir. Böylece bu ön uyarıcı tedavi ile konstitüsyonel boy kısalığı bulunan olgularda BH yanıtı normale döner, BHE bulunan olgularda ise yanıtsızlık devam eder. Konstitüsyonel boy kısalığının hipogonadotropik hipogonadizmden ayırt edilmesi ise halen zorlayıcı olabilmektedir. Bilinen en önemli farklılık ise hipogonadizimli çocuklarda boy uzamasının ergenliğe kadar normal olduğu ve bu dönemde duraklaması, konstitüsyonel boy kısalığı olgularında ise boy uzamasındaki yavaşlamanın ilk yaşlardan başlamasıdır [1].

**Ailevi boy kısalığı:** Ailevi boy kısalığı terimi, genellikle tanımlanabilir bir genetik kusura sahip olmayan, hafif-orta dereceli kısa boyun ailesel formları için kullanılmaktadır; yüzlerce gen büyümede rol oynadığı için, bu boy potansiyeli muhtemelen küçük etkinin birden fazla lokusunun veya nispeten ılımlı etkinin birkaç lokusunun varlığına işaret eder. Ağır boy kısalığı ile sonuçlanan veya diğer anormal fiziksel bulgularla (sendromlar) ilişkili olduğu bilinen genetik bozukluklar için ailevi kısa boydan ayrı bir yaklaşım izlenmektedir. Ailevi boy kısalığı olgularında tipik olarak bir ya da her iki ebeveyn (ve çoğu zaman diğer aile üyeleri), boy ortalamasının yaklaşık 1.5-2 SD altındadır. Büyüme eğrisi ortalamadan düşük düzeyde devam etmesine rağmen normal büyüme eğrisine paralel olmalıdır. Normal büyüme eğrisinden uzaklaşan (normal olmayan büyüme hızı gösteren) sapma tipik değildir ve ailevi boy kısalığından başka bir bozukluğa ilişkin kaygıları artırmalıdır. Aşırı derecede kısa boy (ortalamadan 2.5-3 veya daha düşük SD), ebeveynler kısa olsa bile endişe uyandırır, çünkü bu derecedeki boy kısalığı çocukta olduğu kadar anne ve babadaki boy kısalığının da spesifik bir genetik nedenini (BH salgılanmasında hafif bir bozukluk veya hipokondroplazinin bir formu gibi) yansıtabilir. Ailevi boy kısalığı olgularında fizik muayene bulguları (kısa boydan başka), boy-tartı oranı, vücut oranları, kas durumu ve pubertal gelişim yaş için normaldir [24].

**İdiyopatik boy kısalığı (İBK):** 3. persantilin altındaki boy kısalığı ile pediatrik endokrinoloji polikliniklere başvuran olguların birçoğunda etiyoloji aydınlatılamamakta ve bu nedenle bu olgular idiyopatik (açıklanamayan) boy kısalığı tanısı ile takip edilmektedirler. Olguların birçoğunda boy kısalığı ailevidir, ancak boy kısalığının altında yatan bir patoloji saptanamadığından ve bu olguların boy kısalığı kendi başına BH tedavisi için endikasyon oluşturduğundan birçok tanıda onlar da İBK kategorisine dahil edilmektedir. İBK olgularında BH tedavisi 2003'te FDA tarafından onaylansa da hala tartışmalı bir konu olarak kalmaktadır, çünkü İBK'nın olası psikososyal ve ekonomik etkileri konusunda da fikir birliği sağlanamamıştır. Bu olguların tedavisini destekleyenler, bu kadar kısa boyun olgu ve çevresi üzerine psikolojik, sosyal ve ekonomik olumsuzluklara yol açabileceğini ve altta yatan herhangi bir patoloji belirlenmemiş olsa bile tedavi edilmeyi hak ettiklerini iddia etmektedirler. Karşıt görüştekiler ise İBK'nın, ileride olumsuz sağlık sonuçlarına neden olabilecek, aşırı pahalı bir ilaçla yapılan uzun süreli bir invaziv tedaviyi meşrulaştıracak herhangi bir önemli dezavantajı olmadığını düşünmektedir. Çoğu durumda, boyu 1. persantilin altındaki çocuklarda kısa boyun yaşam kalitesine önemli bir yan etkisi yoktur. Bununla birlikte, bazı çalışmalar, pratik ve psikososyal farklılıkların, ağır boy kısalığı olgularında arttığını göstermektedir [24].

İdiyopatik boy kısalığı tanısında önemli olan ölçütler aşağıda gösterilmiştir [1]:

- Doğum ağırlığı gestasyona göre normal olmalı,
- Vücut oranları normal olmalı,
- Kronik hastalık bulgusu olmamalı,
- Psikiyatrik veya duygusal bir bozukluk bulunmamalı,
- Beslenme durumu normal olmalı,
- Endokrin bir sorunu olmamalı,
- Büyüme hızı normal ya da normalin alt sınırında olmalıdır.

#### 2.4.2.2. Genetik Sınıflandırma

Doğrusal büyüme, büyüme plağındaki kondrojenin bir sonucudur ve bu nedenle boy kısalığının bütün formları büyüme plaklarındaki azalmış kondrojenle

ilişkilidir [6]. Büyüme plağı kondrojenezi ve dolayısıyla lineer büyüme, besin alımı, hormonlar ve inflamatuvar sitokinleri içeren çoklu sistemik faktörler tarafından düzenlenir [26]. Bu faktörlere ek olarak, büyüme plağı kondrojenezi, büyüme plağı kondrositlerindeki hücre içi düzenleyici mekanizmalar, kıkırdak hücre dışı matris bileşenleri ve büyüme plağındaki parakrin faktörler de dahil olmak üzere birçok lokal faktör tarafından düzenlenir. Sonuç olarak, bu yerel büyüme plağı sistemlerindeki genetik kusurlar da kısa boy ile sonuçlanabilir (Şekil 2-8).

### **İntraselüler yolaklardaki bozukluklar**

Temel hücresel süreçler için önemli olan proteinlerin işlev kaybına veya işlev kazanmasına neden olan mutasyonlar, genellikle belirgin bir iskelet displazisi olan veya olmayan şiddetli boy kısalığı ile sonuçlanır. Mutasyonlar ayrıca mikrosefali, zeka geriliği, farklı yüz özellikleri veya diğer klinik anormallikler ile de ilişkili olabilir.

#### **a) İntraselüler sinyal yolları**

Hücre içi kusurlar hangi yolağın etkilendiğine göre heterojenite gösterebilir. Özellikle, RAS-MAPK sinyal yolağının, büyüme plağı kondrojenезinin düzenlenmesinde anahtar bir rolü olduğu tanımlanmıştır ve bu yolaktaki bozukluklar kendini RASopatiler olarak adlandırılan çeşitli hastalıklarla göstermektedir (Noonan sendromu, Costello sendromu vb.). cAMP-protein kinaz A yolağındaki kusurlar hızlanmış kemik yaşı ilerlemesine bağlı olarak zayıf pubertal büyüme ile giden akrodizostoz tip 1 gibi iskelet displazilerine neden olur.

#### **b) Transkripsiyonel regülasyon**

Gen anlatımının düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktörleri veya genlerdeki mutasyonlar, boy kısalığına neden olabilir. Cinsel gelişim ve kondrosit farklılaşması için önemli bir transkripsiyon faktörü olan SOX9'daki mutasyonlar, belirsiz genitalya, kondrodisplazi ve bükülmüş kemiklerle giden kampomelik displaziye neden olur. *SHOX*, büyüme plağı kondrositleri için önemli başka bir transkripsiyon faktörüdür.

#### **c) DNA onarımı**

DNA onarımının bozulması, boy kısalığına (çoğunlukla primordiyal cücelik), mikrosefali, fotosensitivite, lösemi veya diğer kanserlere yatkınlığa neden

olabilir. İskelet anomalileri belirgin olmayabilir. Seckel sendromu, özellikle DNA onarımında görev alan çeşitli genlerdeki (ör., *ATR*) mutasyonların neden olduğu birçok alt tipe sahiptir.

d) Diğer temel hücresel süreçler

Bu gruba dahil olan hastalıklar nükleer stabilite (3M sendromu), kromatin yeniden düzenlenmesi (Floating-Harbor sendromu), RNA işleme (mikrosefalik osteodisplastik primordiyal cücelik, tip 1), ubiquitinasyon (Mulibrey nanizm), hücre iskeleti etkileşimi (*CRIP1* mutasyonuna bağlı primordiyal cücelik), mikrotübül organizasyonu (Alström sendromu) veya kolesterol biyosentezi (Smith-Lemli-Opitz sendromu) için önemli olan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilir.

### **Ekstraselüler matriks kusurları**

Büyüme plağı kondrositleri aynı zamanda, büyüme plağının yapısını ve işlevini korumak için kritik olan kollajenler ve proteoglikanlar açısından zengin bir karakteristik hücre dışı matriks salgılar. Hücre dışı matriks sadece destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kondrosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen parakrin sinyal molekülleriyle de etkileşir. Bu nedenle, matriks kollajenlerini, proteoglikanları, kollajen olmayan proteinleri ve bunların işleyen enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, büyüme mekanizmasının kondrojenезini çeşitli mekanizmalarla etkiler ve geniş bir fenotipik spektrumda büyüme geriliğine neden olur. Örneğin, kollajen, fibrilin 1, kırkırdak oligomerik matriks proteini, matrilin-3, agrekan ve perlekandaki mutasyonların boy kısalığının çeşitli tiplerine neden olduğu bildirilmiştir. Ekstraselüler matriks proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar bağ dokularını büyüme plağının ötesinde etkileyerek, çeşitli derecelerde iskelet ve eklem problemlerine ve düşük kemik mineral yoğunluğuna neden olabilir.

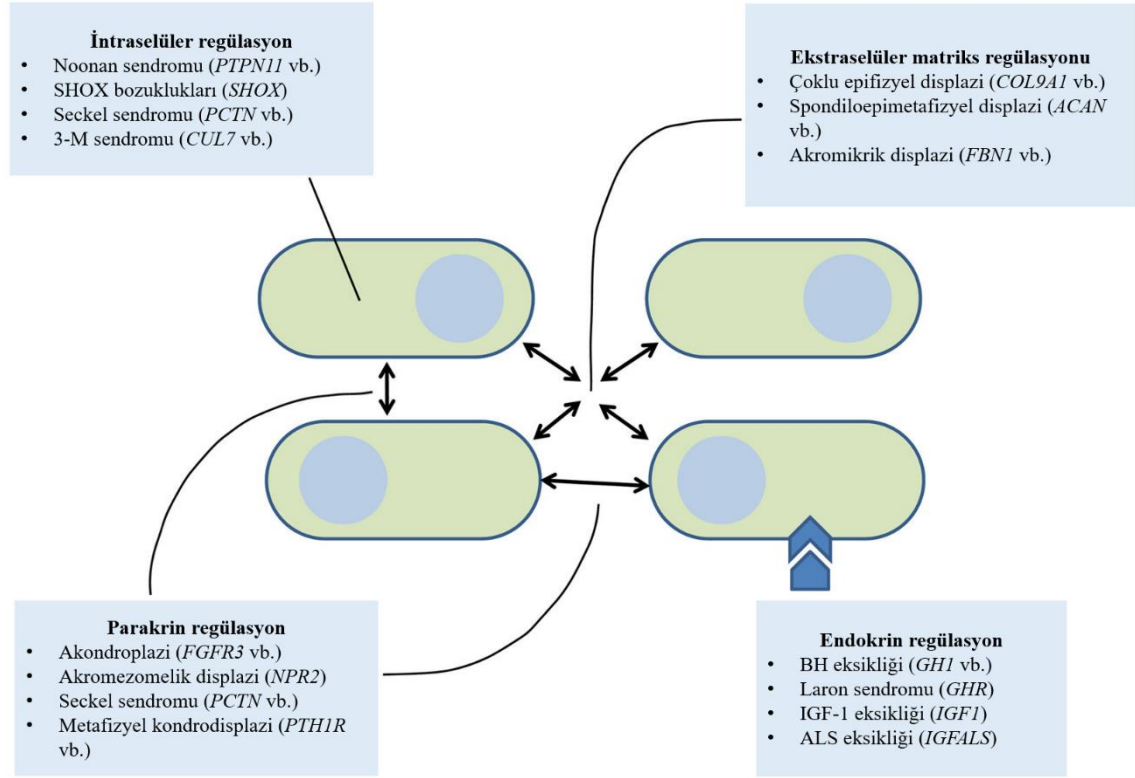
### **Parakrin regülasyon kusurları**

Parakrin faktörler kondrosit morfolojisi, proliferasyon, diferansiyasyon ve matriks düzeneğindeki sıralı değişiklikleri koordine eder. Büyüme plağında faaliyet gösteren parakrin mekanizmaların anlaşılması, son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiştir. Tanımlanan faktörlerin bazıları, FGF'ler, C-tipi natriüretik peptit (CNP), Indian hedgehog (IHH), *PTH1H* tarafından kodlanan paratiroid hormonu ile ilişkili protein (PTHrP) ve

kemik morfogenetik faktörleri (BMP'ler) içerir. Örnek olarak, FGF reseptörü-3 (*FGFR3*), MAPK ve JAK/STAT yolları dahil olmak üzere birçok sinyal yolağında görev alır ve büyüme plağı kondrojenезinin bir negatif regülatörü olarak işlev görür. Sonuç olarak, *FGFR3*'teki aktive edici mutasyonlar büyümenin inhibisyonu ile sonuçlanır, bu da orta derecede orantısız kısa boydan (hipokondroplazi) ciddi kısa boy ve kemik malformasyonu (akondroplazi) ve en şiddetli forma (tanatoforik displazi) kadar uzanan iskelet displazileri ile sonuçlanabilir.

### **Endokrin regülasyon kusurları**

*GH1*, *GHRHR*, *SOX3* ve *BTK* mutasyonları olan hastalar izole BHE ile başvurmaktadır. Öte yandan, *GHR* ve *STAT5B*'deki mutasyonlar BH direncine neden olur. *GHR*, büyüme hormonu reseptörünü kodlar. BH reseptörünün hücre dışı bir kırılma fragmanı büyüme hormonu bağlayıcı protein (GHBP) olarak dolaştığından, *GHR*'nin hücre dışı domainindeki mutasyonlar düşük GHBP'ye neden olurken, hücre içi domainindeki mutasyonlar normal veya yüksek GHBP'ye neden olur. *STAT5* proteinleri BH ve interlekin-2 sitokin ailesi sinyalleşmesinin ortak yoluna katkıda bulunur; Bu nedenle, *STAT5B*'deki mutasyonlar büyüme geriliği ve immün yetmezliğe neden olur. *IGF1* veya *IGF1R*'deki mutasyonlar IUBG'ye (çünkü IGF-1 sinyalleşmesi intrauterin büyüme için gereklidir, ancak BH gerekli değildir), postnatal büyüme geriliğine, mikrosefali ve gelişimsel gecikmeyi de içeren diğer çeşitli anomalilere neden olur. IGF-1'i stabilize eden *IGFALS* genindeki mutasyonlar IGF-1-IGFBP3-ALS kompleksini etkilemekte ve bu da büyüme geriliği, insülin direnci ve osteoporoza neden olmaktadır [27].



**Şekil 2-8. Büyümenin regülasyonunda bazı genetik faktörlerin etkisi.**

Boy kısalığı ile ilişkili bazı kromozom anomalileri, kopya sayısı değişimleri (mikrodelesyonlar, duplikasyonlar) ve tek nükleotit değişimleri iyi tanımlanmıştır. Boy kısalığı genetik olarak kromozomal, tek gen ilişkili ve multifaktöriyel olarak sınıflanabilir. Turner sendromu, PWS, ve *SHOX* geni delesyonları kromozomal, iskelet displazileri, RSS, Noonan sendromu gibi hastalıklar tek gen ilişkili, konstitüsyonel, ailevi ve idiyopatik boy kısalığı ise multifaktöriyel boy kısalıklarına dahil edilebilir.

## 2.5. Tanıda Kullanılan Yöntemler

### 2.5.1. Sitogenetik Yöntemler

Kromozom analizlerinin hedefi kromozom setindeki olası sayısal ve yapısal dengesizliklerin araştırılmasıdır. Sitogenetiğin ilk yıllarından bu yana bu alanda büyük aşamalar kaydedilmiş, yeni tekniklerin geliştirilmesi ile birçok mikrodelesyon/duplikasyon sendromu tanımlanmıştır. Geçtiğimiz yıllar içinde bu tekniklerin birlikte kullanımı ile daha etkin ve ekonomik olarak uygun yöntem ve algoritmalar geliştirilmiş ve günümüzde de bu süreç devam etmektedir.

Kromozom analizleri sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Sitogenetik yöntemlerle hem sayısal, hem de mikroskopik düzeydeki

(8-10 Mb boyutunda) dengeli ve dengesiz yapısal anomaliler araştırılabilirken, moleküler sitogenetik yöntemlerle yöntemle bağlı olarak submikroskopik düzeyde hedefli ve hedefsiz dengesiz kromozom anomalileri saptanabilirken genomda bir dengesizliğe yol açmayan dengeli yapısal anomaliler gösterilememektedir.

#### 2.5.1.1. Klasik Sitogenetik Yöntemler

Kromozom analizlerinde en yaygın kullanılan bantlama yöntemi G bantlamadır. Tekniğin temeli, kromozom üzerindeki yapısal histon ve non-histon proteinlerin bir proteaz (tripsin, pankreatin vb.) yardımı ile denatürasyonunun ardından Giemsa (GTG) veya Leischman (GTL) ile DNA'nın Adenin ve Timin'ce zengin heterokromatin bölgelerinin koyu, Guanin ve Sitozin'ce zengin ökromatin bölgelerinin ise açık boyanması esasına dayanmaktadır. GTG bantlama ile haploid genomda metafaz evresinde yaklaşık 400-500 bant görülebilmekte ve bu da bant paterninin ayırt edici olduğu bölgelerde 5 Mb'dan büyük kromozomal değişimlerin tanınmasını sağlamaktadır. Yüksek çözünürlüklü bantlama tekniği (HRBT) ile izlenebilen bant sayısı daha da artmaktadır. Benzer morfolojiyi göstermek için alternatif yöntemlere quinacrine veya Q-bantlama ve ters veya R-bantlama örnek gösterilebilir. R-bantlı kromozomlarda, G-bantlama ile açık boyanan bölgeler tam tersi, yani koyu boyanmaktadır.

C bantlama ile esas olarak sentromerik heterokromatin, akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki materyalin bir kısmı ve Y kromozomunun uzun kolunun distal kısmını oluşturan konstitütif heterokromatin boyanır. Konstitütif heterokromatinin, tanım gereği, doğrudan fenotipik etkisi yoktur ve genel olarak aktif genlerden yoksundur.

NOR boyama ile rRNA'yı kodlayan genlerin çok sayıda kopyalarını içeren ve akrosentrik kromozomların satellitleri üzerinde bulunan nükleolar organize edici bölgeler (NOR) boyanmaktadır.

#### 2.5.1.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

1990'larda sitogenetik alanındaki en önemli ilerleme şüphesiz işaretli problarla *in situ* hibridizasyon yoluyla, belirli kromozomları ve kromozom parçalarını tanımlamaya olanak sağlayan Florescence In Situ Hybridization (FISH) tekniğinin kullanılmasıydı. FISH, submikroskopik delesyonları tespit etmek ve kromozom anomalilerini daha belirgin karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Melezleme yöntemi doğrudan veya dolaylı olabilir. Algılanabilir bir molekülün (ör., florofor) prob DNA'sına

doğrudan bağlanması, probun kromozomdaki hedef DNA'ya hibritleşmesinden hemen sonra mikroskopik görselleştirmeyi sağlar. Daha hassas dolaylı prosedür, afinite sitokimyası ile saptanabilen bir haptin ile probun özel modifikasyonunu gerektirir. En popüler sistemler biyotin-avidin ve digoksisinin sistemleridir. Biyotin, digoksisinin ve florofor etiketli problemlerin kombinasyonları kullanılarak, bir preparatta farklı kromozomal bölgeleri bulmak için çoklu eşzamanlı hibridizasyonlar yapılabilir (çoklu renkli FISH) [28].

CGH (Comperative Genomic Hybridisation), mikrodizin çalışmalarının öncüsü sayılan bu yöntem, incelenen DNA ile kontrol DNA'nın farklı floresanlı boyalar ile işaretlenerek metafaz kromozomlarında hibridizasyonu ve floresan sinyallerinin mikroskopla görüntülenerek sinyallerin birbirine oranının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Her iki floresan renginin kromozom üzerinde oluşturduğu dengenin bozulması ile delesyon/duplikasyon tanısına gidilmektedir. Bu teknik, ilk olarak tüm genomun incelenmesine olanak sağlaması bakımından çok önemli olmasına karşın kromozomların perisentromerik ve terminal bölgelerinde hassasiyetin düşük olması, rezolüsyonunun kısıtlı olması, uygulama ve analiz zorluğu, yaygın kullanımına engel olmaktaydı [29, 30].

Array-CGH (a-CGH), karşılaştırmalı genomik hibridizasyon analizlerini mikrodizin teknolojisiyle birleştiren ve genomdaki dengesizlikleri DNA düzeyinde tanımlayan bir tekniktir. Bu yöntemin avantajlarına birden fazla genomun birbirleri ile karşılaştırılabilmesi, hücre kültürüne gerek duyulmaması, az miktarda DNA örneğinin çalışma için yeterli olması ve genomdaki Kb düzeyindeki değişiklikleri bile saptayabilmesi örnek verilebilir [31].

Tekniğin temeli, Solinas-Toldo ve arkadaşları tarafından 1996'da hedef dizi cam slayt üzerine immobilize edilerek atılmıştır. a-CGH tekniğinin temeli iki farklı floresan boya ile etiketlenmiş hasta ve referans DNA'larının cam slayt üzerine immobilize edilmiş DNA ile hibridizasyonuna dayanır. Bu sayede çok sayıda genomik lokusun DNA kopya sayısı farklılıklarının (kazanç ve kayıp, artma ve azalma) karşılaştırmalı analizi mümkün olabilmektedir.

## 2.5.2. Moleküler Yöntemler

### 2.5.2.1. DNA Dizileme Yöntemleri

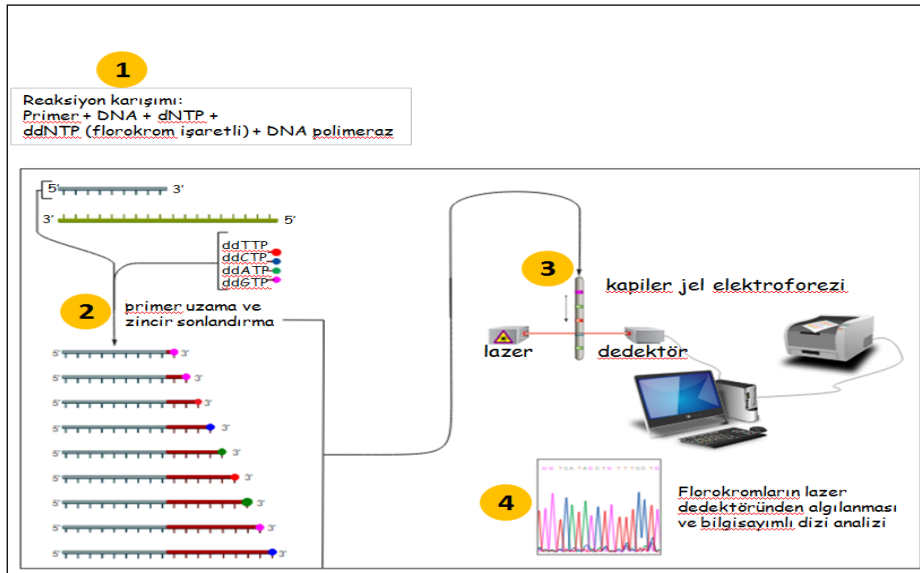
Rekombinant DNA tekniklerinin gelişimi ve DNA dizi analizinin keşfi genomun yapısının ve kontrol mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlamıştır. DNA dizi analizinin tarihsel süreci, R. Holley'in 1965 yılında 74 nükleotidlik tRNA molekülünü dizilemesiyle başlamış, 1977'de A. Maxam ve W. Gilbert'in iki farklı DNA dizileme yöntemini geliştirmeleri ile devam etmiştir. 1982'de A. Wada'nın DNA dizi analizinin otomatize edilmesini önermesinin ardından, 1986'da Kalifornia Teknoloji Enstitüsü'nden (Caltech) L. Hoddd ve L. Smith her DNA bazının farklı florofor ile işaretlenmesi ve poliakrilamid jel elektroforezinde detektör vasıtasıyla florofor işaretli bazların saptanması temeline dayanan yöntem ile otomatik bir makine geliştirmiştir. 1992'de 21. kromozomun DNA dizi analizi tamamlanmıştır. C. Venter, C. Fraser ve H. Smith 1995 senesinde *Haemophilus influenzae*'nin, 1996 yılında *S. Cerevisiae*'nin DNA dizisini yayınlamıştır. 1998'de Sanger Center ve Washington Üniversitesi, *Caenorhabditis elegans*'in DNA dizisini yayınlamışlardır. 1999'da insan 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır. 2000 yılında Celera ve birlikte çalıştığı kurumlarca *Drosophila melanogaster*'in DNA dizisi yayınlanmış, aynı yılın Haziran ayında insan genom projesinin (IGP) ve insan gen haritası taslağının tamamlandığı açıklanmış, ayrıca aynı yılda *Arabidopsis thaliana*, DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur. 2003'te ise Y kromozomunun dizi analizi tamamlanmıştır [32].

İnsan Genom Projesinin ardından genomun yapı, fonksiyon, çeşitlilik ve regülasyonunu daha iyi anlamak amacıyla başlatılan ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) ve HapMap gibi projeler ile canlı genomunun organizasyon, fonksiyon ve dizilimini belirlemede uzun yıllardan beri kullanılan Sanger dizileme yönteminin, emek, süre, etkinlik ve maliyet açısından yetkin olmadığı, daha hızlı ve yüksek çıktılı dizileme yöntemlerine gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır [33]. Her klonun ayrı ayrı çoğaltılması ve dizilenmesi gerektiğinden, tüm insan genomunun tamamlanması 10 yıldan fazla sürmüş, bu nedenle ikinci nesil ya da yeni nesil dizileme (YND) adı verilen yüksek kapasiteli paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. YND teknolojisi ve eşlik eden fonksiyon analizleri çeşitli hastalıkların daha önce bilinmeyen genetik temellerinin aydınlatılmasına imkan sağlamış, bu da genetik tanı için çeşitli yaklaşımların

ortaya çıkmasına ve özellikle de panel gen testlerinin geliştirilmesine önayak olmuştur [34, 35].

### Sanger Dizileme

1977’de Maxam ve Gilbert’in kimyasal kırma, Sanger ve ekibinin zincir sonlandırma metodunu keşfetmesiyle dizileme çalışmaları hız kazanmıştır. Dideoksinükleotid’ler (ddNTP) ile DNA zincir uzamasının sonlandırılması esasına dayanan Sanger dizileme yöntemi günümüzde altın standart olarak kabul edilen ve en çok kullanılan yöntemdir. Yöntem, zincir sonlanması esasına dayanır [36]. Birincil uzama aşamasında, yeni sentezlenen zincire normal nükleotidlere ek olarak floresan işaretli terminatör nükleotidlerin eklenmesiyle her basamakta uzaması sonlanan fragmanlar elde edilir. Farklı uzunluktaki floresan işaretli zincirler, kapiller jel elektroforezinde uzunluklarına göre ayrılarak taşıdıkları floresan sinyallerle ölçülür (Şekil 2-9). Kapiller sistemlerin kullanıma girmesi ve yöntemin bilgisayara entegrasyonu ile örneğin, 96 kuyulu mikroplağın her kuyusuna koyulan farklı örneklerin aynı süreçte dizi reaksiyonuna girmesi, ardından elektroforetik ortamdan izlenerek dizilenmesi mümkün olmuştur. Bu sistemler her yürütmeye 500-600 bç uzunluğundaki DNA dizisini dizileme için kullanılan primer yönünde, yüksek doğruluk oranıyla okuyabilmektedir.



Şekil 2-9. Sanger Dizileme'nin aşamaları.

### Yeni Nesil Dizileme

YND yöntemi, DNA'nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı ve yüksek sayıda dizilenmesine dayanan yöntemdir. İlk olarak *Life Sciences* tarafından 2005 yılında 454

platformu, sonraki yıl *Solexa* tarafından *Genome Analyser* ve *Agencourt* tarafından SOLID platformları piyasaya sürülmüştür [37]. 2011’de ise Ion Torrent’s PGM, Pacific Biosciences’ RS (PacBio) ve Illumina MiSeq yeni nesil dizileme platformları geliştirilmiştir.

Dizileme teknolojileri, genel olarak kalıp (taslak) hazırlama, dizileme, görüntüleme ve verilerin analizi aşamalarından oluşur. Kalıp hazırlamada *tek DNA molekülünden klonal olarak çoğaltılmış* ve *tek DNA molekülü* olmak üzere iki yöntem kullanılır [38].

*Emülsiyon PZR* (emPZR) [39] ve *katı faz amplifikasyonu* [40] klonal olarak çoğaltılmış kalıpların hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerdir. emPZR, dışı yağ, içi PZR reaksiyonunun gerçekleştiği reaktif sıvıdan oluşan mikroskopik boncukların her birinde tek tip primer ile buna eşleşen kalıp DNA’nın klonal çoğaltılma yöntemidir. Katı faz amplifikasyonu da cam slayt üzerinde komplementer kalıp veya fragmentlerden rastgele dağılmış ve klonal olarak çoğaltılmış kümelerin elde edilmesine dayalıdır [41].

Tek molekül kalıplarında ise aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır:

- başlangıç materyalinin rastgele parçalara (200-250 bp) ayrılarak fragman sonlarına ortak adaptörlerin eklenmesiyle elde edilen kalıbın katı desteğe kovalent bağlı primerlere hibridizasyonu (*Helicos BioSciences*);
- tek iplikli tek-molekül kalıplarının immobilize primerlerle uzatılması ile bölgesel olarak dağıtılmış kalıpların katı desteğe kovalent bağlanması (*Helicos BioSciences*)
- dağınık tekli polimerazların katı desteğe tutturulması (*Pacific Biosciences*) olmak üzere üç farklı yaklaşım vardır [42].

Dizileme yöntemleri ise *geri dönüşümlü zincir sonlanması*, *ligasyona dayalı*, *tek-nükleotit ekleme – pirodizileme* ve *gerçek-zamanlı dizileme* olmak üzere çeşitleri vardır [43]. Farklı platformlar hem taslak hazırlama hem de dizileme aşamasında farklı yöntemler kullanmaktadır (Tablo 2-3).

**Tablo 2-3. Dizileme platformlarının karşılaştırılması [44]'ten alınarak yeniden düzenlenmiştir.**

|                             | 1. Nesil Dizileme                    | 2. Nesil Dizileme                    |                                      |                                      |                                       | 3. Nesil Dizileme                    |                                      |
|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                             | Sanger                               | FLX 454 GS (Roche)                   | Solexa (Illumina)                    | SOLID (Applied Biosystem)            | Ion Torrent (Thermo Fisher)           | Helicos (HeliScope)                  | PacBio (Pacific Bioscience)          |
| <b>Kütüphane Oluşturma</b>  | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon  | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon | Mekanik veya enzimatik fragmentasyon |
| <b>Klonal Amplifikasyon</b> | Klonlama, PZR                        | emPZR                                | Köprü PZR                            | emPZR                                | emPZR                                 | yok                                  | yok                                  |
| <b>Dizileme</b>             | Zincir sonlanması                    | Piro-dizileme                        | Geridönüşümlü zincir sonlanması      | Probligasyonu                        | Hidrojen iyonuna duyarlı yarı iletken | Gerçek zamanlı (Real-Time) dizileme  | Gerçek zamanlı (Real-Time) dizileme  |

Yeni nesil dizileme ile elde edilen veriler kısa okuma uzunluklarına sahip olduğu için ileri biyoinformatik araçlarla referans genomu haritalanmalı ve ardışık birleştirilerek hizalanmalıdır. Kısa okuma uzunlukları (~400 bp) nedeniyle YND yöntemleri gross delesyon ve duplikasyonların, tekrar dizilerinin, dengeli translokasyonlarda kırık bölgelerinin (amplikon sınırlarında yer almıyorsa) net olarak belirlenmesinde elverişli değildir [45]. Ayrıca YND sonucu elde edilen değişimlerin çokluğu, anlamlandırmadaki zorluklar, ko-segregasyon analizleri, hedef bölgelerin motif veya GC bazlarının zengin olmasından kaynaklanan düşük okuma sayılı bölgelerin yeniden taranması gerekliliği vb. ek masraf gerektiren ve uzun süreli işlemlerdir.

YND teknolojisindeki yeni gelişmeler temeli PZR'e dayalı olmayan üçüncü nesil dizileme teknolojilerine doğru evrilerek daha kısa sürede veri eldesi sağlamanın yanı sıra PZR hatalarının önüne geçmeyi hedeflemektedir [46].

Üçüncü nesil dizileme veya tek-zincir molekül dizileme teknolojisi üç kategoride incelenir: 1) *DNA polimeraz kullanılarak sentez yoluyla dizileme*, 2) *nanoporlardan yararlanarak dizileme* 3) *Direkt görüntüleme ile dizileme*. Daha yüksek verim, daha hızlı geri-dönüş, uzun okuma oranları, başlangıç materyal için küçük miktarların yeterli olması

gibi avantajları olan üçüncü nesil dizileme için günümüzde geliştirilen teknolojik yaklaşımlardan bazıları bunlardır: tek iplikli DNA molekülünün Gerçek-Zamanlı Dizilemesi (*Pacific Biosciences*), floresan rezonans enerji aktarımı kullanılan gerçek-zamanlı DNA Dizilemesi (*Visigen Biotechnology*), elektron mikroskopisi temelli dizileme (*Halcyon Molecular*), taramalı-elektron mikroskopuna dayalı dizileme (*Reveo*), nanopor teknolojisi, tek zincirli DNA molekülünün doğrudan elektriksel algılanması (*Oxford Nanopor*), optik okumalı nanopor teknolojisi ile dizileme ve transistör aracılı dizileme (*IBM*) [47-55].

YND, hedefli gen panelleri ile hastalık ilişkili birçok genin eşzamanlı dizilenmesi, tüm ekzom dizileme (TED) ve tüm genom dizilemeyi (TGD) ve ekspresyon çalışmaları için RNA dizileme ve metagenomik çalışmalar gibi çeşitli seviyelerde kullanılabilir. Genom dizileme yaklaşımlarından biri, genomik bilginin en kapsamlı halini araştırmayı amaçlayan, genomun kodlamayan bölgeleri de dahil tüm genomun dizilendiği Tüm Genom Dizileme (TGD), diğeri ise genin işlevsel elementlerini ve kodlayan ekzonlarını (tüm genomun %1,5'i) hedefleyen ve genetik heterojenite gösteren nadir hastalıkların tanısında sık kullanılan Tüm Ekzom Dizileme (TED) yöntemidir [56]. Her bir yöntemin kendi üstünlükleri ve sınırlamaları, tercih edildiği durumlar vardır (Tablo 2-4).

**Tablo 2-4. Yeni Nesil Dizleme uygulamalarının karşılaştırılması [57]**

| Dizileme Türü              | Hedef bölgeler                                    | Başlıca kullanım alanı                                    | Kısıtlılıkları                                                                          |
|----------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tüm genom dizileme</b>  | Tüm genler, tüm ekzonlar, tüm kodlamayan bölgeler | Hastalıkla ilişkili yeni genlerin keşfi                   | Fiyat<br>Derinlik (coverage deep): düşük<br>allel ayırımı için düşük duyarlılık         |
| <b>Tüm ekzom dizileme</b>  | Tüm genler, tüm ekzonlar                          | Klinik araştırma; tanısal test olarak; neo-epitop tahmini | Fiyat<br>Derinlik (coverage deep): düşük<br>allel ayırımı için orta derecede duyarlılık |
| <b>Geniş gen panelleri</b> | 300–600 gen                                       | Tanısal; klinik denemeler; klinik araştırma               | Kapsam                                                                                  |
| <b>Küçük gen panelleri</b> | <100 gen                                          | Tanısal; hastalık progresyonunun monitörizasyonu          | Kapsam                                                                                  |
| <b>Hotspot panel</b>       | 50–80 gen, spesifik ekzonlar, varyantlar          | Tanısal                                                   | Kapsam                                                                                  |
| <b>Transkriptom</b>        | mRNA                                              | Varyant validasyonu; neo-epitop ifadesi; füzyon tespiti   | Fiyat                                                                                   |
| <b>Hedefli RNA paneli</b>  | Füzyon genleri                                    | Füzyon tespiti                                            | Kapsam;<br>Varyant validasyon kapasitesi hedef bölgeye sınırlı                          |

Gen panelleri sadece ilgilenilen hastalıkla ilgili genleri içerdiğinden hedef tutarlı şekilde, %99'a kadar kapsanabilir [58]. Bu yöntemle sadece hastalıkla ilişkili olduğu bilinen genlere odaklanıldığından hedef daha fazla kapsam ve okuma ile dizilenir. Düşük okumalı bölgeler alternatif moleküler yöntemlerle taranır ve hedef tam kapsanmış olur. Gen panelleri özellikle genetik heterojeniteye sahip hastalıklarda daha düşük maliyetle dizilemeye olanak tanır [59-61].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubumuzu, 2011-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine genetik konsültasyon amacıyla Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Çocuk Endokrinoloji BD polikliniğinden yönlendirilen, klinik tanıda boy kısalığı'nın yer aldığı 189 etkilenmiş olgu oluşturdu. Kromozom anomalileri ve *SHOX* gen delesyonları dışlanmış 41 olguda YND tabanlı panel-gen yöntemi uygulanarak yöntemin boy kısalığının moleküler genetik tanısına olan katkısı incelendi.

Çalışmanın etik uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (21.07.2017 tarih ve 278051 sayı, ek-1). Çalışmaya katılan ailelerden bilgilendirilmiş onam alındı (ek-2).

#### 3.1. Yöntemler

##### 3.1.1. Klinik Değerlendirmeler

Olguların öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulguları hazırlanan (ek-3) muayene formuna kaydedildi. En az üç kuşak olmak üzere aile öyküleri alınarak pedigriler hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin görüntüleme (kraniyal/hipofiz, batin/pelvik ultrasonografi vb) ve laboratuvar test sonuçları (endokrinolojik, sitogenetik ve daha önce yapılmış ise moleküler genetik testleri vb.) dosyalarına işlendi. Kromozom analizi ve *SHOX* geninde yapılan çalışmalarda herhangi bir anomali saptanmayanlar tez kapsamına alındı.

##### 3.1.2. Moleküler Yöntemler

###### 3.1.2.1. DNA Eldesi

DNA izolasyonları, steril 2 ml K<sub>3</sub>EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon/manyetik boncuk bazlı sistemle özgün kitler (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood*, Roche11667327001/*Magnapure Large Volume KIT*, Roche03730972001 ve *EZ1 DNA Isolation Kit for Mammalian Blood*, Qiagen 951054) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı.

###### 3.1.2.2. DNA Kalite Değerlendirme, Seyreltme ve DNA Yoğunluğunun Ölçümü

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/μl) ve absorpsiyon ölçümleri ( $A_{260/280} \sim 1,80-1,89$ ) spektrofotometrede ölçülerek kaydedildi

(Nanodrop 2000c, Thermo Scientific).  $A_{260/280}$  değeri 1,80'den az olanlar protein kontaminasyonu nedeniyle manuel çöktürülerek saflaştırıldı. Saflaştırma aşamaları ise bu şekilde yapıldı; son konsantrasyonu 2 mM Ammonium Asetat [ $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ], 2.5 hacim %100 etanol [ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ] ve %2'lik glikojen ile çöktürüldükten sonra, pellet 2 kez %80'lik ve bir defa %100'lük etanolde yıkanıp kurutularak,  $\text{dH}_2\text{O}$  veya TE'de çözüldü.  $A_{260/280}$  değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase ile muamele edilerek fazla ribonükleik asitler parçalandı. Her olgu için, DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/ $\mu\text{l}$  olacak şekilde miliQ (18 M $\Omega$ ) su kullanılarak seyreltme işlemleri yapıldı. Son DNA yoğunluklarının yeni nesil dizileme tekniği için uygun aralıkta (1,6 - 2 ng/ $\mu\text{l}$ ) olması sağlandı.

Seyreltilmiş DNA örnekleri ölçülmeden önce firma protokolüne uygun şekilde Qubit dsDNA HS Assay Kit ile kalibrasyon sağlandı, daha sonra ölçüm yapıldı. Örnek DNA yoğunlukları uygun aralığa (1,6-2 ng/ $\mu\text{l}$ ) gelene kadar seyreltme ya da deriştirme işlemleri yapılarak sonrasında ölçümler tekrarlandı.

### 3.1.2.3. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi

Yeni nesil dizileme tabanlı panel gen çalışması Ion Torrent PGM platformunda yapıldı.

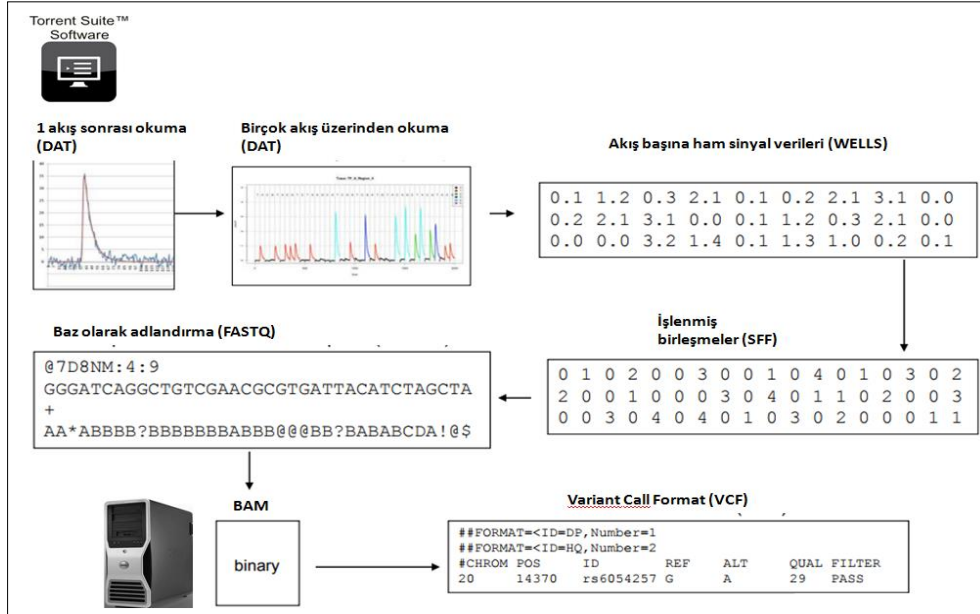
#### Ion Torrent Platformu

Ion Torrent platformunda kütüphane ve taslak hazırlama aşamaları; DNA'nın multipleks primerlerle ampikon temelli çoğaltılması, elde edilen fragman uçlarının enzimatik modifikasyonu (end repair) ve adaptör bağlanması, adaptör bağlı kütüphane ürünlerinin emülsiyon PZR ile çoğaltılmasından oluşur. Adaptör bağlı DNA fragmanları, üzerlerinde adaptör dizilere komplementer diziler taşıyan ve bu dizilere kovalent bağlı boncuklarla eşleştirilir ve içerisinde PZR için gerekli reaktiflerin ve polimerazın bulunduğu yağ mişelleri oluşturularak emPZR ile amplifiye edilir. Zenginleştirme aşamasında çoğaltılmış DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, reaktifler, yağ parçacıkları ve amplifikasyona katılmamış boncuklardan ayrıştırılır. İyon sinyal alıcısı taşıyan milyonlarca kuyucuğa sahip çip üzerinde dizileme yapılmakta, bu sensör dizileme sırasında ampikona dNTP bağlandığı zaman salınan  $\text{H}^+$  iyonlarını algılayarak ham veriye dönüştürmektedir [62].

İş akışı sırasıyla, sinyal işleme, baz isimlendirme, haritalama, varyant isimlendirme-önceliklendirme ve yorumlanması basamaklarından oluşur. Bu basamaklar

platformun Torrent Suite Server (TSS) olarak adlandırılan programı tarafından otomatik yapılır. TSS ile varyant isimlendirme ve önceliklendirme yapılmış BAM ve BAM-BAI formatındaki veri platformun *Ion Reporter* programı ile tekrar işlenerek ileri analize alınmaktadır.

**Sinyal İşleme ve Baz İsimlendirme:** Bu aşamada veri haritalanmamış BAM formatına dönüştürülmektedir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1. *Ion Torrent* platformunda sinyal işleme ve baz isimlendirme.

**Ham Verinin Kalite Kontrolü:** Ham verinin standartlara uymayan okumaların çıkarılması veya düzeltilmesi, adaptör kontaminasyonu, indel ve düşük kaliteli okumalardan kaynaklanan yapay dizilerden arındırılması aşamasıdır. Baz kalite değerlerinin ve nükleotid dağılımının görsel hale getirilmesini, primer kontaminasyonu, nükleotid içeriği ve GC zenginliği gibi özelliklere göre okumaların filtrelenmesini içerir.

**Haritalama ve Hizalama:** Okumaların genomik lokalizasyonlarının belirlenmesi amacıyla haritalanıp hizalandığı basamaktır. FASTQ formatındaki diziler SAM/BAM dosya formatına dönüştürülür. Veriler BAM dosyası olarak saklanır. Bu aşamada TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) algoritması kullanılmaktadır.

**Haritalama Sonrası Kalite Kontrolü:** AQ17 (alignment quality 17): %2 ve daha az hata payı ile haritalanan baz sayısı, AQ20 (alignment quality 20): %1 ve daha az hata ile haritalanan baz sayısı ve Perfect (mükemmel): hatasız olmak üzere üç formu vardır.

**Varyant Belirleme, Filtreleme ve İsimlendirme:** Bu basamakta hizalanmış diziler referans genomla kıyaslanarak varyasyonlar belirlenir. İleri analiz aşamasında hizalanmış veriler *Ion Reporter*’a aktarılır, *Ion Reporter* varyant isimlendirme ve analiz parametreleri ile değişimleri belirleyerek ayrıntılı VCF raporu oluşturur. Varyantlar belirlendikten sonra IGV (*Integrated Genome Browser*) programında görüntülenebilir [62, 63].

Tanımlanmamış değişimlerin analizinde *in silico* patojenite tahmin algoritmaları (Human Splicing Finder, PolyPhen-2, SIFT/Provean ve Mutation Taster) uygulanarak değerlendirilme yapılır (Tablo 3-1).

**Tablo 3-1. *In silico* analiz yazılımları.**

| <i>In silico</i> tahmin programı | Geliştirildiği yıl ve geliştiren kişi/kurum | Skorlamanın dayanağı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Kaynak                                      |
|----------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                  |                                             | Dizi özellikleri (Uniprot anotasyonları), süstitüsyonların yapısal etkileri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                             |
| PolyPhen2                        | 2010<br>(Shamil Sunyaev)                    | <b>HumDiv</b> , protein veri bankasında (UniProtKB) yer alan proteinleri kodlayan genlerde saptanan, Mendel hastalıkları ile ilişkilendirilmiş olan fonksiyonel olarak «zararlı» olduğu bilinen varyantları ve diğer memeli homologlarında «zararsız» olarak kabul gören varyantlar ile birlikte gruplaması<br><b>HumVar</b> , protein veri bankasında (UniProtKB) yer alan proteinleri kodlayan genlerde insanlardaki çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiş «zararlı» varyantları ve MAF>%1 olan ve hastalıkla ilişkisi bildirilmemiş, «zararsız» varyantların gruplaması | Adzhubei ve ark. <i>Nat Methods</i> . 2010. |
| Sift                             | 2009<br>(J. Craig Venter Inst.)             | PSI-BLAST’tan homolog diziler arasındaki korunmuşluğun analizi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Kumar ve ark. <i>Nat Protocols</i> . 2009.  |
| MutationTaster                   | 2010<br>(Dominik Seelow)                    | Evrimsel korunmuşluk, kırılma noktası değişimleri, poliadenilasyon sinyal dizi ve Kozak konsensus dizi değişimleri, protein anotasyonları (SwissProt)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Schwarz ve ark. <i>Nat Methods</i> . 2010.  |

### Hedef Genlerin Belirlenmesi

OMIM, HGMD profesyonel veritabanları ve güncel literatür kullanılarak, boy kısalığı ve ÇHHE ile genotip-fenotip ilişkisi olduğu bilinen 25 genin dahil edildiği panel hazırlandı (Tablo 3-2). Bu 25 genlik panelin 10’u boy kısalığı ile doğrudan ilişkili idi.

**Tablo 3-2. Panel tasarımında yer alan genler.**

Paneldeki Genler: *BMP4* (14q22.2, NM\_001202.3); *FGF8* (10q24.32, NM\_033163.3); *FGFR1* (8p11.23, NM\_023110.2); *GH1* (17q23.3, NM\_000515.4); *GHR* (5p13.1-p12, NM\_000163.4); *GHRH* (20q11.23, NM\_021081.4); *GHSR* (3q26.31, NM\_198407.2); *HESX1* (3p14.3, NM\_003865.2); *HHIP* (4q31.21, NM\_022475.2); *IGF1* (12q23.2, NM\_000618.3); *IGF1R* (15q26.3, NM\_000875.4); *IGFALS* (16p13.3, NM\_004970.2); *IGFBP3* (7p12.3, NM\_001013398.1); *IGSF1* (Xq26.1, NM\_001170961.1); *LHX3* (9q34.3, NM\_014564.3); *LHX4* (1q25.2, NM\_033343.3); *OTX2* (14q22.3, NM\_172337.2); *POU1F1* (3p11.2, NM\_000306.3); *PROKR2* (20p12.3, NM\_144773.2); *PROPI* (5q35.3, NM\_006261.4); *SHH* (7q36.3, NM\_000193.2); *SHOX* (Xp22.33 and Yp11.2, NM\_000451.3); *SOX3* (Xq27.1, NM\_005634.2); *STAT5B* (17q21.2, NM\_012448.3); *WDR11* (10q26.12, NM\_018117.11)

Bu genlerin referans transkriptlerinin kodlayan ve mutasyon tanımlanmış kodlamayan bölgeleri hedef olarak belirlendi.

### Primer Havuzlarının Oluşturulması

Hedef bölgeler için özgün primer tasarımı Ion Ampliseq sistemi kullanılarak (<https://www.ampliseq.com>) yapıldı. Tasarımda hedef alınan bölgeler 275 amplicona bölünerek (142 ve 133 ampliconluk iki primer havuzu) multipleks PZR tasarımları tamamlandı. Tasarımda 77,2 kb uzunluğundaki hedef bölgenin toplam 319 bç'lik parçasına dizi motifi ve genomik lokalizasyonu gibi nedenlerle uygun tasarım yapılamadı ve % 99,25'i kapsanmış oldu. Her genin kapsanma yüzdesi Tablo 3-3'te gösterilmektedir.

**Tablo 3-3. Panel-gen testinde yer alan genler, kapsam oranları, ilişkili olduğu hastalıklar ve hastalıkların kalıtım kalıpları.**

| GEN          | LOKUS          | İLİŞKİLİ OLDUĞU HASTALIK (OMIM/HGMD)                                                                                                                                                                                                                  | KALITIM                                 | KAPSAM (%) |
|--------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| <i>BMP4</i>  | 14q22.2        | Sendromik mikroftalmi 6 (607932), Orofasiyal yarık 11 (600625)                                                                                                                                                                                        | OD<br>-                                 | 100        |
| <i>FGF8</i>  | 10q24.32       | Hipogonadotropik hipogonadizm 6 (612702)                                                                                                                                                                                                              | OD                                      | 94,72      |
| <i>FGFR1</i> | 8p11.23        | Ensefalokraniyokutanöz lipomatoz (613001)<br>Hartsfield sendromu (615465)<br>Hipogonadotropik hipogonadizm 2 (147950)<br>Jackson-Weiss sendromu (123150)<br>Osteoglofonik displazi (166250)<br>Pfeiffer sendromu (101600)<br>Trigonosefali 1 (190440) | SMo<br>OD<br>OD<br>OD<br>OD<br>OD<br>OD | 100        |
| <i>GH1</i>   | 17q23.3        | İzole büyüme hormonu eksikliği tip 1A (262400)<br>İzole büyüme hormonu eksikliği tip 1B (612781)<br>İzole büyüme hormonu eksikliği tip 2 (173100)<br>Kowarski sendromu (262650)                                                                       | OR<br>-<br>OD<br>OR                     | 100        |
| <i>GHR</i>   | 5p13.1-<br>p12 | Parsiyel büyüme hormonu duyarsızlığı (604271)<br>Büyüme hormonuna artan yanıt<br>Laron sendromu (262500)<br>Ailevi hiperkolesterolemi (143890)                                                                                                        | -<br>-<br>OR<br>OD                      | 100        |
| <i>GHRH</i>  | 20q11.23       | İzole büyüme hormonu eksikliği<br>GHRF hipersekresyonu nedenli gigantizm                                                                                                                                                                              | -<br>-                                  | 100        |

|               |          |                                                                                                                                                |                            |       |
|---------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------|
| <i>GHSR</i>   | 3q26.31  | İzole parsiyel büyüme hormonu eksikliği (615925)                                                                                               | OD, OR                     | 100   |
| <i>HESX1</i>  | 3p14.3   | Hipofiz anomalileri ile giden büyüme hormonu eksikliği (182230)<br>Kombine hipofiz hormon eksikliği 5 (182230)<br>Septooptik displazi (182230) | OD, OR<br>OD, OR<br>OD, OR | 100   |
| <i>HHIP</i>   | 4q31.21  | Kombine hipofiz hormon eksikliği (HGMD)                                                                                                        | -                          | 100   |
| <i>IGF1</i>   | 12q23.2  | Sağırılık ve zeka geriliği ile giden büyüme geriliği (608747)                                                                                  | OR                         | 100   |
| <i>IGF1R</i>  | 15q26.3  | IGF-1 direnci (270450)                                                                                                                         | OD, OR                     | 100   |
| <i>IGFALS</i> | 16p13.3  | Asit-kararsız alt ünite eksikliği (615961)                                                                                                     | -                          | 95,85 |
| <i>IGFBP3</i> | 7p12.3   | -                                                                                                                                              | -                          | 98,18 |
| <i>IGSF1</i>  | Xq26.1   | Santral hipotiroidizm ve testiküler genişleme (300888)                                                                                         | X'e bağlı resesif          | 100   |
| <i>LHX3</i>   | 9q34.3   | Kombine hipofiz hormon eksikliği 3 (221750)                                                                                                    | OR                         | 92,05 |
| <i>LHX4</i>   | 1q25.2   | Kombine hipofiz hormon eksikliği 4 (262700)                                                                                                    | OD                         | 100   |
| <i>OTX2</i>   | 14q22.3  | Sendromik mikroftalmi 5 (610125)<br>Kombine hipofiz hormon eksikliği 6 (613986)<br>Erken başlangıçlı retinal distrofi (610125)                 | OD<br>OD<br>OD             | 100   |
| <i>POU1F1</i> | 3p11.2   | Kombine hipofiz hormon eksikliği 1 (613038)                                                                                                    | OD, OR                     | 100   |
| <i>PROKR2</i> | 20p12.3  | Hipogonadotropik hipogonadizm 3 (244200)                                                                                                       | OD                         | 100   |
| <i>PROP1</i>  | 5q35.3   | Kombine hipofiz hormon eksikliği 2 (262600)                                                                                                    | OR                         | 100   |
| <i>SHH</i>    | 7q36.3   | Holoprozensefali 3 (142945)<br>Kolobomlu mikroftalmi 5 (611638)<br>Şizensefali (269160)<br>Üst çenede santral tek kesici diş (147250)          | OD<br>OD<br>-<br>OD        | 100   |
| <i>SHOX</i>   | Xp22.33  | Langer mezomelik displazi (249700)<br>Leri-Weill diskondrostoza (127300)<br>Ailevi idiyopatik boy kısalığı (300582)                            | OR<br>OD<br>-              | 93,29 |
| <i>SOX3</i>   | Xq27.1   | İzole büyüme hormonu eksikliği ile giden zeka geriliği (300123)<br>Panhipopituitarizm (312000)                                                 | X'e bağlı                  | 100   |
| <i>STAT5B</i> | 17q21.2  | İmmün yetmezlikle giden büyüme hormone duyarsızlığı (245590)<br>Lösemi, akut promyelositik, somatic (102578)                                   | -                          | 100   |
| <i>WDR11</i>  | 10q26.12 | Hipogonadotropik hipogonadizm 14 (614858)                                                                                                      | OD                         | 99,87 |

OD: otozomal dominant, OR: otozomal resesif, SMO: somatik mozaicism.

### Hedef Bölgelere Ait Hotspot Mutasyon Dosyasının Oluşturulması

Analizde kullanılmak üzere, hedef bölgedeki tanımlanmış mutasyonlara ait bilgiler *HGMD Professional 2017.1* veritabanından indirildi. Her mutasyonun yer aldığı kromozom, başlangıç-bitiş koordinatları, ismi, referans ve mutant allel bilgilerini içeren *BED* dosyası oluşturuldu. Oluşturulan dosya, Torrent Server ve Ion Reporter'daki akış şemasına eklendi.

*Hotspot* mutasyon dosyasının hazırlanma nedeni veri analizi aşamasında dosyadaki değişim noktalarına öncelikli olarak bakılmasının istenmesi ve değişimlerin isimlendirilmesidir.

### **Kütüphane Hazırlanması**

Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) kullanılarak firma protokollerine uygun şekilde kütüphane hazırlandı. Kütüphane ürünleri, Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies) ile barkodlandı. Agentcourt AMPure XP reagent ve %70'lik etanol kullanılarak firma protokollerine uygun şekilde barkodlanan ürünlerin saflaştırıldı.

### **Hedef DNA Bölgelerinin Çoğaltılması**

Hedef bölgelerin çoğaltılması amacıyla iki primer havuzu kullanıldı. Tablo 3-4'te gösterildiği gibi her örnek için iki farklı karışım hazırlandı.

**Tablo 3-4. Primer havuzu (2x) için hazırlanan karışım.**

| Malzeme                       | Miktar |
|-------------------------------|--------|
| 5X Ion Ampliseq HiFi Mix      | 4 µl   |
| 2X Ion Ampliseq Primer Havuzu | 10 µl  |

PZR için; hazırlanan iki karışım kullanılarak örnek başına Tablo 3-5'de gösterilen şekilde iki farklı solüsyon (*pool 1 ve pool 2 olmak üzere*) oluşturuldu.

**Tablo 3-5. Kütüphane PZR için hazırlanan karışım.**

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| 2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks | 14 µl        |
| Seyreltilmiş DNA örneği               | 6 µl         |
| <b>Total hacim</b>                    | <b>20 µl</b> |

Plate MicroAmp® adhesive film ile kapatılarak vortekslendi ve kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü. Termal Döngü Cihazı Tablo 3-6'de gösterilen koşullara ayarlanarak PZR işlemine geçildi.

**Tablo 3-6. Hedef bölge amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.**

| Basamak      | Adım                                                       | Sıcaklık | Zaman |
|--------------|------------------------------------------------------------|----------|-------|
| Bekleme      | Enzimi aktifleştirmek için                                 | 99°C     | 2dk   |
| Döngü        | Denatürasyon                                               | 99°C     | 15sn  |
|              | Bağlanma ve Uzatma                                         | 60°C     | 4dk   |
| Bekleme      | —                                                          | 10°C     | Tutma |
| Döngü sayısı | 19 tekrar( <i>amplikon sayı esas alınarak belirlenir</i> ) |          |       |

### ***Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi***

Toplam hacim 20 µl olacak şekilde iki primer havuzu ile çoğaltılmış PZR ürünleri her birinden 10’ar µl alınarak birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 2 µl FuPa Reagent eklendikten sonra MicroAmp® adhesive film ile kapatılan plate vortekslendi ve kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü ve Tablo 3-7’deki koşullara ayarlanmış termal döngü cihazına koyuldu.

**Tablo 3-7. Primerlerin kesimi için kullanılan termal döngü programı.**

| Sıcaklık | Süre                    |
|----------|-------------------------|
| 50 °C    | 10 dk                   |
| 55 °C    | 10 dk                   |
| 60 °C    | 20 dk                   |
| 10 °C    | Bekleme (1 saate kadar) |

### ***Adaptörlerin Bağlanması ve Barkodlama***

Her barkod (Ion Express™ Barcode), Ion P1 Adapter ve nukleaz içermeyen su ile karıştırılarak 1:4 oranında seyreltildi (Tablo 3-8).

**Tablo 3-8. Barkod-adaptör karışımı.**

| İçerik                             | Hacim       |
|------------------------------------|-------------|
| Ion P1 Adapter                     | 2 µl        |
| Ion Xpress™ Barcode X <sup>1</sup> | 2 µl        |
| Nukleazdan arındırılmış su         | 4 µl        |
| <b>Toplam hacim</b>                | <b>8 µl</b> |

<sup>1</sup>: Seçilmiş barkod

Primerlerin kesiminden sonra ürünlere (22 µl), örnek başına, Tablo 3-7’deki miktarlarda Switch solüsyonu, barkod-adaptör karışımı ve DNA ligaz eklendikten sonra

plate MicroAmp® adhesive film ile kapatılarak vortekslendi ve kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü. Plate barkod-adaptörlerin ligasyonu için Tablo 3-9'daki gibi ayarlanan termal döngü cihazına koyuldu.

**Tablo 3-9. Barkod-adaptör ligasyon karışımı ve termal döngü programı.**

| Malzeme                                       | Hacim        |
|-----------------------------------------------|--------------|
| Switch solusyonu                              | 4 µl         |
| Barkod-Adaptör Karışımı                       | 2 µl         |
| DNA ligaz                                     | 2 µl         |
| <b>Toplam Hacim (22 µl ürün ile birlikte)</b> | <b>30 µl</b> |

| Sıcaklık | Süre                    |
|----------|-------------------------|
| 22 °C    | 30 dk                   |
| 72 °C    | 10 dk                   |
| 10 °C    | Bekleme (1 saate kadar) |

Ligasyon sonrasında fazla DNA materyali ve enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla barkodlanmış ürünlerin saflaştırılması aşamasına geçildi.

#### ***Barkodlanan Ürünlerin Saflaştırılması***

Her örneğe hacminin 1.5 katı (45 µl) Agencourt® AMPure® XP Reagent eklenerek pipetaj yapıldı ve plate 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra plate manyetik rafa (DynaMagTM-96 Side Magnet [Cat.no.12331D]) alınarak oda sıcaklığında ~2 dk inkübe edildi. Solüsyon berraklaştıktan sonra supernatant atıldı ve her kuyuya 150 µl %70'lik taze hazırlanmış etanol eklendi. Plate manyetik raf üzerinde yanlara hareket ettirilerek amplikon bağlı manyetik boncuklar etanol ile yıkandı ve ardından supernatant atıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandı ve alkolün tamamen uzaklaştığından emin olmak için plate oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Ardından kütüphane ürünlerinin normalizasyonu aşamasına geçildi. Kütüphaneler Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı ile ölçüldü.

#### ***Saflaştırılmış Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçümü ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama***

Kütüphane Platinum® PCR SuperMix High Fidelity kullanılarak çoğaltıldı ve saflaştırıldı. Qubit® 2.0 Fluorometer ile ölçüldü. Taslak reaksiyonu hazırlarken Ion

Template kit'in kullanımı için son konsantrasyonu ~15-22 ng/mL olan sulandırma faktörü belirlendi.

Ion AmpliSeq™ kütüphanesini içeren plate manyetik raftan alındı ve 50 µL Platinum® PCR SuperMix High Fidelity ve 2 µL Library Amplification Primer Mix tüm pelletlerin üzerine eklendi. Plate MicroAmp® adhesive film kapatılarak vortekslendi ve kısa santrifüj işlemi uygulandı. Plate magnet üzerine alınıp 2 dk bekletildikten sonra ~50'şer µL hacimdeki süpernatantlar temiz bir plate'e aktarıldı. Termal döngü cihazında Tablo 3-10'daki programa koyuldu.

**Tablo 3-10. Kütüphane amplifikasyonu için termal döngü programı.**

| Evre    | Sıcaklık | Zaman |
|---------|----------|-------|
| Tutma   | 98 °C    | 2 dk  |
| 5 Döngü | 98 °C    | 15 sn |
|         | 64 °C    | 1 dk  |
| Tutma   | 10 °C    | Tutma |

Agencourt® AMPure® XP Reagent ile saflaştırma iki aşamada gerçekleştirildi.

*I*, örnek hacim bead oranı 0.5X: Amplikon ve primerler çözeltide kalırken yüksek moleküler ağırlıktaki DNA bead'lere bağlandı. Süpernatant saklandı.

*II*, orijinal örnek hacim bead oranı 1.2X: Amplikonlar bead'lere bağlandı ve primerler çözeltide bırakıldı. Beadler tutularak amplikonlar beadlerden çöktürülerek uzaklaştırıldı

Bu aşamalar aşağıdaki protokole uygun gerçekleştirildi;

#### İlk Aşama Saflaştırması

~50'şer µL örnek içeren plate kuyularına 25 µL (0.5X örnek hacmi) Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi. Dikkatlice 5 kez pipetleme yapılarak DNA-bead süspansiyonu sağlandı ve plate MicroAmp® adhesive film ile kapatılarak karışım oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi. Plate magnet üzerine alınarak solüsyon tamamen berraklaşana kadar (en az 5 dk) bekletildi. Her kuyudaki süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir plate'e taşındı. Aktarılan süpernatant istenen amplikonları içerir.

### İkinci Aşama Saflaştırması

60 µL Agencourt® AMPure® XP Reagent Süpernatant'a eklendi. 5 kez dikkatlice pipetleme yapılarak DNA-bead süspansiyonu sağlandı ve aynı şekilde MicroAmp® adhesive film ile plate kapatılarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Solüsyon tamamen berraklaşınca kadar (en az 3 dk) manyetik raf üzerine alındı. Bu aşamada ampliconlar beadlere bağlandıkları süpernatant atılarak pellet saklandı. Her kuyuya 150 µL yeni hazırlanmış %70'lik etanol eklendi ve plate yanlara hareket ettirilerek beadler yıkandı. Süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Daha sonra etanolün tamamen uzaklaşması için beadler magnet üzerinde oda sıcaklığında 5 dk kurumaya bırakıldı. Aşırı kurutmaktan çekinmek gerekir. Plate magnetten alındı ve beadlerin üzerine 50 µL Low TE eklenerek MicroAmp® adhesive film ile kapatıldı, vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı. Bu aşamada süpernatant ampliconları içermektedir. Plate en az 2 dk magnet üzerine alındı. Daha sonra kütüphane Qubit® 2.0 fluorometre ile ölçüldü ve sulandırma faktörü hesaplandı.

Her kütüphanenin 10 µL'si Qubit® 2.0 Fluorometer (Cat. no. Q32866) ve Qubit® dsDNA HS Assay Kit kullanılarak analiz edilir. Çoğalmış kütüphane genellikle 300–1500 ng/mL konsantrasyona sahiptir. Konsantrasyonunu belirlemek için:

- a) Qubit® dsDNA HS, Qubit® dsDNA HS Buffer kullanılarak 1:200 oranında sulandırma yapıldı.
- b) 10 µL kütüphane 190 µL boyalı reaktif ile karıştırılarak 2 dk inkübe edildi.
- c) Qubit® 2.0 Fluorometrede konsantrasyon ölçüldü.
- d) 20 ile çarpılarak sulandırılmamış kütüphanenin konsantrasyonu hesaplandı.

Bu hesap Qubit cihazında Calculate Stock Concentration düğmesi ile örnek hacmi 10 µL girilerek otomatik hesaplanır. Kütüphaneler ~100 pM'a sulandırıldı (15 ng/ml için 225 bç amplicona, 22 ng/ml için 275 bç amplicona kadar) ve taslak hazırlamaya geçildi.

### Taslak Hazırlanması

Kütüphanelere emülsiyon bazlı PZR uygulandı. Her bead'e bir amplicon bağlanması ve yağ küreciği içinde klonal olarak çoğalması sağlandı. Aşağıdaki protokol izlenerek emülsiyon PZR ile klonal amplifikasyon ve zenginleştirme gerçekleştirildi.

### Emülsiyon PZR

Kütüphaneler aşağıdaki tabloya göre seyreltildi (Tablo 3-11).

**Tablo 3-11. Kütüphane seyreltilmesi.**

|                                                                        | Ion <sup>TM</sup><br>AmpliSeq DNA<br>Kütüphanesi | Ion <sup>TM</sup><br>AmpliSeq RNA<br>Kütüphanesi | gDNA Fragment<br>veya Amplikon<br>Kütüphanesi | Ion Total<br>RNA-Seq<br>kütüphanesi |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------|
| Kütüphane konsantrasyonu                                               | 100 pM                                           | 100 pM                                           | 100 pM                                        | 100 pM                              |
| Kütüphane hacmi                                                        | 2 µL                                             | 4 µL                                             | 6.5 µL                                        | 5 µL                                |
| Nükleazdan arındırılmış suyun hacmi                                    | 23 µL                                            | 21 µL                                            | 18.5 µL                                       | 20 µL                               |
| Amplifikasyon solüsyonuna eklenecek total seyreltilmiş kütüphane hacmi | 25 µL                                            | 25 µL                                            | 25 µL                                         | 25 µL                               |

Önceki basamakta hazırlanan kütüphaneden 2 µl alınarak nükleaz içermeyen su ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlandı. Böylece ürünler 12 pM'a seyreltildi. Emülsiyon PZR için Tablo 3-12'deki gibi çözelti hazırlandı.

**Tablo 3-12. emPZR çözeltisi.**

| Malzeme                                              | Hacim         |
|------------------------------------------------------|---------------|
| Ion PGM Template Hi-Q <sup>TM</sup> View Reagent Mix | 800 µl        |
| Ion PGM Template Hi-Q <sup>TM</sup> View Enzyme Mix  | 50 µl         |
| Nükleazdan arındırılmış su                           | 25 µl         |
| Seyreltilmiş kütüphane                               | 25 µl         |
| <b>Toplam hacim</b>                                  | <b>900 µl</b> |

Hazırlanan çözelti vortekslendikten sonra toplam hacim çözelti üzerine 100 µl Ion PGM Template Hi-Q<sup>TM</sup> View Ion Sphere Particles eklenerek 1000 µl'ye tamamlandı. Vortekslendikten sonra karışım reaksiyon filtresine (Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly) yüklendi. Uygun programda, Ion OneTouch 2 cihazında emülsiyon PZR yapıldı (Şekil 3-2).



**Şekil 3-2. Ion OneTouch 2 cihazında emülsiyon PZR.**

### ***Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi***

Emülsiyon PZR sonrası 10 dk santrifüjle amplikon yüklü partiküller çöktürüldü. 100 µl ürün bırakılarak süpernatant atıldı. Üstlerine 500 µl Ion OneTouch Yıkama Solüsyonu eklenerek pipetlendi ve yeni bir eppendorf tüpte birleştirildi. 2,5 dk santrifüjden sonra tüpte 100 µl bırakılarak süpernatant atıldı ve zenginleştirme çözeltileri hazırlandı.

### ***Melt-Off Çözeltilisinin Hazırlanması***

Melt-Off çözeltisi için Tween® Solution ve 1 M NaOH kullanıldı. Final yoğunluklar; % 0.1 Tween® 20 deterjan ve 125 mM NaOH olacak şekilde, 280 µl Tween® Solution ve 40 µl 1 M NaOH kullanılarak 320 µl melt-off çözeltisi hazırlandı.

### ***Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkama***

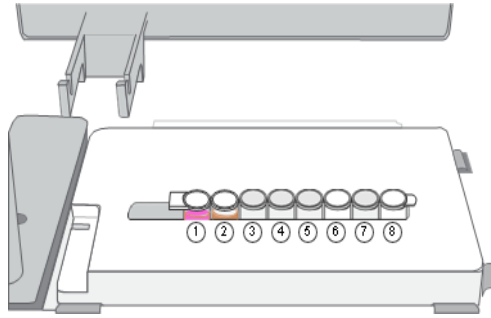
13 µl DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Eppendorf, manyetik rafa (DynaMag™ -2 Magnet) alındı ve oda ısısında 2 dk bekletildi. Boncukların tüp duvarına yapıştıktan sonra süpernatant atıldı. 130 µl MyOne™ Beads Wash Solution eklenen eppendorf manyetik raftan alınarak pipetaj yapıldı. Böylece streptavidin C1 boncukları, stok çözeltiden uzaklaştırılmış oldu.

### ***Sekiz Kuyulu Levhanın Doldurulması***

Zenginleştirme için Emülsiyon PZR ürünü ve çözeltiler 8 kuyulu levhaya yüklenerek, zenginleştirmeden sonra ürünün aktarılacağı 0.2 ml'lik eppendorf tüp de 10 µl nötralizasyon solüsyonu koyularak Ion OneTouch™ ES cihazına (Şekil 3-3) konuldu.

**Tablo 3-13. 8 kuyulu levhanın doldurulması.**

| Kuyu Numarası | Yüklenen malzeme                                 |
|---------------|--------------------------------------------------|
| Kuyu 1        | Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)                     |
| Kuyu 2        | DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl) |
| Kuyu 3        | Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)             |
| Kuyu 4        | Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)             |
| Kuyu 5        | Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)             |
| Kuyu 6        | Boş                                              |
| Kuyu 7        | Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)     |
| Kuyu 8        | Boş                                              |

**Şekil 3-3. Ion OneTouch™ ES cihazında zenginleştirme aşaması.**

Zenginleştirme ürünü çipe yükleneceğinden çip kapasitesine göre hacmi belirlendi.

### Dizileme

Dizileme için Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit kullanıldı. Ion PGM™ cihazının kanallarının tıkanmaması için çalışma öncesi 18 MΩ su ve klorid tablet ile yıkama, pH kalibrasyonları yapıldı ve ürünler çipe (Ion 318™ Chip v2) yüklendi. Tablo 3-14'teki gibi dizileme planı oluşturularak işlem başlatıldı.

**Tablo 3-14. Dizileme planı.**

|                                          |                                                                                         |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Ion Reporter                             | Version: 5.6                                                                            |
| Örnek                                    | DNA                                                                                     |
| Hedef Tekniği                            | AmpliSeq DNA                                                                            |
| Ion reporter iş akışı                    | SS_CHD_W_HOTSPOTv6                                                                      |
| Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit | Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit                                                            |
| Kütüphane anahtarı                       | Ion TCAG (TCAG)                                                                         |
| Template Kiti                            | Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2                                                                 |
| Dizileme Kiti                            | Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit                                                        |
| Akış sayısı                              | 850                                                                                     |
| Çip Tipi                                 | Ion 318™ Chip v2                                                                        |
| 3' Adaptör:                              | Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGA<br>GAC)                                            |
| Barkod                                   | IonXpress                                                                               |
| Boncuk yükleme (%)                       | 10                                                                                      |
| Anahtar Sinyal (1-100)                   | 30                                                                                      |
| Kullanılabilir dizi (%)                  | 30                                                                                      |
| Referans Kütüphane                       | Hg 38 ( <i>Homo sapiens</i> )                                                           |
| Hedef Bölgeler                           | SS_CHD_IAD116213_197_Designed                                                           |
| Hotspot Bölgeler                         | SS_CHD_hotspots_v6                                                                      |
| Eklentiler                               | coverageAnalysis, FileExporter, RunTransfer,<br>variantCaller (germline_low_stringency) |
| Proje                                    | SS_CHD                                                                                  |

### Verilerin Analizi

Dizileme sonrasında Coverage Analysis v5.6.0.1, Torrent Variant Caller v5.6.0.4 gibi eklentileri bulunan Torrent Server yazılımına aktarılan verilerin BAM dosyaları, önce kalite incelemeleri, kapsanmayan veya yeterli okuma derinliği elde edilemeyen bölgeler araştırıldı ve analiz için Ion Reporter Uploader kullanılarak bulut bazlı Ion Reporter (v.5.6) programına aktarıldı.

*Ion Reporter* 'a da hedef ve hotspot bölgeleri içeren BED dosyası eklenerek hasta verilerinin analiz edileceği analiz akış şeması oluşturuldu. Her hastada bulunan değişimler, hotspot mutasyon dosyası verileri, NoRef, NoCall ve dbSNP minör allel frekansı (MAF) filtreleri kullanılarak değerlendirildi. MAF filtresi frekansı <0%1'in altındaki değişimleri gösterecek şekilde ayarlandı. Değişimler proteine etkisi, ekspresyon paternleri, türler arası korunmuşluk gibi veriler göz önüne alınarak değerlendirildi. Değişimler çeşitlerine göre stop kodon, çerçeve kayması, kırılma hatası ve missense olmak üzere önceliklendirildi. Aday genler Online Mendelian Inheritance in Man

(OMIM), ClinVar, Genecards ve UCSC Genome portalları kullanılarak incelendi [64-67]. Değişimlerin toplum sıklığı ExAC veritabanından da kontrol edildi.

Değişimler, *in silico* tahmin araçlarının değerlendirmeleri, sıklıkları ve gelişim yolları ile etkileşimleri, üzerinde bulundukları genin anlatımı ve işlevi, diğer kohortlardaki varlığı ve hastalıkla birlikte ailede segrege olma durumları gibi kriterlerle yorumlandı.

Çeşitli veritabanları kullanılarak tanımlanmamış değişimlerin *in silico* patolojik olup olmadığı değerlendirildi. Kalıtım kalıbı ve fenotip ile uyumlu bulunan tanımlanmamış değişimler için aile çalışmaları yapıldı.

Fenotiple ilişkili hiçbir değişim saptanmayan olgularda tek yön okuma, düşük okuma derinliği ya da yön uyumsuz okuma gibi nedenlerle noCall olarak sınıflanan lokasyonlar IGV ile görsel olarak incelendi, okuma yokluğu nedeniyle noCall olarak sınıflanan bölgeler kapsanmayan bölge çalışmalarında Sanger dizileme ile tarandı.

#### **3.1.2.4. YND ile Saptanan Değişimlerin ve Panel-Gen Testi ile Kapsanmayan veya Derinliği Düşük Bölgelerin Sanger Dizileme Çalışmaları**

Saptanan değişimlerin doğrulanması ve aile çalışmaları için özgün primerler tasarlandı ve bölgeler Sanger dizileme ile tarandı.

Ayrıca, YND temelli Panel-Gen Testinde kapsanmayan ve düşük derinlikli bölgeler belirlenerek, literatürde tanımlanmış mutasyon içerenler incelendi. YND ile mutasyon saptanmayan olgularda *SHOX* ekzon 6 ve *IGF1R* ekzon 2 tarandı.

#### **Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması**

Primer tasarlama sürecinde seçilen primerlerin, dbSNP’de bildirilen herhangi bir SNP veya tekrarlı dizi içermemesine, ileri ve geri primerlerin bağlanma ısıları arasında en fazla 2-3°C fark olmasına, eşit dağılımlı A-T ve C-G nükleotidleri içermesine, boyut olarak 18-25 nükleotid uzunluğunda olması ve hedeflenen bölgeyi kapsamasına (dizi analizinde ilk ~30-50 bazın iyi okunamayabileceği göz önünde tutularak) özen gösterildi. Özgünlük, UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)’den *in silico* PZR, NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ve Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtDNA.com/calc/analyzer>) ile test edildi.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Her PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH<sub>2</sub>O) ile 50 µl'ye tamamlanacak şekilde hazırlandı. Amplifiye edilen her bölge DNA içermeyen kontrol PZR'ı (negatif kontrol) ile birlikte çalışıldı. Tüm çalışmalar soğuk tüp mahfazası üzerinde gerçekleştirildi.

PZR; 95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyon, ardından 95°C de 30 sn denatürasyon, ısının 64-52°C arasında değiştiği 30 sn'lik primer bağlanma, ve 70°C de 45-90 sn (1 kb / 1 dk) uzama basamaklarını içeren 40 döngü ve 70°C de 10 dk'lık son uzama aşamalarından oluşup termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Cihazdan alındıktan sonra PZR ürünlerinden 5'er µl alınarak 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde, 1X TBE tamponunda, 120 V'da 20 dk yürütülerek amplikonların bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Bantlar UV altında görüntülendi ve kaydedildi.

### **PZR Saflaştırılması**

PZR ürünlerinin dizi reaksiyonu öncesi saflaştırması enzimatik yöntem ile yapıldı.

#### ***Enzimatik Yöntem ile Saflaştırma***

Saflaştırma için Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. 37°C'de 30 dak., 85°C'de 15 dak. protokolü ayarlanarak enzim koyulmuş PZR ürünleri termal döngü cihazına koyuldu. Cihazdan alınan saflaştırılmış ürünler sonraki işlem için +4°C'de ve karanlıkta saklandı.

### **DNA Dizi Analizi**

PZR ile çoğaltılıp saflaştırılan amplikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi. Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı.

### **Dizi PZR Reaksiyonu**

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer, BigDye v3.1 (ddNTP'leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içerir), Primer (PZR da kullanılan primerler çiftinden biri ya da her ikisi), saflaştırılmış PZR ürünü ve dH<sub>2</sub>O eklenerek plate (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek ve her kuyucuğun final hacmi 10µl olacak şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazına alınarak, toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn denatürasyon, 50°C de 5 sn bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamaklarına tabi tutuldu. Cihaz 4°C'ye geldiğinde dizi reaksiyon ürünleri alındı.

### **Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması**

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin artık primer ve reaktiflerden arındırılması için ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. Plate koruyucu yapışkan bantla kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi. 3810 rpm'de 45 dak. santrifüj edildi. Koruyucu bant çıkartıldı ve plate ters şekilde 1100 rpm'de 30 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Plate her kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendikten sonra koruyucu bantla kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Koruyucu bant açıldı ve plate ters şekilde 1170 rpm'de 60 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklenerek örnekler 95 °C de 5 dak. denatüre edildi ve 2 dak. buzda bekletildi.

### **Elektroforez Cihazına Yükleme**

Plate ABI3500 cihazına yerleştirilerek yürütme işlemi seçildi. Yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış boya seti olan Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi: 180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn.'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

### **Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

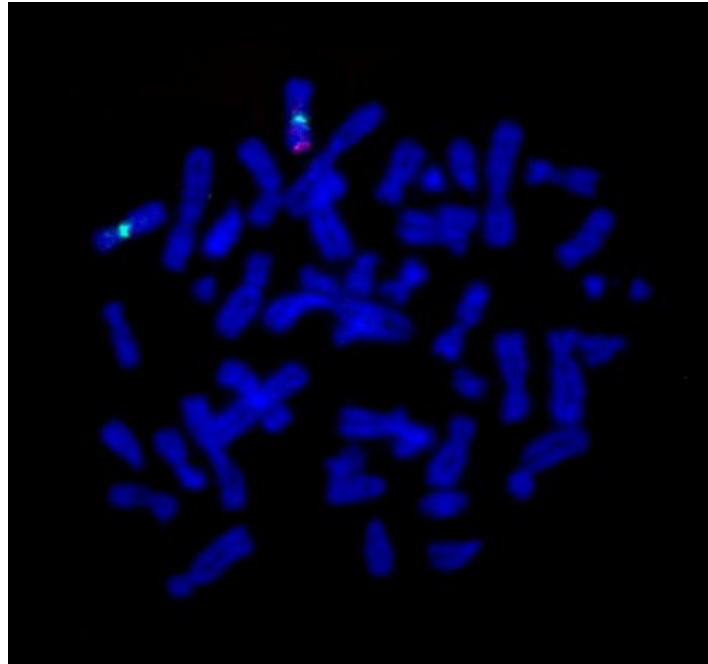
Kapiller Elektroforezden alınan ab1 dosyası ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v.3.0 [68] programlarında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analizden önce programa referans dizi ekzon ve intronları ile birlikte tanıtıldı. Dizilemeden sonra olgunun ab1 formatındaki dizisi programa yüklenerek analiz komutu verildi. Olgu dizisinin hedef bölge üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu,

saflaştırma kalitesi, pik kalitesi, dizilenen baz sayısı, pik yüksekliği ve arkaplan kirliliği kontrol edilerek değerlendirildi. Kontrollerden sonra bu ölçütlerin yeterli olmadığı örnekler PZR aşamasından, yeterli örnek varsa dizi saflaştırmadan itibaren tekrarlandı. Analizde, olgu dizisi ve referans dizi karşılaştırıldı, tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanlarından yararlanılarak programda işaretlendi. Sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Olguların Fizik Muayene, Laboratuvar ve Genetik Analiz Sonuçları

Olguların fizik muayene, laboratuvar ve radyodiagnostik görüntüleme sonuçları Tablo 4-4 – 4-6’da gösterilmiştir. İBK olduğu düşünülen 189 olgu tez kapsamına alındı. 16’sında konvansiyonel kromozom analizi ile saptanabilen kromozom anomalileri, 1’inde FISH incelemesi ile *SHOX* genini içeren mikrobelesyon saptandı (Şekil 4-1). YND için çalışmamıza alınan 41 olgudan oluşan grupta akraba evliliği oranı %39 idi. YND çalışmaları sonucunda toplam 5 olguda 5 ayrı gende biri tanımlı olmak üzere 5 ayrı anlamlı olabilecek değişim saptandı. Bu 5 olgunun 3’ünde anne-baba arasında akrabalık vardı. Değişimler Sanger dizileme ile konfirme edildikten sonra aile çalışmalarına geçildi, 3 indeks olguda saptanan değişimler ailedeki sağlıklı bireylerde de aynı şekilde saptandığından bu sonuç bu değişimlerin patojenite olasılığını düşürdü. Olguların genetik analiz sonuçları Tablo 4-1 – 4-3’te ayrıntılı şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4-1. FISH incelemesinde saptanan *SHOX* delesyonu.

**Tablo 4-1. Genetik analiz sonuçlarına genel bakış.**

| Kullanılan Teknikler  | $\Sigma n$ | Normal<br>Sonuç<br>n | Anormal<br>Sonuç<br>n % |
|-----------------------|------------|----------------------|-------------------------|
| Karyotip analizi      | 189        | 173                  | 16 8,5                  |
| SHOX delesyonu (FISH) | 153        | 152                  | 1 0,65                  |
| NGS Panel             | 41         | 36                   | 5* 12,2                 |

\* Aile çalışmalarından önceki sonuç.

**Tablo 4-2. Olgularda saptanan kromozom anomalileri.**

| Saptanan Kromozom Anomalileri                                                                            | $\Sigma n$ | Anomali<br>serisi<br>% | Genel<br>seri<br>% |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------|--------------------|
| 45,X                                                                                                     | 4          | 25                     | 2,1                |
| 45,X/46,XX [26/4]                                                                                        | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 45,X/47,XXX[30/55], YM: nuc ish (DXZ1x 1/DXZ1x 2/DXZ1x 3/DYZ3x0) [16/19/65]                              | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,X,i(X)(q10)                                                                                           | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 45,X/46,X,i(X)(q10) [15/35]                                                                              | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 45,X/46,X,idic(X)(p11.22)                                                                                | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 45,X/46,X,Xq-?. ish der(X)(pter->q13.1::p11.4->pter)                                                     | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,X,Xp-.ish del(X)(p11.1->pter)                                                                         | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,X,Xq-.arrXq21.1q28(82809860_155208244)x1                                                              | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,X,idic(Y)(p11.31),SHOX -                                                                              | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,XX,del (X)(p22.3) (SHOX-)                                                                             | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 47,XX,+mar.ish +mar(SHOXx2/DXZ1x2).arr(1-22,X)x2                                                         | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,XX,del(18)(p10)dn*                                                                                    | 1          | 6,25                   | 0,5                |
| 46,XX,r(11)(pterq24.2?)/47,XX,r(11)(pterq24.2?)+8 32/4].ish (D11S2071+/VIJyRM2072-,D8Z2x2/D8Z2x3)[49/32] | 1          | 6,25                   | 0,5                |

\* *de novo*

Tablo 4-3. Olguların YND analizi sonuçları.

|                            | <b>Olgu 23</b>                                                   | <b>Olgu 39</b>         | <b>Olgu 31</b>                                                                                   | <b>Olgu 13</b>                                                             | <b>Olgu 20</b>                                                      |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>Karyotip</b>            | 46,XX                                                            | 46,XX                  | 46,XX                                                                                            | 46,XY                                                                      | 46,XX                                                               |
| <b>Gen</b>                 | <i>GHR</i>                                                       | <i>BMP4</i>            | <i>LHX4</i>                                                                                      | <i>IGSF1</i>                                                               | <i>PROKR2</i>                                                       |
| <b>Referans transkript</b> | NM_000163.4                                                      | NM_001202.5            | NM_033343.3                                                                                      | NM_001170961.1                                                             | NM_144773.2                                                         |
| <b>Ekzon</b>               | 4                                                                | 4                      | 3                                                                                                | 12                                                                         | 1                                                                   |
| <b>Zigozite</b>            | Het.                                                             | Het.                   | Hom.                                                                                             | Hem.                                                                       | Het.                                                                |
| <b>Nükleotid</b>           | c.170G>A                                                         | c.430C>T               | c.385G>A                                                                                         | c.1811A>C                                                                  | c.254G>A                                                            |
| <b>Protein</b>             | p.Arg57His                                                       | p.Leu144Phe            | p.Glu129Lys                                                                                      | p.Asn604Thr                                                                | p.Arg85His                                                          |
| <b>id dbSNP / HGMD</b>     | rs373412197                                                      | rs199698258            | rs150875319                                                                                      | rs146462069                                                                | rs74315418/CM065401                                                 |
| <b>Varyant sıklığı</b>     | A=0.00006/7 (ExAC)<br>A=0.0002/2 (GO-ESP)<br>A=0.0002/5 (TOPMED) | -                      | A=0.0005/57 (ExAC)<br>A=0.0020/10 (1000 Genomes)<br>A=0.0015/20 (GO-ESP)<br>A=0.0021/61 (TOPMED) | G=0.0057/485 (ExAC)<br>G=0.0056/21 (1000 Genomes)<br>G=0.0100/106 (GO-ESP) | T=0.0007/90 (ExAC)<br>T=0.0012/16 (GO-ESP)<br>T=0.0008/104 (TOPMED) |
| <b>Referans</b>            | Bu çalışma                                                       | Bu çalışma             | Bu çalışma                                                                                       | Bu çalışma                                                                 | Tanımlı                                                             |
| <b>Mutation Taster</b>     | disease causing                                                  | disease causing        | disease causing                                                                                  | polymorphism                                                               | -                                                                   |
| <b>In silico analizler</b> | <b>PolyPhen-2 (Hum Var)</b>                                      | probably damaging      | probably damaging                                                                                | probably damaging                                                          | -                                                                   |
|                            | <b>Provean</b>                                                   | neutral                | deleterious                                                                                      | deleterious                                                                | neutral                                                             |
|                            | <b>SIFT</b>                                                      | damaging               | damaging                                                                                         | damaging                                                                   | damaging                                                            |
|                            | <b>InterVar</b>                                                  | uncertain significance | likely pathogenic                                                                                | likely benign                                                              | uncertain significance                                              |

**Tablo 4-4. Olguların fizik muayene bulguları.**

| Olgular | İlk başvuru (yıl) | Cins. | Doğum haftası | Doğum ağırlığı (gr) | SDS*  | Doğum boyu | SDS*  | Akraba evliliği (varsa derecesi) | Anne boyu (cm) | SDS** | Baba boyu (cm) | SDS** | Hedef boy (cm) | SDS** | Başvuru yaşı | Başvuru sırasında ağırlık (kg) | SDS** | Başvuru sırasında boy (cm) | SDS** | Başvuru sırasında baş çevresi (cm) | SDS** | Başvuru sırasında VKİ (kg/m²) | SDS** | Başvuru sırasında OY/boy |
|---------|-------------------|-------|---------------|---------------------|-------|------------|-------|----------------------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|--------------|--------------------------------|-------|----------------------------|-------|------------------------------------|-------|-------------------------------|-------|--------------------------|
| 13      | 2017              | E     | term          | 3500                | 0,10  | 50         | -0,32 | 1. kuzen                         | 145            | -2,78 | 165            | -1,58 | 161,5          | -2,06 | 15,77        | 48,6                           | -1,92 | 148,9                      | -3,54 | 53,8                               | -2,19 | 21,92                         | 0,06  | 0,53                     |
| 20      | 2010              | D     | term          | 3600                | 0,67  | -          | -     | 1. kuzen                         | 156            | -1,09 | 176            | -0,07 | 159,5          | -0,56 | 11,06        | 31,4                           | -1,05 | 128,4                      | -2,57 | -                                  | -     | 19,05                         | 0,35  | 0,53                     |
| 23      | 2017              | D     | 35            | 2400                | 0,24  | 48         | 0,96  | yok                              | 164,5          | 0,21  | 163,5          | -1,79 | 157,5          | -0,86 | 13,26        | 43,3                           | -1,11 | 141,1                      | -2,9  | 55                                 | 0,13  | 21,75                         | 0,59  | -                        |
| 31      | 2013              | D     | term          | 3300                | -0,14 | 49         | -0,56 | 1. kuzen                         | 163,9          | 0,11  | 170            | -0,9  | 160,45         | -0,41 | 11,6         | 32,6                           | -1,39 | 130,9                      | -2,9  | 52,5                               | -0,9  | 19,03                         | 0,15  | 0,55                     |
| 39      | 2016              | D     | term          | 3180                | -0,47 | 50         | 0,00  | yok                              | 160            | -0,48 | 182            | 0,75  | 164,5          | 0,21  | 8,55         | 22,7                           | -1,13 | 119,5                      | -1,82 | 50,8                               | -0,88 | 15,9                          | -0,14 | 0,54                     |

\* Kurtoğlu ve ark. [69]

\*\* Neyzi ve ark. [70]

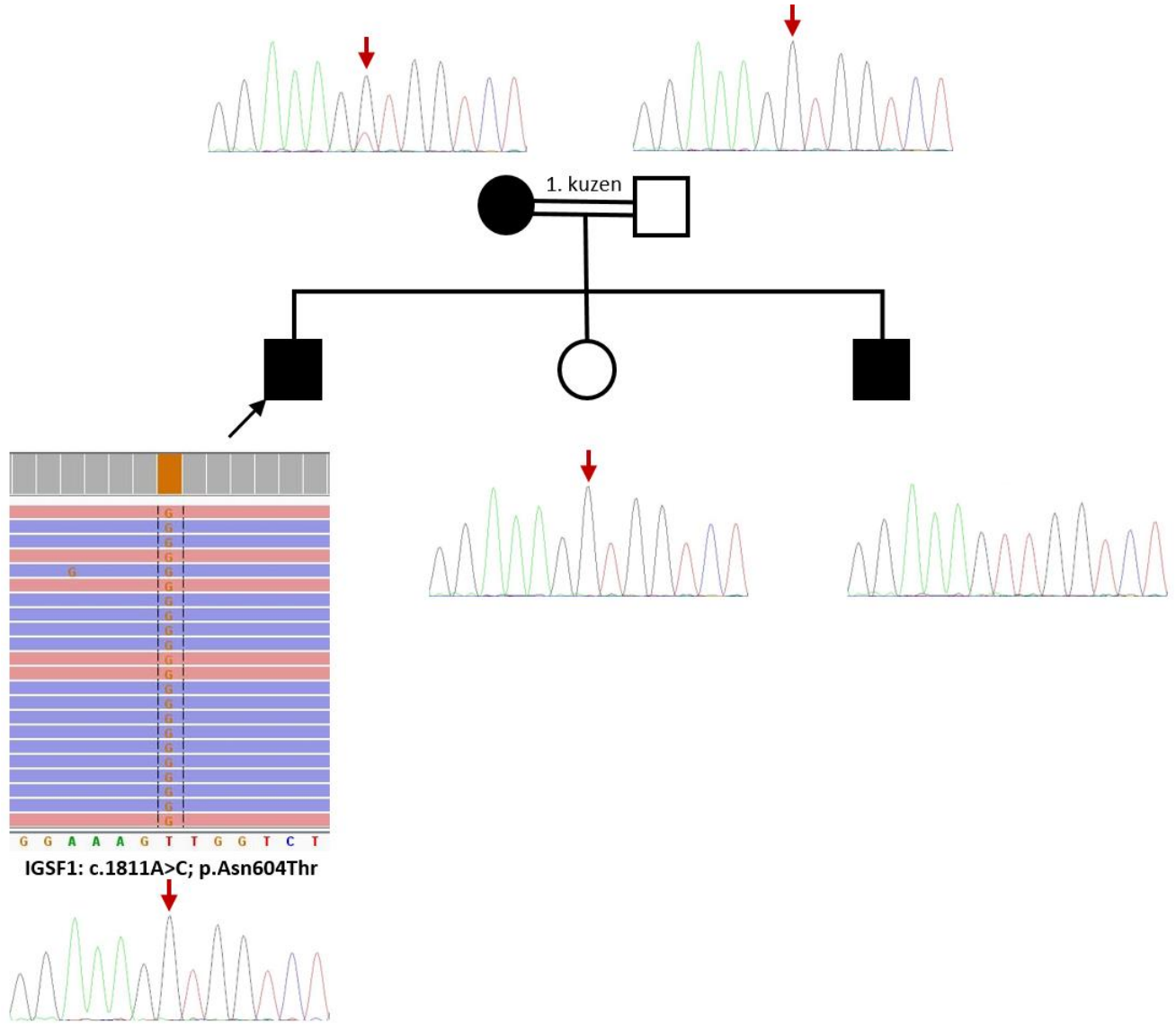
**Tablo 4-5. Olguların laboratuvar ve görüntüleme bulguları.**

| Olgular | Test yılı | kronolojik yaş/kemik yaşı | sT4 (pmol/L) | TSH (mIU/L) | PRL (ng/mL) | Kortizol (µg/dL) | IGF-1 (ng/ml)/SDS* | IGFBP-3 (ng/ml)/SDS* | LH (IU/mL) | FSH (mIU/mL) | T (ng/mL) | E2 (pg/mL) | BH uyarı testleri |                        |                      | Görüntüleme sonuçları |
|---------|-----------|---------------------------|--------------|-------------|-------------|------------------|--------------------|----------------------|------------|--------------|-----------|------------|-------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
|         |           |                           |              |             |             |                  |                    |                      |            |              |           |            | Test yaşı         | Klonidin zirve (ng/mL) | L-DOPA zirve (ng/mL) | Kraniyal-hipofiz MRG  |
| 13      | 2017      | 15,86/11                  | 16,05        | 3,02        | 20,05       | 20,3             | 447/0,82           | 3,93/-4,42           | 2,97       | 3,77         | 1,02      |            | 15,86             | 6,19                   | 6,23                 |                       |
| 20      | 2010      | 10,99/7,8-8,8             | 16,9         | 1,83        |             |                  | 67,5/-1,68         | 2,53/-3,77           | 0,1        | 0,7          |           | 5          | 10,99             | 8,7                    | 1,9                  | Normal                |
|         | 2016      | 17,6/                     | 15,25        | 2,04        | 19,4        | 20,8             | 629/4,53           | 6,81/-3,99           |            |              |           |            |                   |                        |                      |                       |
| 23      | 2017      | 13,25/                    | 14,9         | 0,705       |             |                  | 289/-0,55          | 4,98/-3,37           | 1,3        | 2,68         |           | 20,19      |                   |                        |                      |                       |
| 31      | 2013      | 11,78/10                  | 14,67        | 5,82        | 14,9        | 21,9             | 471/2,04           | 5,41/-3,49           |            |              |           |            | 11,78             | 12,1                   | 5,64                 |                       |
|         | 2017      | 15,29/                    | 13,86        | 4,05        |             |                  |                    |                      |            |              |           |            |                   |                        |                      |                       |
| 39      | 2016      | 8,55/6,8                  | 18,74        | 2,81        |             |                  | 87,5/-1,22         | 3,07/-2,74           | 0,447      | 0,682        |           |            | 9,17              | 7,88                   | 8,63                 | Normal                |
|         | 2017      | 9,17/                     |              |             | 22,85       | 8,57             |                    |                      |            |              |           |            |                   |                        |                      |                       |

\* Güven ve ark. [71]

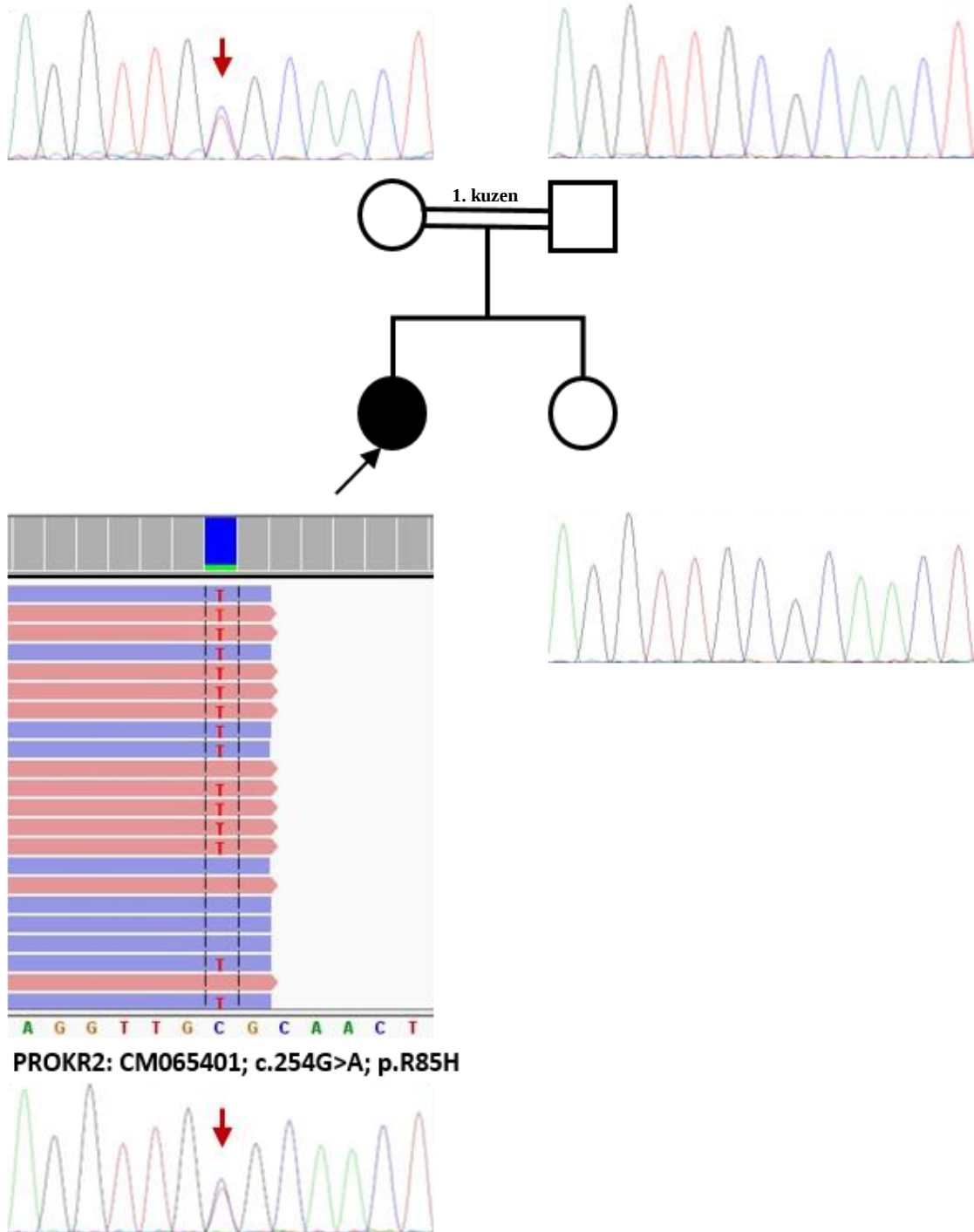
**Tablo 4-6. Moleküler analiz uygulanan hastaların başvuru ve son değerlendirme sırasındaki bulguları.**

|                             | <b>Ortalama <math>\pm</math> SD / n (%)</b> | <b>Median (Alt-Üst Sınır)</b> |
|-----------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>BAŞVURU SIRASINDA</b>    |                                             |                               |
| <b><u>Klinik</u></b>        |                                             |                               |
| Yaş (yıl)                   | 9,5 $\pm$ 3,0 / 41 (%100)                   | 10,5 (2,2 - 16,6)             |
| Cinsiyet Kız / Erkek        | 36/5                                        |                               |
| Doğum ağırlığı SDS          | -0,4 $\pm$ 0,9 / 39 (%95,1)                 | -0,4 (-2,3 - 3)               |
| Doğum boyu SDS              | -0,1 $\pm$ 0,8 / 30 (%73,2)                 | -0,2 (-1,9 - 2,8)             |
| Akraba evliliği             | %41                                         |                               |
| Anne boyu (cm)              | 156,0 $\pm$ 5,2 / 41 (%100)                 | 156,0 (142 - 166)             |
| Anne boyu SDS               | -1,1 $\pm$ 0,8 / 41 (%100)                  | -1,1 (-3,2 - 0,4)             |
| Baba boyu (cm)              | 168,7 $\pm$ 5,7 / 41 (%100)                 | 168 (147 - 182)               |
| Baba boyu SDS               | -1,1 $\pm$ 0,8 / 41 (%100)                  | -1,2 (-4,1 - 0,8)             |
| Hedef boy (cm)              | 157,4 $\pm$ 4,8 / 41 (%100)                 | 158,9 (138 - 168,3)           |
| Hedef boy SDS               | -1,1 $\pm$ 0,7 / 41 (%100)                  | -1,1 (-3,9 - 0,4)             |
| Ağırlık SDS                 | -2,1 $\pm$ 0,6 / 41 (%100)                  | -2,1 (-3,7 - -0,7)            |
| Boy SDS                     | -2,8 $\pm$ 0,4 / 41 (%100)                  | -2,8 (-4,2 - -1,6)            |
| VKİ SDS                     | -0,6 $\pm$ 0,7 / 41 (%100)                  | -0,7(-3,1 - 1,3)              |
| Oturma yüksekliği/boy oranı | 0,54 $\pm$ 0,01 / 33 (%80,5)                | 0,54 (0,51 - 0,59)            |
| Baş çevresi SDS             | -1,4 $\pm$ 0,7 / 31 (%75,6)                 | -1,2 (-3,4 - 0,4)             |
| <b><u>Laboratuvar</u></b>   |                                             |                               |
| Kemik yaşı (yıl)            | 8,1 $\pm$ 2,9 / 20 (%48,8)                  | 8,6 (1,5 - 17)                |
| IGF-1 SDS                   | -0,3 $\pm$ 1,3 / 33 (%80,5)                 | -0,6 (-3,2 - 3,9)             |
| IGFBP-3 SDS                 | -3,1 $\pm$ 0,8 / 29 (%70,7)                 | -3,4 (-4,4 - 1,8)             |
| <b>SON DEĞERLENDİRME</b>    |                                             |                               |
| Yaş (yıl)                   | 12,3 $\pm$ 3,3 / 37 (%90,2)                 | 13,2 (4,5 - 19,7)             |
| Ağırlık SDS                 | -1,9 $\pm$ 0,8 / 37 (%90,2)                 | -1,8 (-4,4 - 0,2)             |
| Boy SDS                     | -2,5 $\pm$ 0,5 / 37 (%90,2)                 | -2,4 (-4,2 - -1,5)            |
| VKİ SDS                     | -0,5 $\pm$ 0,8 / 37 (%90,2)                 | -0,6 (-3,5 - 1,7)             |
| Oturma yüksekliği/boy oranı | 0,53 $\pm$ 0,01 / 31 (%75,6)                | 0,53 (0,51 - 0,56)            |
| Baş çevresi SDS             | -1,7 $\pm$ 1 / 20 (%48,8)                   | -1,5 (-4,4 - 0,2)             |
| Kemik yaşı (yıl)            | 11,6 $\pm$ 4 / 8 (%19,5)                    | 11,5 (3,5 - 17,5)             |

**Olgu 13**

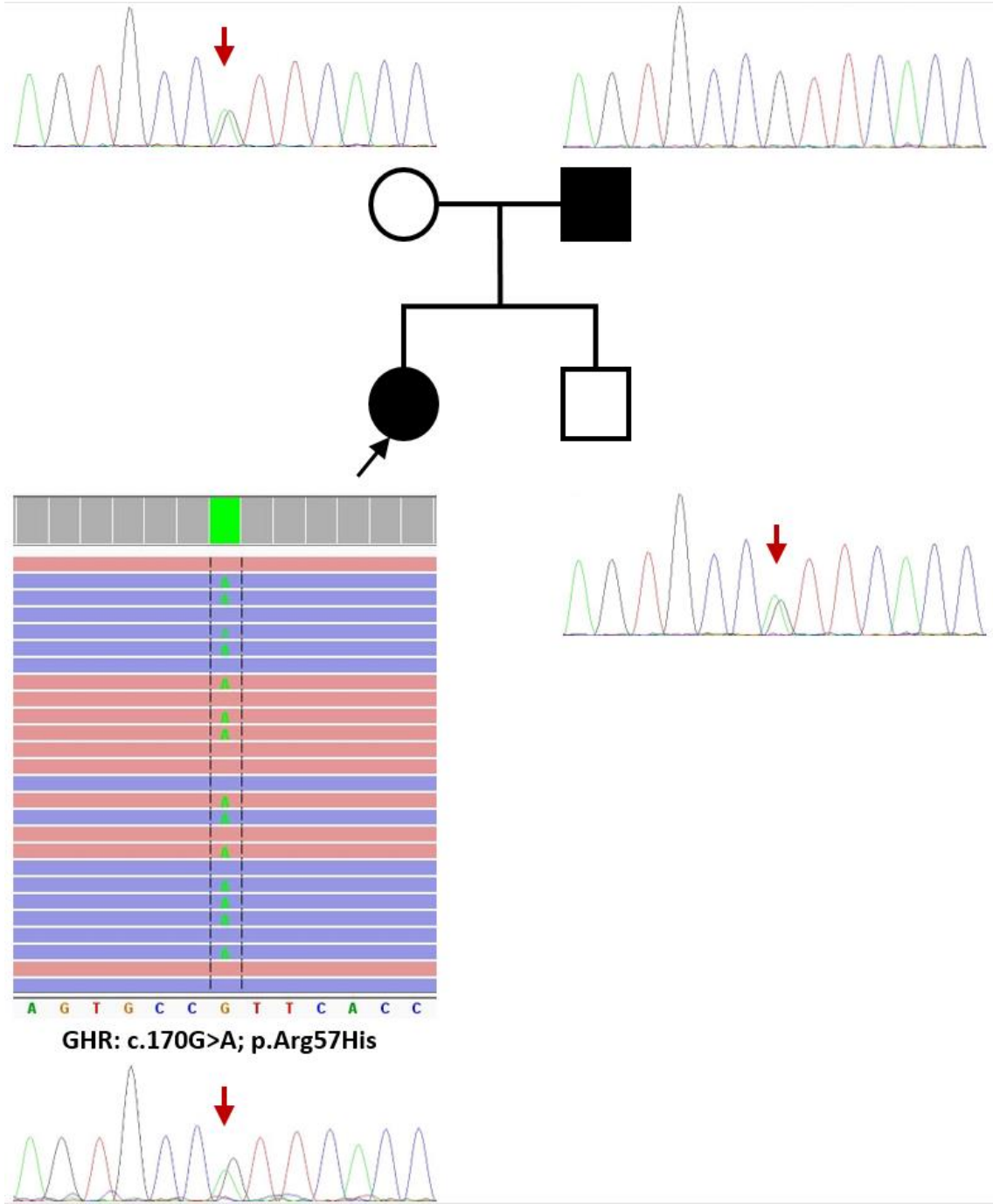
**Olgu 13'e** ait aile ağacı, saptanan değişimin (NM\_001170961.1:c.1811A>C; NP\_001164432.1:p.Asn604Thr) IGV, Sanger konfirmasyonu ve aile segregasyonu görüntüsü.

### Olgu 20



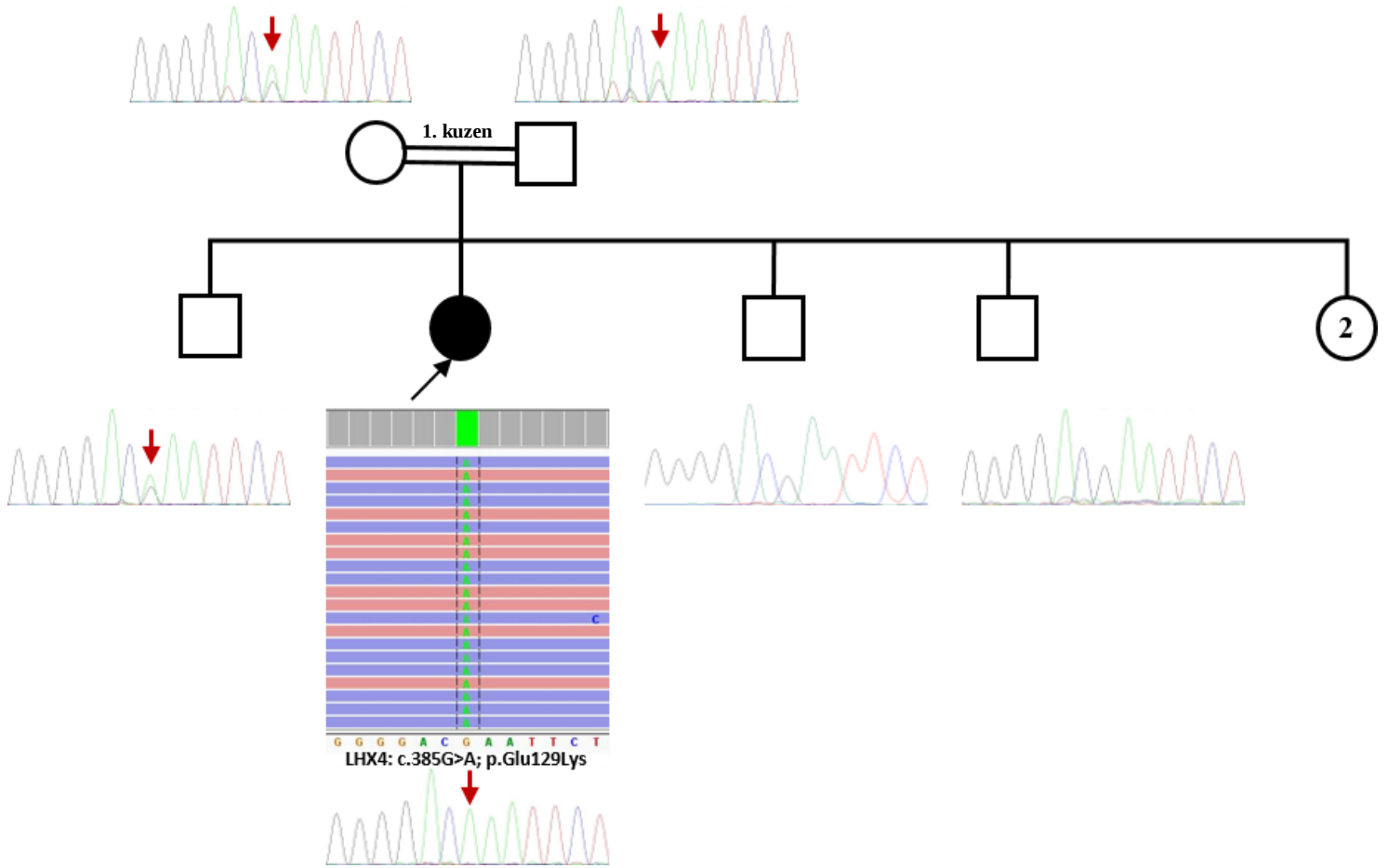
**Olgu 20**'ye ait aile ağacı, saptanan değişimin (NM\_144773.2:c.254G>A; NP\_658986.1:p.Arg85His) IGV, Sanger konfirmasyonu ve aile segregasyonu görüntüsü.

### Olgu 23

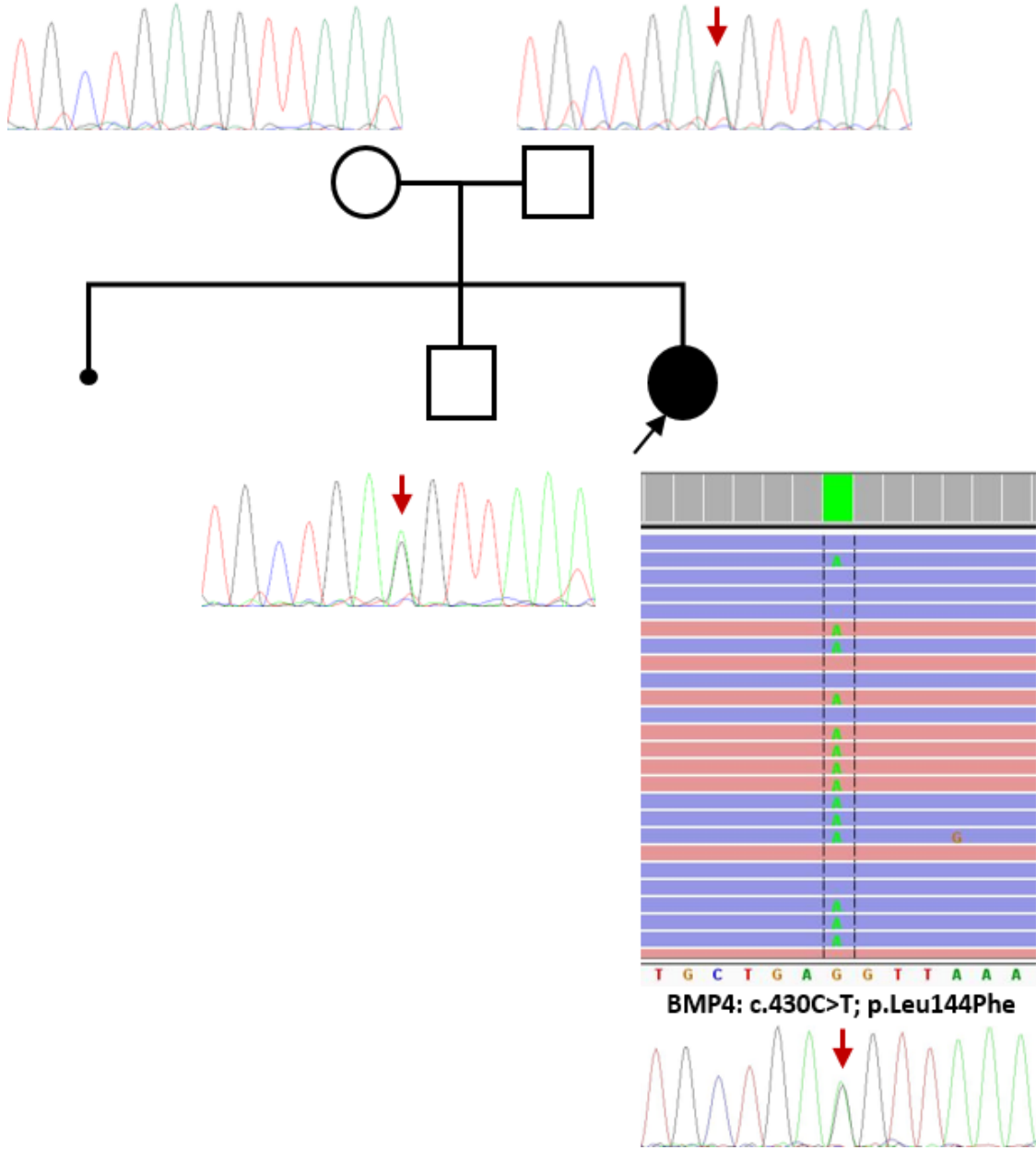


**Olgu 23'e** ait aile ağacı, saptanan değişimin (NM\_000163.4:c.170G>A; NP\_000154.1:p.Arg57His) IGV, Sanger konfirmasyonu ve aile segregasyonu görüntüsü.

### Olgu 31



**Olgu 31'e** ait aile ağacı, saptanan değişimin (NM\_033343.3:c.385G>A; NP\_203129.1:p.Glu129Lys) IGV, Sanger konfirmasyonu ve aile segregasyonu görüntüsü.

**Olgu 39**

**Olgu 39**'a ait aile ağacı, saptanan değişimin (NM\_001202.5:c.430C>T; NP\_001193.2:p.Leu144Phe) IGV, Sanger konfirmasyonu ve aile segregasyonu görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA

Boy uzaması ile ilişkili kromozomal, tek gen ve multifaktöriyel birçok genetik faktör bulunduğundan etiyopatogenezin aydınlatılmasında bu faktörlerin tek tek araştırılması zorluk yaratmaktadır. Boy uzamasında çevresel etkenlerin etkisinin nispeten sınırlı kalmasına karşın büyümenin yüksek kalıtsallık göstermesi genetik çalışmalar için oldukça uygun bir alan yaratmaktadır [72]. Boy kısalığı, popülasyonun en kısa bireylerinden olan ve tanımlanabilir bir bozukluğu bulunmayan bireyler baz alınarak boyun yaş ve cinsiyete göre toplumda -2 SDS'nin veya 3. persantilin, boy uzama hızının -0,8 SDS veya 25. persantilin altında olması, öngörülen boyun hedef boydan 8.5 cm'den daha kısa olması olarak tanımlanmaktadır ve toplumdaki sıklığı 3/100'tür.

Boy kısalıkları ailevi boy kısalığı, konstitüsyonel büyüme gecikmesi, genetik bozukluklar, endokrinopatiler ve gizli pulmoner böbrek veya gastrointestinal hastalıklar gibi nedenlere bağlı olarak gelişebilmektedir. Pediatri kliniğine başvuran kısa boylu çocukların yaklaşık %80'inin düşük doğum ağırlığı ve/veya kısa boy öyküsünün ve tanımlanabilir tıbbi bir hastalığının olmadığı bildirilmekte ve bu nedenle bu çocuklar İdiyopatik boy kısalığı (İBK) olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle yetişkin boyunun ve büyümenin temposunun büyük ölçüde genetik olarak programlandığı varsayılmakta ve çocukluktaki boy kısalığının boy genleri ve tempo genleri nin kombine etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [73].

Boy kısalığı çocuk endokrinologlarının ve ailelerin önemli problemlerinden biri olmakla birlikte bu güne kadar yapılan çalışmalarda patolojik olduğu düşünülen boy kısalıklarının %50-90'ında tanıya ulaşılamamaktadır.

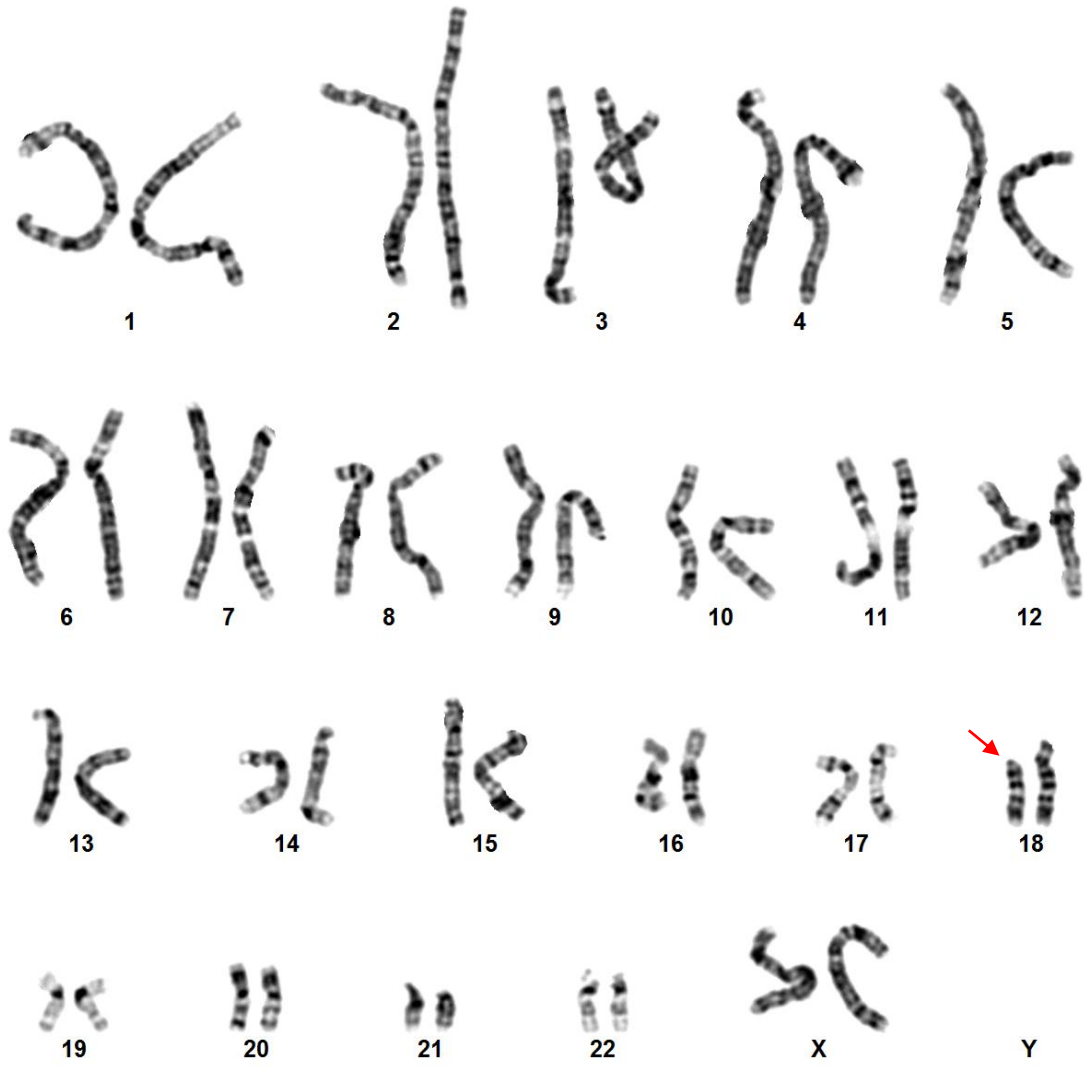
Boy kısalıklarında genetik değerlendirmenin amacı, etiyolojik etkeni belirleyerek prognoz tekrarlama riskleri hakkında aileyi bilgilendirmek ve olası tedavi yaklaşımını belirlemektir.

Boy kısalığı ile ilişkili kromozom anomalileri, kopya sayısı değişimleri (mikrodelesyonlar, duplikasyonlar) ve tek gen mutasyonları ve tek nükleotit değişimleri (SNP) tanımlanmıştır. Kromozom anomalileri içinde en bilineni Turner sendromu, mikrodelesyonlara örnek olarak *SHOX* geni ve PWS ilişkili 15q11.3 delesyonları

verilebilir. İskelet displazileri, Russel-Silver sendromu, Noonan sendromu gibi hastalıklar tek gen ilişkili sendromik boy kısalığına örnek oluşturur.

Kromozom anomalileri, mikrolelesyonlar ve mozaizizmler ancak bu anomalileri tanımaya imkan veren sitogenetik ve moleküler sitogenetik (kromozomal mikroarray dahil) tekniklerin kullanımı ile mümkündür

Bir çalışmada boyları 3. persantilin altında olup genetik polikliniğine başvuran 353 hasta değerlendirilmiş, olguların %50'sinde ailevi veya konstitusyonel boy kısalığının olduğu saptanmış. Bu çalışmada olguların %2'sinde çoklu malformasyonlar, %2'sinde daha önce tanımlanmamış endokrin hastalıklar saptanırken, en sık rastlanan patoloji Turner sendromuna yol açan kromozom anomalilerinin olduğu dikkat çekmektedir (%19) [74]. Bizim serimizde, toplam 189 olguya boy kısalığı nedeni ile karyotip analizi yapılmış ve bunların 16'sında (%8.4) sayısal ya da yapısal bir kromozom anomalisi saptanmıştır. Bu olgulardan 13'ünde X ve Y kromozomlarını ilgilendiren ve boy kısalığına neden olabilecek kromozom anomalileri saptanırken, 3 olguda başka kromozomlarla ilişkili anomaliler görülmüştür. (Tablo 4-4). Bu anomalilerden Şekil 5-1'de gösterilen 18. kromozomun p kolunda görülen delesyon HPE genlerinden *TGIF1* geninin de yer aldığı bir bölge olup, holoprosensefali mikroform fenotipine neden olmaktadır [75]. Ancak, bu bölge delesyonu olan vakalarda boy kısalığının da gözlemlendiği bilinmektedir, son zamanlarda yapılan bir çalışmada bu ilişki gösterilmiştir [76]. Bir olguda saptanan marker kromozomun sentromerik kökeni yapılan FISH incelemelerinde gösterilememiştir. A-CGH incelemesinde ökromatin varlığına rastlanmamış, marker kromozom neosentromer olarak rapor edilmiştir. Neosentromerler, nonalfoid Sentromer dizisi içeren, genellikle kromozomların distal uçlarından yeniden forme olan ekstra marker kromozomlardır. Sentromerleri alfoid dizi içermediğinden klasik FISH incelemeleri ile sentromerik kökenlerinin belirlenmesi mümkün değildir [77]. Sadece sentromer içeren marker kromozomlarda array teknikleri ile de tanı olasılığı yoktur. A-CGH incelemesinde ayrıca herhangi bir klinik uyumlu değişim saptanmamış, bu olgu da boy kısalığının tesadüfi olduğu düşünülmüştür. Bir olguda ise non-mozaik ring 11 ve mozaik trizomi 8 karyotipi saptanmıştır. Literatür taramasında ring 11 saptanan olguların değerlendirmesinde [78] ve bir trizomi 8 olgusunda da boy kısalığı olduğu rapor edilmiştir [79].



**Şekil 5-1. Kromozom analizinde saptanan *de novo* 18p delesyonu.**

En sık görülen X kromozom anomalisi ise monozomi X ve mozaikleri idi. X kromozomunun monozomisi, insanda en sık görülen kromozom anomalilerinden birisidir, tüm konsepsiyonların %2'sinde olduğu, ancak embriyoların % 99'unun spontan abortla sonlandığı bilinmektedir. Turner sendromu olarak tanımlanan bu kromozom anomalisinde X kromozomunun total kaybı ya da P kolunun parsiyel kaybı klinik bulguların görülmesine neden olmaktadır. Yaşayabilenlerde boy kısalığı başta olmak üzere; tipik dismorfik stigmatalar, cinsel infantilizm, böbrek, kardiyak, iskelet, endokrin ve metabolik bozukluklar gibi kardinal bulgular gözlenmektedir. Bir olguda saptanan idic(Y) kromozom yapısı nedeniyle *SHOX* geninin haploetersizliğine bağlı boy kısalığı olduğu görülmektedir.

Boy kısalığının etiyolojisini araştırmak amacı ile yapılan çalışmalarda boy kısalığına neden olduğu kesinleşen ya da aday olabilecek birçok gen tanımlanmıştır. Bu genlerden en önemlisi boy kısalığı ile ilişkisi kanıtlanmış olan *SHOX* (Short Stature Homeobox) genidir. *SHOX* geni delesyonlarının idiyopatik boy kısalığı (İBK) ile olan ilişkisi bilinmektedir. Gendeki heterozigot delesyonların Leri-Weill diskondrosteozu (LWD), homozigot delesyonları ise Langer mezomelik displazisi (LMD) ile ilişkisi kesinleştirilmiştir [80]. Turner sendromundaki boy kısalığının da gerek Monozomi X gerekse X kromozomunun P kolu delesyonları nedeniyle bu gen bölgesinin tek doza inmesi ile ilişkili olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca, *SHOX* genindeki nokta mutasyonlarının da zigozitesine bağlı olarak LWD ve LMD'ye neden olmaktadır. İnsan Genomu Mutasyon Veri Tabanı (HGMD Professional, 2017.2) verilerine göre bugüne kadar *SHOX* geni ile 328 mutasyon olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca, *SHOX* veritabanı [www.shox.uni-hd.de](http://www.shox.uni-hd.de) (SHOX:171128) adresinde ek olarak 1492 varyant olduğu bildirilmektedir.

Sitogenetik ve moleküler genetik tekniği hasta seçim kriterleri ve kullanılan tanı yöntemi farklılığına bağlı olarak idiyopatik boy kısalıklarında *SHOX* geni mutasyonlarının %2-15 oranında olduğu gösterilmiştir. 1608 olguluk bir seri çalışmasında *SHOX* geni mutasyon oranı % 4.2 olarak bulunmuştur [81]. 40 olguluk başka bir seri çalışmasında da gerek FISH gerekse moleküler çalışmalarda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Araştırmacılar *SHOX* gen delesyon ve mutasyonlarının İBK etiyolojisinde önemli bir rolünün olmadığını savunmuşlardır. Bizim serimizde de kromozom anomalisi saptanmayan her olguda öncelikle yapılan FISH incelemesinde sadece 1 olguda *SHOX* geninde heterozigot bir delesyon saptanmıştır (%0.65). Bizim serimizde de sadece bir olguda delesyon saptanması, panelde herhangi bir mutasyona rastlanmaması literatürü doğrulamaktadır.

Bu güne kadar boy kısalığı ile ilişkili birçok gen tanımlanmıştır. *SHOX*, *IGF1* ve *IGF1R*, *IGFALS* ve *NPR2* genlerindeki mutasyonlar örnek olarak verilebilir. Bu genlerdeki olası mutasyonlar moleküler tekniklerin tek tek kullanılması ile araştırılabilir. Ancak, tek ya da birkaç gendeki mutasyonun boy üzerindeki etkisinin daha fazla olması beklenirken rölatif olarak daha nadir olduklarından her birinin tek tek çalışılması zaman ve materyal kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle, tüm bilinen genlerin bu genlerin dahil

edildiği panel çalışmaları ile veya bilinmeyenlerin de araştırılması amacıyla WES analizleri ile tek bir çalışmada ilişkili genler araştırılabilir [82, 83].

Son zamanlarda yapılan GWAS çalışmalarında insan büyümesinde rol oynayan yeni biyolojik yollar ve boy ile ilişkili yüzlerce lokus bulunmuştur [84]. Ancak bugüne kadar tanımlanan değişimler boy kısalığının sadece % 10'unu açıklamaktadır [85].

Genom boyu yapılan çalışmaların kombine edildiği sonuçlar değerlendirildiğinde boy üzerine daha az etkili ama daha sık görülen erişkin boyu üzerine etkili olduğu görülen 40'tan fazla polimorfizmin tanımlandığı görülmektedir [83, 86, 87]. Bu grupta yer alan her bir genin boy üzerine olan etkisi az olmakla birlikte gen ve yolağın kümülatif etkisinin önemli rol oynayabileceği düşünülebilir [7].

Literatürdeki boy kısalığı ilişkili birçok çalışma çocuklardan daha çok erişkin bireylerde yapılmıştır. Ancak, çocukluk çağındaki boy SDS'leri erişkin boy SDS'leri ile uygunluk gösterdiğinden sonuçların çocuklar için de yorumlanabileceği bildirilmiştir [7].

A. Hattori ve ark.'ın 2017 yılında boyları -2.0 SD'nin altında olan 86 olgulu geniş bir açıklanamayan boy kısalığı kohortunu hedeflenmiş panel-gen testi ile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 19 olguda panelde bulunan boy kısalığı ile ilişkili 10 genin 7'sinde (*ACAN*, *FGFR3*, *GHRHR*, *GHR*, *STAT5B*, *IGFALS*, *IGF1R*) daha önce tanımlanmamış 18 değişim saptanmıştır. *in silico* tahmin programları ile değerlendirme sonucunda bu değişimlerin 4'ü muhtemel zararlı, 6'sı belirsiz, 8'i ise muhtemel zararsız olarak sınıflandırılmıştır. Hiçbir olguda GH-IGF1 yolak genlerinde patojenik mutasyon saptanmamış, *GHRHR*, *GHR* ve *IGFALS* genlerinde nadir görülen zararlı varyantlar tespit edilmişse de, bu varyantlar ile hastaların fenotipi arasındaki etiyolojik ilişki belirsiz kalmıştır. Çünkü *GHRHR*'deki heterozigot mutasyonların büyümeye etkisinin olmadığı, *GHR* ve *IGFALS*'dakilerin ise hafif etkileri olduğu bilinmektedir. Çalışma sonucunda, GH-IGF1 yolağında bulunan genlerdeki bu değişimlerin nadiren de olsa idiyopatik boy kısalığı ile ilişkili olabileceği ya da diğer genetik veya çevresel faktörlerin etkilerini artırarak fenotipe katkıda bulunabileceğinin altı çizilmiştir [88].

Bu çalışmada, kromozom analizleri ve *SHOX* genine özgün prob kullanılarak yapılan FISH çalışmalarında normal sonuçlanan 41 olguda, güncel literatür, OMIM ve HGMD profesyonel veri tabanları kullanılarak, boy kısalığı ile ilişkili 10 gen (*GH1*, *GHR*, *GHRH*, *GHSR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFALS*, *IGFBP3*, *SHOX* ve *STAT5B*) ve ÇHHE ile ilişkisi olduğu kanıtlanmış 15 genin dahil edildiği 25 genlik bir panel hazırlandı (Tablo 3-2). Bu

çalışma kapsamında, öncelikle panelde yer alan idiopatik boy kısalığı ile ilişkili genlerin kodlayan bölgelerini ve ekzon-intron sınırlarını kapsayan YND tabanlı panel-gen testinden elde edilen veriler değerlendirildi. Klinik önemi olduğu düşünülen değişimler için özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile doğrulanması yapıldı. Aile çalışmaları ile segregasyon analizi yapılarak değişimin ailevi olup olmadığı araştırıldı. Herhangi bir mutasyon/varyant ilişkisi saptanmayanlarda panelin tasarım gereği kapsam dışı bıraktığı bölgelerin özgün tasarlanan primerler kullanılarak Sanger dizileme ile incelenmesi gerçekleştirildi. İkinci olarak panelde yer alan ÇHHE genleri de analiz edildi.

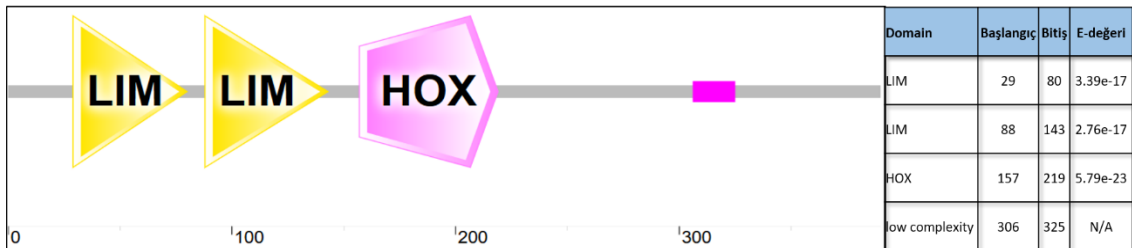
Bu çalışma sonucunda 5 olguda *GHR*, *BMP4*, *LHX4*, *IGSF1* ve *PROKR2* genlerinde birer varyant saptandı (%12.2).

Başvuru nedeni ağır boy kısalığı olan bir olguda (-2.9 SDS), *GHR* geninin 4. eksonunda missens heterozigot bir mutasyon saptandı (NM\_000163.4:c.170G>A). *GHR* geni, büyüme hormonu reseptörünü kodlar ve postnatal büyümenin kontrolünden sorumludur (UniProt ID: P10912). Büyüme hormonu reseptörü, büyüme hormonunun bağlanmasıyla dimerize olur ve hücre içi sinyal yolağını aktive ederek IGF-1 sentezini uyarır (OMIM #600946). *GHR* geni, toplam 4560 bp uzunluğunda olan 10 ekzondan oluşmakta ve 638 a.a. uzunluğunda protein üretmektedir. Bu gen 5p13.1-p12 bölgesinde yer almaktadır. HGMD Pro veritabanında bu genle ilişkili toplam 113 mutasyon bildirilmektedir (15.7.2018). Bu bildiriler arasında 63 missens/nonsens, 8 küçük delesyon, 6 küçük insersiyon/duplikasyon, 9 büyük delesyon, 1 kompleks yeniden düzenlenme mutasyonları yer almaktadır. Bu gendeki mutasyonlar ile Laron tipi cücelik ilişkisini tanımlayan ilk bildiriler arasında Godowski PJ ve ark. [89] ve Amselem S ve ark. 'nın [90] yaptığı çalışmalar yer almaktadır. Bu gendeki mutasyonlar, parsiyel büyüme hormonu duyarsızlığı (OMIM #604271), büyüme hormonuna aşırı cevap (OMIM #604271), Laron tipi cücelik (OR, OMIM #262500) ve ailevi hiperkolesterolemi (OD, OMIM #143890) ile ilişkilendirilmiştir. Olgumuzda saptanan heterozigot mutasyon çeşitli veri tabanlarında farklı yorumlanmıştır. Aile çalışmasında, aynı değişim anne ve normal kardeşte de saptandığından ve MAF değerinin düşük olması nedeniyle değişim nadir polimorfizm olarak değerlendirildi.

Bir olguda *BMP4* geninin 4. eksonunda heterozigot missens bir değişim saptandı (NM\_001202.5:c.430C>T). Bu gen ÇHHE ile ilişkili bir gen olmasına rağmen bizim sınırda boy kısalığı nedeniyle başvuran olgumuzda saptandı. *BMP4* kırkırdak ve kemik oluşumunu indükler. Ayrıca mezoderm indüksiyonu, diş gelişimi, ekstremiteler oluşumu ve

kırık onarımında etkilidir. Embriyonik meme gelişimi sırasında duktal büyümeyi uyarmak ve kıl folikül indüksiyonunu inhibe etmek için PTHLH / PTHrP (parathyroid hormone like hormone / parathyroid hormone-related protein) ile uyumlu davranır (bu proteinlerle benzer yapıya sahiptir). Bu gendeki mutasyonların dominant kalıtıldığı (sendromik mikroftalmi 6, OMIM #607932) bilindiği halde [91] olgumuzun sağlıklı baba ve sağlıklı kardeşinin de aynı mutasyon için heterozigot olması nedeniyle değişim polimorfizm lehine değerlendirilmiştir. Veri tabanlarında herhangi bir frekans bilgisi bulunmamakta olup bizim olgu grubumuzda %2.4 olarak belirlenmiş, ancak sayının azlığı nedeniyle anlamlı olup olmadığı değerlendirilememiştir.

Ağır boy kısalığı nedeniyle başvuran diğer bir olguda (-2.9 SDS), yine ÇHHE genlerinden *LHX4* geninin 3. ekzonunda homozigot missens bir değişim saptandı (NM\_033343.3:c.385G>A; NP\_203129.1:p.Glu129Lys). Bu proteinin solunum kontrol mekanizmalarının gelişiminde ve akciğerin normal büyüme ve olgunlaşmasında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Tercihen metillenmiş DNA'ya bağlanır (UniProt ID: Q969G2) [92]. Protein LIM ve HOX domainlerinden oluşmakta (Şekil 5-2) ve bu domainleri etkileyen çeşitli mutasyonlar hipopitüitarizm ve kombine hipofiz hormon eksikliğine neden olmaktadır [93-95]. Literatürde olgumuzda saptanan ve proteinin LIM domainini etkileyen homozigot değişime üç kodon uzaklıkta, aynı domaini etkileyen ve letal doğumsal hipopitüitarizm ile ilişkili homozigot missens bir mutasyon tanımlanmış, aile çalışmaları sonucunda bu mutasyon için ebeveynlerin heterozigot taşıyıcı oldukları gösterilmiştir [94]. Yetişkin ekzom verilerini içeren ExAc veritabanında ilgili mutasyon için homozigotluk bildirilmemiş, ancak aynı veritabanında bizim olgumuzdaki değişim için homozigot bir birey bildirilmiştir. Bu, saptadığımız değişimin ağır bir kliniğe neden olma olasılığını düşürse de, aile çalışmasında sağlıklı anne, baba ve kardeşlerin değişimi heterozigot olarak taşıdıklarının gösterilmesi, heterozigot taşıyıcı aile bireylerinin normal boyda olmaları, olgumuzdaki homozigot değişimin boy kısalığına neden olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 5-2. *LHX4* proteini [96].

En ağır bulgu ile başvuran 4. olguda (-3.54 SDS) X'e bağılı kalıtılan ve ÇHHE ile ilişkili *IGSF1* geninin 12. ekzonunda hemizigot missens bir değişim saptandı. *IGSF1*, inhibin sinyalizasyonunda bir koreseptör olarak rol almaktadır, ancak yüksek afiniteye sahip olmadığı düşünülmektedir. *IGSF1*, inhibin B'nin varlığında veya yokluğunda aktivin A'yı antagonize eder. Aktivin uyarımlı transkripsiyonda inhibin B'nin spesifik bir antagonistik etkisine aracılık etmek için gereklidir [97]. Aile çalışmasında, normal boydaki anne, baba ve kardeşte değişim saptanırken, kısa boylu olan kardeşte değişim saptanmadı. Aile çalışması ve MAF değerinin düşük olması nedeniyle bu değişim de nadir polimorfizm olarak değerlendirildi. Bu sonuçlarla bu gendeki değişimin boy kısalığı ile ilişkisi kanıtlanamamıştır.

Son olguda *PROKR2* geninin 1. ekzonunda heterozigot missens bir değişim saptandı. Bu gen, otozomal dominant Kallmann sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Nitekim olgumuzda saptanan mutasyonun da Kallmann sendromu ile ilişkili olduğu literatürde tanımlanmıştır [98]. Yakın zamanda yapılan fonksiyon çalışmaları ile de mutasyonun fonksiyon kaybına neden olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir [99]. Ancak olgunun klinik muayenesinde Kallmann sendromu bulgularına (hipogonadotropik hipogonadizm) rastlanmamıştır. Aile çalışmaları sonucunda aynı mutasyon için sağlıklı annenin taşıyıcı olduğu gösterilmiştir. BHE nedeniyle başvuran başka bir olguda ÇHHE panel çalışmasında da aynı değişim saptanmıştı. Bu olgu da Kallmann sendromu stigmaları bulunmamakta ancak boy kısalığı tariflenmekteydi. Bağımsız iki olguda aynı mutasyonun bulunması ve aile çalışması bu gendeki değişimlerin geniş bir etki spektrumuna sahip olup boy kısalığı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Wang ve arkadaşları İBK, BHE ve gelişme geriliği olan 192 olguluk bir seride 366'sı bilinen boy kısalıkları ile ilişkili toplam 1077 aday gen taradılar. Ancak, klinikle ilişkili herhangi bir mutasyon saptamadılar. Bizim 41 olguluk serimizde de klinikle uyumlu herhangi bir değişim saptanmaması literatürle uyumludur [100].

Yeni nesil teknolojilerin kullanımı ile ortaya çıkabilecek çok sayıda varyantın hastalık ilişkisini ortaya koymak ayrı bir değerlendirme gerektirmektedir. Bu nedenle, geniş genetik etkilere sahip nadir varyantlar da dahil olmak üzere yeni bulunacak varyantların ek çalışmalarla doğrulanarak araştırılan hastalıkla ilişkisinin belirlenmesi gerekmektedir [101]. Son yıllarda birçok grup tüm ekzom dizileme teknolojisini

kullanarak Mendelian hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan etkin genleri başarıyla tanımlamıştır [102].

Bu tür çalışmalarda bilinen genlerde saptanan yeni değişimlerin aile çalışmaları ile doğrulanması da gerekmektedir. Bu doğrulama yapılırken kalıtım modeli ve değişimin ne olduğu doğrulama yönteminin seçimi açısından önemlidir. YND ile hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülen varyantların saptanması durumunda veritabanları ve güncel literatürden yararlanılarak değerlendirilir. Ancak, tüm bu yöntemler bulunan varyantın gerçekten hastalık ilişkisinin olup olmadığını anlamakta yetersiz kalabilir. Çünkü bulunan varyantların birçoğunun henüz patojenitesi hakkında veri tabanlarında yeterli bilgi olmayabilir ya daha önce rapor edilmemiş, önemi bilinmeyen varyantlar (VUS, variant of unknown significance) olabilir. Bu nedenle saptanan varyantların yapılacak aile içi segregasyon çalışmaları ile yorumlanması mümkün olabilir.

Sonuç olarak, boy kısalığının geniş bir genetik spektruma sahip olması nedeniyle hedefli panellerin araştırmada yeterli olmadığına, bu tür araştırmaların indeks olgu ve ebeveynleri içeren, sağlıklı kontrol grubuyla paralel olarak tüm ekzom veya tüm genom dizileme çalışmaları ile yapılmasının daha doğru bir yaklaşım olacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Neyzi, O., et al., *Büyüme-Gelişme ve Bozuklukları*, in *Pediyatri*, O. Neyzi and T. Ertuğrul, Editors. 2009, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 89-149.
2. Schneider, K.U., et al., *Identification of a major recombination hotspot in patients with short stature and SHOX deficiency*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(1): p. 89-96.
3. Seaver, L.H., et al., *ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature*. Genet Med, 2009. **11**(6): p. 465-70.
4. Bundak, R., *Boy Kısaliğı*. Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi, 2008. **2**(2).
5. DüNDAR, Y., O. Evliyaoğlu, and Ş. Hatun, *Okul çocuklarında boy kısaliğı ve obezite: ihmal edilen bir sorun*. Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics, 2000. **9**(1): p. 19-22.
6. Baron, J., et al., *Short and tall stature: a new paradigm emerges*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(12): p. 735-46.
7. Wit, J.M., W. Kiess, and P. Mullis, *Genetic evaluation of short stature*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(1): p. 1-17.
8. de Castella, T., *Bantams: The army units for those under 5ft 3in*, in *BBC News Magazine*. 2015.
9. Jubb, A.A., *A Case of Dwarfism*. Br Med J, 1910. **2**(2609): p. 2026.
10. Bronstein, I.P. and E. Loeffler, *Ovarian agenesis with dwarfism*. Am J Dis Child, 1947. **73**(1): p. 122.
11. Group, W.H.O.M.G.R.S., *WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age*. Acta Paediatr Suppl, 2006. **450**: p. 76-85.
12. Gokcay, G., A. Furman, and O. Neyzi, *Updated growth curves for Turkish children aged 15 days to 60 months*. Child Care Health Dev, 2008. **34**(4): p. 454-63.
13. Tate, A.R., et al., *Is infant growth changing?* Int J Obes (Lond), 2006. **30**(7): p. 1094-6.
14. Neyzi, O., et al., *Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri*. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 2008. **51**(1): p. 1-14.
15. Greulich, W.W. and S.I. Pyle, *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. 1959: Stanford University Press.
16. Bergad, P.L., et al., *Inhibition of growth hormone action in models of inflammation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(6): p. C1906-17.
17. Clemmons, D.R., *Clinical utility of measurements of insulin-like growth factor 1*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. **2**(8): p. 436-46.
18. Rosenfield, R.L., *Essentials of growth diagnosis*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1996. **25**(3): p. 743-58.
19. Schaff-Blass, E., S. Burstein, and R.L. Rosenfield, *Advances in diagnosis and treatment of short stature, with special reference to the role of growth hormone*. J Pediatr, 1984. **104**(6): p. 801-13.
20. Enstitüsü, H.Ü.N.E., *2013 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması*. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü, TC Kalkınma Bakanlığı ve TÜBİTAK, Ankara, Türkiye, 2014. **1**.
21. Yüksel Apak, M., *Tıbbi Genetik ve Genetik Hastalıklar*, in *Pediyatri*, O. Neyzi and T. Ertuğrul, Editors. 2009, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 151-189.
22. Saal, H.M., *Russell-Silver Syndrome*. 2011.

23. Allanson, J.E. and A.E. Roberts, *Noonan Syndrome*, in *GeneReviews*((R)), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle  
University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
24. Kliegman, R.M., et al., *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis E-Book*. 2017: Elsevier Health Sciences.
25. Pauli, R.M., *Achondroplasia*. 2012.
26. Nilsson, O., et al., *Endocrine regulation of the growth plate*. *Horm Res*, 2005. **64**(4): p. 157-65.
27. Jee, Y.H., et al., *Genetics of Short Stature*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017. **46**(2): p. 259-281.
28. Gardner, R.J.M.K. and D.J. Amor, *Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 2018: Oxford University Press.
29. Jacobsen, A., et al., *Comparison of comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization in ovarian carcinomas: possibilities and limitations of both techniques*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000. **122**(1): p. 7-12.
30. Nacheva, E.P., et al., *Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998. **100**(2): p. 93-105.
31. *Comparative Genomic Hybridization in the Study of Human Disease*, in *eLS*.
32. Klug, W. and M. Cummings, *Concepts of Genetics*, Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, 2000.
33. Consortium, E.P., *The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project*. *Science*, 2004. **306**(5696): p. 636-640.
34. Bainbridge, M.N., et al., *Whole-genome sequencing for optimized patient management*. *Science translational medicine*, 2011. **3**(87): p. 87re3-87re3.
35. Ng, S.B., et al., *Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes*. *Nature*, 2009. **461**(7261): p. 272-276.
36. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA*. *nature*, 1977. **265**(5596): p. 687-695.
37. Quail, M.A., et al., *A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers*. *BMC genomics*, 2012. **13**(1): p. 341.
38. Fan, J.-B., M.S. Chee, and K.L. Gunderson, *Highly parallel genomic assays*. *Nature Reviews Genetics*, 2006. **7**(8): p. 632-644.
39. Dressman, D., et al., *Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(15): p. 8817-8822.
40. Fedurco, M., et al., *BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies*. *Nucleic acids research*, 2006. **34**(3): p. e22-e22.
41. Shendure, J. and H. Ji, *Next-generation DNA sequencing*. *Nature biotechnology*, 2008. **26**(10): p. 1135-1145.
42. Eid, J., et al., *Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules*. *Science*, 2009. **323**(5910): p. 133-138.
43. Metzker, M.L., *Sequencing technologies—the next generation*. *Nature reviews genetics*, 2010. **11**(1): p. 31-46.
44. Berglund, E.C., A. Kiialainen, and A.-C. Syvanen, *Investigative Genetics*. 2011.

45. Goodwin, S., et al., *Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome*. Genome research, 2015. **25**(11): p. 1750-1756.
46. Schadt, E.E., S. Turner, and A. Kasarskis, *A window into third-generation sequencing*. Human molecular genetics, 2010. **19**(R2): p. R227-R240.
47. Branton, D., et al., *The potential and challenges of nanopore sequencing*. Nature biotechnology, 2008. **26**(10): p. 1146-1153.
48. Derrington, I.M., et al., *Nanopore DNA sequencing with MspA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(37): p. 16060-16065.
49. Howorka, S., S. Cheley, and H. Bayley, *Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores*. Nature biotechnology, 2001. **19**(7): p. 636-639.
50. Krivanek, O.L., et al., *Atom-by-atom structural and chemical analysis by annular dark-field electron microscopy*. Nature, 2010. **464**(7288): p. 571-574.
51. Luan, B., et al., *Base-by-base ratcheting of single stranded DNA through a solid-state nanopore*. Physical review letters, 2010. **104**(23): p. 238103.
52. McNally, B., et al., *Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays*. Nano letters, 2010. **10**(6): p. 2237-2244.
53. Polonsky, S., S. Rossmagel, and G. Stolovitzky, *Nanopore in metal-dielectric sandwich for DNA position control*. Applied Physics Letters, 2007. **91**(15): p. 153103.
54. Stoddart, D., et al., *Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(19): p. 7702-7707.
55. Zwolak, M., et al., *Effect of dephasing on DNA sequencing via transverse electronic transport*. 2009, Los Alamos National Laboratory (LANL).
56. Majewski, J., et al., *What can exome sequencing do for you?* Journal of medical genetics, 2011. **48**(9): p. 580-589.
57. Lennon, N.J., V.A. Adalsteinsson, and S.B. Gabriel, *Technological considerations for genome-guided diagnosis and management of cancer*. Genome medicine, 2016. **8**(1): p. 112.
58. Frebourg, T., *The challenge for the next generation of medical geneticists*. Hum Mutat, 2014. **35**(8): p. 909-11.
59. Tucker, T., M. Marra, and J.M. Friedman, *Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(2): p. 142-54.
60. Voelkerding, K.V., S. Dames, and J.D. Durtschi, *Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology*. J Mol Diagn, 2010. **12**(5): p. 539-51.
61. Su, Z., et al., *Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics*. Expert Rev Mol Diagn, 2011. **11**(3): p. 333-43.
62. Merriman, B., et al., *Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing*. Electrophoresis, 2012. **33**(23): p. 3397-3417.
63. Robinson, J.T., et al., *Integrative genomics viewer*. Nature biotechnology, 2011. **29**(1): p. 24-26.
64. Amberger, J., et al., *McKusick's online Mendelian inheritance in man (OMIM®)*. Nucleic acids research, 2008. **37**(suppl\_1): p. D793-D796.

65. Kent, W.J., et al., *The human genome browser at UCSC*. Genome research, 2002. **12**(6): p. 996-1006.
66. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype*. Nucleic acids research, 2013. **42**(D1): p. D980-D985.
67. Rebhan, M., et al., *GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases*. Trends in Genetics, 1997. **13**(4): p. 163.
68. Klonisch, T., P.A. Fowler, and S. Hombach-Klonisch, *Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development*. Developmental biology, 2004. **270**(1): p. 1-18.
69. Kurtoglu, S., et al., *Body weight, length and head circumference at birth in a cohort of Turkish newborns*. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2012. **4**(3): p. 132-9.
70. Neyzi, O., et al., *Reference Values for Weight, Height, Head Circumference, and Body Mass Index in Turkish Children*. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2015. **7**(4): p. 280-93.
71. Guven, B., et al., *Reference values for serum levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3) in the West Black Sea region of Turkey*. Scand J Clin Lab Invest, 2013. **73**(2): p. 135-40.
72. Hirschhorn, J.N., et al., *Genomewide linkage analysis of stature in multiple populations reveals several regions with evidence of linkage to adult height*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 106-16.
73. Wit, J.M., et al., *Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation*. Growth Horm IGF Res, 2008. **18**(2): p. 89-110.
74. Lam, W.F., W.L. Hau, and T.S. Lam, *Evaluation of referrals for genetic investigation of short stature in Hong Kong*. Chin Med J (Engl), 2002. **115**(4): p. 607-11.
75. Gripp, K.W., et al., *Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 205-8.
76. Sun, H., et al., *Genotype-Phenotype Analysis, Neuropsychological Assessment, and Growth Hormone Response in a Patient with 18p Deletion Syndrome*. Cytogenet Genome Res, 2018. **154**(2): p. 71-78.
77. Liehr, T., et al., *Clinical impact of somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes*. Cytogenet Genome Res, 2013. **139**(3): p. 158-63.
78. Lange, R., et al., *Endocrine abnormalities in ring chromosome 11: a case report and review of the literature*. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep, 2015. **2015**: p. 150085.
79. Rauen, K.A., M. Golabi, and P.D. Cotter, *Fertility in a female with mosaic trisomy 8*. Fertil Steril, 2003. **79**(1): p. 206-8.
80. Rao, E., et al., *FISH-deletion mapping defines a 270-kb short stature critical interval in the pseudoautosomal region PAR1 on human sex chromosomes*. Hum Genet, 1997. **100**(2): p. 236-9.
81. Hovnik, T., et al., *Cytogenetic and Molecular Genetic Characterization of Children with Short Stature*. Zdr Varst, 2015. **54**(2): p. 98-102.
82. Walenkamp, M.J. and J.M. Wit, *Genetic disorders in the growth hormone - insulin-like growth factor-I axis*. Horm Res, 2006. **66**(5): p. 221-30.
83. Lettre, G., et al., *Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 584-91.

84. Lettre, G., *Genetic regulation of adult stature*. Curr Opin Pediatr, 2009. **21**(4): p. 515-22.
85. Lango Allen, H., et al., *Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height*. Nature, 2010. **467**(7317): p. 832-8.
86. Gudbjartsson, D.F., et al., *Many sequence variants affecting diversity of adult human height*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 609-15.
87. Weedon, M.N., et al., *Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 575-83.
88. Hattori, A., et al., *Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature*. Endocr J, 2017. **64**(10): p. 947-954.
89. Godowski, P.J., et al., *Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 8083-7.
90. Amselem, S., et al., *Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene*. N Engl J Med, 1989. **321**(15): p. 989-95.
91. Bakrania, P., et al., *Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 304-19.
92. Yin, Y., et al., *Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors*. Science, 2017. **356**(6337).
93. Cohen, E., et al., *Contribution of LHX4 Mutations to Pituitary Deficits in a Cohort of 417 Unrelated Patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(1): p. 290-301.
94. Gregory, L.C., et al., *Novel Lethal Form of Congenital Hypopituitarism Associated With the First Recessive LHX4 Mutation*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(6): p. 2158-64.
95. Pfaeffle, R.W., et al., *Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(3): p. 1062-71.
96. Letunic, I. and P. Bork, *20 years of the SMART protein domain annotation resource*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D493-D496.
97. Chapman, S.C. and T.K. Woodruff, *Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (INhBP)*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(4): p. 668-79.
98. Dode, C., et al., *Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2*. PLoS Genet, 2006. **2**(10): p. e175.
99. Cox, K.H., et al., *Modeling mutant/wild-type interactions to ascertain pathogenicity of PROKR2 missense variants in patients with isolated GnRH deficiency*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(2): p. 338-350.
100. Wang, S.R., et al., *Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(8): p. E1428-37.
101. Cirulli, E.T. and D.B. Goldstein, *Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(6): p. 415-25.
102. Krawitz, P.M., et al., *Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 827-9.

**HAM VERİLER**

**ETİK KURUL KARARI****(EK-1)**

**T.C.**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**Sayı : 906****Konu: Doç. Dr. Birsen KARAMAN hk.****Tarih : 22.08.2017**

**Sayın Doç. Dr. Birsen KARAMAN**  
**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

**İlgi : Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 21/07/2017 gün ve 278051 sayılı yazısı**

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Adam NAJAFI' nın yürüteceği 2017/877 dosya numaralı "Boy Kısallığının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/08/2017 gün ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

**Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN**

**İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar**

**Etik Kurul Başkanı**

**Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu**

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

|                      |                  |                                                                              |
|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ<br>KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU                   |
|                      | AÇIK ADRESİ:     | İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET<br>KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL |
|                      | TELEFON          | 0 (212) 414 21 53                                                            |
|                      | FAKS             | 0 (212) 414 21 53                                                            |
|                      | E-POSTA          | itfetikkurul@istanbul.edu.tr.                                                |

|                   |                                                     |                                                                          |                                          |                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                               | "Boy Kısallığının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması"                  |                                          |                                               |
|                   | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                             | ---                                                                      |                                          |                                               |
|                   | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI   | Doç. Dr. Birsen KARAMAN                                                  |                                          |                                               |
|                   | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI   | Tıbbi Genetik                                                            |                                          |                                               |
|                   | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı |                                          |                                               |
|                   | DESTEKLEYİCİ                                        | İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi                |                                          |                                               |
|                   | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ                    | ---                                                                      |                                          |                                               |
|                   | ARAŞTIRMANIN FAZİ                                   | FAZ 1                                                                    | <input type="checkbox"/>                 |                                               |
|                   |                                                     | FAZ 2                                                                    | <input type="checkbox"/>                 |                                               |
|                   |                                                     | FAZ 3                                                                    | <input type="checkbox"/>                 |                                               |
|                   |                                                     | FAZ 4                                                                    | <input type="checkbox"/>                 |                                               |
|                   | ARAŞTIRMANIN TÜRÜ                                   | Yeni Bir Endikasyon                                                      | <input type="checkbox"/>                 |                                               |
|                   |                                                     | Yüksek Doz Araştırması                                                   | <input type="checkbox"/>                 |                                               |
|                   |                                                     | Diğer ise belirtiniz :                                                   |                                          |                                               |
|                   | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                       | TEK MERKEZ<br><input checked="" type="checkbox"/>                        | ÇOK MERKEZLİ<br><input type="checkbox"/> | ULUSAL<br><input checked="" type="checkbox"/> |
|                   |                                                     |                                                                          |                                          | ULUSLAR ARASI<br><input type="checkbox"/>     |

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                     |                                                       |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                     | "Boy Kısahğının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması" |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Belge Adı                           | Tarihi                                                | Versiyon Numarası                                                                                                                                                                           | Dili                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 | <input checked="" type="checkbox"/>                   |                                                                                                                                                                                             | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | <input checked="" type="checkbox"/>                   |                                                                                                                                                                                             | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | OLGU RAPOR FORMU                    | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>            |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ                   | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Belge Adı                           | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             | Açıklama                                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ                | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | SİGORTA                             | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ                   | <input checked="" type="checkbox"/>                   |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU   | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ              | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | İLAN                                | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | YILLIK BİLDİRİM                     | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | SONUÇ RAPORU                        | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
| KARAR BİLGİLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ             | <input type="checkbox"/>                              |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Diğer:                              | <input checked="" type="checkbox"/>                   | Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD |                                                                                                              |
| Karar No: 13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                     | Tarih: 11/08/2017                                     |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |
| İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Birsen KARAMAN' ın sorumluluğunda ve Adam NAJAFLI' nın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. |                                     |                                                       |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                              |

| İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU |                                   |                                                                                                      |                                                                  |                                                                  |                                                                             |        |  |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------|--|
| ÇALIŞMA ESASI                                           |                                   | 19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik |                                                                  |                                                                  |                                                                             |        |  |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:                         |                                   | Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN                                                                            |                                                                  |                                                                  |                                                                             |        |  |
| Unvanı/Adı/Soyadı                                       | Uzmanlık Alanı                    | Kurumu                                                                                               | Cinsiyet                                                         | Araştırma ile ilişki *                                           | Katılım **                                                                  | İmza   |  |
| Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN                               | Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji | İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)                                                          | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>            | [İmza] |  |
| Prof. Dr. Berrin UMMAN                                  | Kardiyoloji                       | İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)                                                | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>            | [İmza] |  |
| Prof. Dr. Ahmet GÜL                                     | Romatoloji                        | İstanbul Tıp Fakültesi                                                                               | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>            | [İmza] |  |
| Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN                                 | Nöroloji                          | İstanbul Tıp Fakültesi                                                                               | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>                       | [İmza] |  |
| Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ                                   | Biyoistatistik                    | İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik                                                           | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | [İmza] |  |

\* :Araştırma ile ilişki  
 \*\* :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığının izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

## FORMLAR

### (EK-2) Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu.

T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067-32347)

#### MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

##### Proje Adı: Boy Kısallığının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

Sizde doktorlarımız yaptıkları değerlendirmeler sonucunda boy ile ilişkili bir sorun olduğunu düşündüler. Bu güne kadar yapılan incelemelerde nedeni anlaşılamamış bu durum, “İdiyopatik Boy Kısallığı” olarak gruplanır. Bu grup hastalıkların etiopatogenezinde kromozom anomalileri ve tek gen hastalıkları yer almaktadır. Tanısal yaklaşımda kromozom anomalileri dışlandıktan sonra boy kısallığından sorumlu gen/lerin araştırılması gerekmektedir. Bu hastalıklara yol açan yüzlerce gen vardır ve her ailede bunlardan hangisinin sorumlu olduğunu belirlemek bu hastalıkların tedavisi, ailedeki diğer taşıyıcıların belirlenmesi açısından önemlidir. Size ve aileniz yardımcı olmak amacıyla bu hastalıkların tanısında kullanılan çok özel laboratuvar testlerini kendi laboratuvarımızda yaparak öncelikle size ve sizin gibi diğer hastalarda da kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz. Bu çalışmada sizin gibi sorunları olan bireyler ile anne babalarından kan ve doku örnekleri alınarak bu dokularda testler yapmayı planlıyoruz.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz, fakat karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Bilgiledikten sonra 18 yaş altında iseniz anne babanızla birlikte, erişkin iseniz kendiniz **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuduktan sonra katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

##### 1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler;

Projeye katılım için en önemli kriter “İdiyopatik Boy Kısallığı” klinik tanısı konulmuş olmasıdır.

##### 2. Yapılacak işlemin tanımı:

Klinik değerlendirmede “İdiyopatik Boy Kısallığı” ön tanısı konulduğunda yaklaşık 2 ml kan örneği alınması gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

##### 3. Örnek Alımının Olası riskleri:

###### Kan Örneği alımı;

Rutin testler amacıyla kan örnekleri alınırken K<sub>3</sub>EDTA’lı mor kapaklı tüpe alınan örnek bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) iğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

###### Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:

Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneceğini ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar erişkin yaşta iseniz sizinle paylaşılacak, değilse sizinle erişkin yaşa (18 yaş) gelene kadar paylaşılmayacaktır. Erişkin yaşta isterseniz genetik danışma eşliğinde bilgilendirme yapılacaktır. Fakat bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen ret edebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve anne babanız dışında başkaları ile paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninizle bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı sizde saptanan hastalığa neden olan genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu çalışmalar tamamlandığında bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

**Hastanın/Katılımcının Beyanı**

Sayın Dr. .... tarafından ..... (kurum adı) ..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle oluşabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişiminsanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimler ile ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, Doç. Dr. Birsan Karaman’ı "+902124142000/32327-32347 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**GÖNÜLLÜ ONAM FORMU**

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Gönüllünün Annesinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Gönüllünün Babasının Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

İdiyopatik Boy Kısaliğı Hastalıklarında Genetik Tanı Yöntemlerinin geliştirilmesi araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı:

Tarih :

İmzası:

| Katılımcıların: | Adı Soyadı | Doğum tarihi | İmza  | Ebeveyn |
|-----------------|------------|--------------|-------|---------|
| Aile üyesi      | -----      | -----        | ----- | -----   |
| Aile üyesi      | -----      | -----        | ----- | -----   |
| Aile üyesi      | -----      | -----        | ----- | -----   |
| Aile üyesi      | -----      | -----        | ----- | -----   |
| Aile üyesi      | -----      | -----        | ----- | -----   |

**(EK-3) Muayene Formu.**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
BÜYÜME-GELİŞME VE PEDIATRİK ENDOKRİNOLOJİ BİLİM DALI  
BOY KISALIĞI VAKA FORMU  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI'NDAN KONSÜLTASYON İSTEK FORMU

**KİMLİK BİLGİLERİ**

Adı Soyadı: TC Numarası:  
Doğum tarihi: Cinsiyet:  
Başvuru tarihi ve yaşı:  
Adres:

Telefon:

FORMUN DOLDURULUŞ TARİHİ /DR:

BAŞVURU ŞİKAYETLERİ:

KISA ÖYKÜ:

**ÖZGEÇMİŞ :**

Doğum öyküsü (SGA doğum, asfiksi, vb):

Doğum şekli:

Gestasyon haftası:

Ağırlık/SDS:Boy/SDS:Baş çevresi:

Komplikasyon:

Perinatal asfiksi:

Yenidoğan dönemi (uzamış sarılık, hipoglisemi, mikropenis, kriptorşidi vb.):

Nöromotor gelişimi:

Normal:

Geri(belirtiniz):



**Hedef boy (cm) / SDS:**

**Ailede benzer hastalık öyküsü:**

Puberte gecikmesi:

Erken puberte:

Annenin menarş yaşı:

**Ailede hastalıklar:**

**Aile ağacı ( hasta ve diğer hasta bireyler işaretlenecek**

**MUAYENE**

|                                                                       | <b>Geliş</b> | <b>Son muayene</b> |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| <b>Tarih</b>                                                          |              |                    |
| <b>Yaş</b>                                                            |              |                    |
| <b>Boy</b>                                                            |              |                    |
| <b>Boy SDS</b>                                                        |              |                    |
| <b>Kilo</b>                                                           |              |                    |
| <b>Kilo SDS</b>                                                       |              |                    |
| <b>Baş çevresi</b>                                                    |              |                    |
| <b>Baş SDS</b>                                                        |              |                    |
| <b>VKİ</b>                                                            |              |                    |
| <b>VKİ SDS</b>                                                        |              |                    |
| <b>Oturma yüksekliği /SDS</b>                                         |              |                    |
| <b>Kulaç</b>                                                          |              |                    |
| <b>Yaşa uyan boy %</b>                                                |              |                    |
| <b>Yaşa gore ağırlık %</b>                                            |              |                    |
| <b>Boya uyan ağırlık %</b>                                            |              |                    |
| <b>Fizik muayene</b>                                                  |              |                    |
| <b>Puberte evresi (ayrıntılı)</b>                                     |              |                    |
| <b>Dismorfik bulgu (Turner stigmatları, Madelung deformitesi, vb)</b> |              |                    |
| <b>İşitme</b>                                                         |              |                    |
| <b>Görme</b>                                                          |              |                    |
| <b>Mental durum</b>                                                   |              |                    |
| <b>Orta hat defekti</b>                                               |              |                    |
| <b>Diğer</b>                                                          |              |                    |

**LABORATUAR İNCELEMELERİ**

|                                                               |  |  |  |
|---------------------------------------------------------------|--|--|--|
| <b>Tarih</b>                                                  |  |  |  |
| <b>Yaş</b>                                                    |  |  |  |
| <b>Biyokimya<br/>(anormal sonuçlar)</b>                       |  |  |  |
| <b>sT4</b>                                                    |  |  |  |
| <b>TSH</b>                                                    |  |  |  |
| <b>IGF-1</b>                                                  |  |  |  |
| <b>IGF-1 SDS</b>                                              |  |  |  |
| <b>IGFBP-3</b>                                                |  |  |  |
| <b>IGFBP-3 SDS</b>                                            |  |  |  |
| <b>Prolaktin</b>                                              |  |  |  |
| <b>Kortizol</b>                                               |  |  |  |
| <b>ACTH</b>                                                   |  |  |  |
| <b>LH</b>                                                     |  |  |  |
| <b>FSH</b>                                                    |  |  |  |
| <b>E2</b>                                                     |  |  |  |
| <b>Testosteron</b>                                            |  |  |  |
| <b>Büyüme hormonu<br/>uyarı testleri<br/>Adı/Zirve</b>        |  |  |  |
| <b>1. Test</b>                                                |  |  |  |
| <b>2. Test</b>                                                |  |  |  |
| <b>Çölyak hastalığı<br/>tetkikleri (Patoloji<br/>var mı?)</b> |  |  |  |
| <b>Diğer</b>                                                  |  |  |  |

**Diğer tetkikler:**

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Tarih, yaş</b>           |  |
| <b>Kraniyal-hipofiz MRI</b> |  |
| <b>Batın / Pelvik USG:</b>  |  |
| <b>Ekokardiyografi</b>      |  |
| <b>Diğer</b>                |  |

**ÖN TANI / TANI:****TEDAVİ :****GENETİK ANALİZ İSTEKLERİ:**

- **Karyotip:**
- **SHOX mutasyonu:**
- **Moleküler analiz:**

**PATENT HAKKI İZİNİ**

**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**

# BOY KISALIĞININ GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

*Yazar* Adam Najafli

---

**Gönderim Tarihi:** 29-Tem-2018 12:29AM (UTC+0300)

**Gönderim Numarası:** 985860900

**Dosya adı:** BOY\_KISALI\_ININ\_GENET\_K\_ET\_YOLOJ\_S\_N\_N\_ARA\_TIRILMASI.docx (207.43K)

**Kelime sayısı:** 15893

**Karakter sayısı:** 110552

## BOY KISALIĞININ GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

## ORIJİNALLIK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>15</b>       | % <b>6</b>          | % <b>0</b> | % <b>12</b>      |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                               |             |
|----------|---------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>Submitted to Istanbul University</b><br>Öğrenci Ödevi      | % <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>Submitted to Fırat Üniversitesi</b><br>Öğrenci Ödevi       | % <b>4</b>  |
| <b>3</b> | <b>www.guncelpediatric.com</b><br>İnternet Kaynağı            | % <b>1</b>  |
| <b>4</b> | <b>www.solucan.web.tr</b><br>İnternet Kaynağı                 | % <b>1</b>  |
| <b>5</b> | <b>tanjuyildon.tr.gg</b><br>İnternet Kaynağı                  | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>www.iiste.org</b><br>İnternet Kaynağı                      | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>www.universalhospitalbodrum.com.tr</b><br>İnternet Kaynağı | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <b>www.saglikbilimi.com</b><br>İnternet Kaynağı               | <% <b>1</b> |
| <b>9</b> | <b>sagliktagundem.blogspot.com.tr</b><br>İnternet Kaynağı     | <% <b>1</b> |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                 |                      |                  |               |
|-----------------|----------------------|------------------|---------------|
| <b>Adı</b>      | Adam                 | <b>Soyadı</b>    | NAJAFLI       |
| <b>Doğ.Yeri</b> | Culfa/Azerbaycan     | <b>Doğ.Tar.</b>  | 13.09.1992    |
| <b>Uyruğu</b>   | Azerbaycan           | <b>TC Kim No</b> | 99463274240   |
| <b>Email</b>    | necefli1@hotmail.com | <b>Tel</b>       | 535 015 22 52 |

### Eğitim Düzeyi

|                 |                                                         |                  |
|-----------------|---------------------------------------------------------|------------------|
|                 | <b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>                         | <b>Mez. Yılı</b> |
| <b>Yük.Lis.</b> | İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik ABD             | 2018             |
| <b>Lisans</b>   | İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü | 2015             |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|           | <b>Görevi</b> | <b>Kurum</b> | <b>Süre (Yıl - Yıl)</b> |
|-----------|---------------|--------------|-------------------------|
| <b>1.</b> |               |              | -                       |
| <b>2.</b> |               |              | -                       |
| <b>3.</b> |               |              | -                       |

| <b>Yabancı Dilleri</b> | <b>Okuduğunu Anlama*</b> | <b>Konuşma*</b> | <b>Yazma*</b> | <b>KPDS/ÜDS Puanı</b> | <b>(Diğer) Puanı</b> |
|------------------------|--------------------------|-----------------|---------------|-----------------------|----------------------|
|                        |                          |                 |               |                       |                      |
|                        |                          |                 |               |                       |                      |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

|                      | <b>Sayısal</b> | <b>Eşit Ağırlık</b> | <b>Sözel</b> |
|----------------------|----------------|---------------------|--------------|
| <b>LES Puanı</b>     |                |                     |              |
| <b>(Diğer) Puanı</b> |                |                     |              |

### Bilgisayar Bilgisi

| <b>Program</b> | <b>Kullanma becerisi</b> |
|----------------|--------------------------|
|                |                          |
|                |                          |
|                |                          |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):