



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, DR. BEHÇET UZ ÇOCUK
HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ SAğLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA
MERKEZİ**

ÇOCUK CERRAHİSİ

HİPOSPADİAS TANILI OLGULARDA GENOTİP- FENOTİP İLİşKİSİNİN KARşILAşTIRMASI

Dr. Gökçe Sönmez



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, DR. BEHÇET UZ ÇOCUK
HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA
MERKEZİ**

ÇOCUK CERRAHİSİ

HİPOSPADİAS TANILI OLGULARDA GENOTİP- FENOTİP İLİŞKİSİNİN KARŞILAŞTIRMASI

Dr. Gökçe Sönmez

Op. Dr. Ökkaş Aytaç Karkıner

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İzmir / 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İNSİDANS	3
2.2. SINIFLANDIRMA	3
2.3. ETİYOLOJİ	5
2.4. HİPOSPADİAS GENETİĞİ	8
2.5. EMBRİYOLOJİ	11
2.6. ANATOMİ	12
2.6.1. Penis	12
2.6.1.1. Penisin Kan Damarları	14
2.6.1.2. Penisin Lenfatikleri	15
2.6.1.3. Sinirler	15
2.6.2. Üretra	16
2.7. HİPOSPADİAS ANOMALİSİ	17
2.7.1. Hipospadias Klinik	17
2.7.2. Tarihçe	18
2.7.3. Eşlik Eden Anomaliler	19
2.7.4. Cerrahi Tedavi Zamanı	20
2.7.5. Cerrahi Tedavi	20
2.7.5.1. Ameliyat Yönteminin Seçilmesi	21
2.7.5.2. Kordi Deformitesi ve Onarımı	22
2.7.6. Hipospadias Cerrahisi	23
2.7.6.1. Ortoplasti	24
2.7.6.2. Üretroplastisi	25
2.7.6.3. Glanüloplastisi	25

2.7.6.4. Prepisyoplasti	26
2.7.7.7. Postoperatif Komplikasyonlar	26
2.8. YENİ-NESİL SEKANSLAMA (NEXT-GENERATION SEQUENCİNG, NGS).....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. HASTALARDAN ÖRNEK TOPLANMASI ve DNA İZOLASYONU	29
3.2. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ (NEXT-GENERATION SEQUENCİNG, NGS).....	30
3.3. SEKANS ANALİZİ	33
3.4. VARYANT ANALİZİ	33
3.4.1. Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (ACMG) Kriterlerine Göre Varyantların Sınıflandırılması	34
3.4.2. ACMG Patojenik Kriterleri... ..	34
3.5. İSTATSTİKSEL YÖNTEM.....	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA.	49
6. SONUÇLAR.	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	77
EKLER... ..	80

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlama süreci boyunca her zaman ve her konuda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini ve ilgisini esirgemeyen çok değerli tez danışman hocam Başasistan Op. Dr. Ökkaş Aytaç Karkıner'e çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, yönlendiren, geliştiren, uzmanlık eğitimi boyunca ilimleri ve bilgi birikimlerini aktaran, cerrahi sanatını öğreten bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Münevver HOŞGÖR'e ve sayın Prof. Dr. Akgün ORAL'a çok teşekkür ederim.

Eğitimime büyük katkıları olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli uzman hekim ağabey ve ablalarım, tez çalışmam boyunca bana destek olan bütün asistan doktor arkadaşlarıma, hemşirelere ve tüm hastane personeline teşekkür ederim.

Çalışmanın uygun koşullarda yapılması, düzenlenmesi, sonuçlandırılmasında desteğini esirgemeyen sayın Uzman Dr. Filiz HAZAN'a çok teşekkür ederim.

Bugünlere ulaşmamı sağlayan ve her zaman yanımda olan ve bu zorlu süreci benimle birlikte paylaşan sevgili aileme ve arkadaşlarıma varlıkları ve destekleri için sonsuz minnetle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

aCGH: Array karşılaştırmalı *genomik hibridizasyon*

ACMG: American College of Medical Genetics (Amerikan Medikal Genetik Topluluğu)

AKR1C: Aldo-keto redüktaz 1C

AR: Androjen Reseptörü

CYP11A1: Sitokrom P450 ailesi 11 alt grubu A üyesi 1

DGKK: *Diasilgliserolkinaz kappa*

DHR: Dihidrotesteron

HSD3B1: Hidroksi-delta-5-steroid dehidrogenaz 3 beta ve steroid delta-izomeraz 1

ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IVF: İn-vitro Fertilizasyon

MAGPI: Meatal advancement and glanuloplasti incorporated

MAMLD1: Mastermind benzeri bölge c içeren protein 1

MAP3K1: Mitojen aktifleştirici-protein 3 kinaz 1

NGS: Next-Generation Sequencing

SRD5A2: Steroid 5-alfa redüktaz

VUR: Vezikoüreteral Reflü

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Barcat sınıflaması...	4
Tablo 2. Sinnecker skorlaması.....	5
Tablo 3. Hipospadias gelişiminde rol alan genler	10
Tablo 4. 46 XY Cinsiyet Gelişim Bozuklukları NGS Panelinin kapsadığı genler, kromozomal lokalizasyonları ve ilişkili olduğu hastalıklar.....	31
Tablo 5. Çalışmaya katılan hastaların; farklı hipospadias tipleri için sayı, yaş, ilk operasyon yaşı, anne yaşı ve doğum haftası verileri... ..	38
Tablo 6. Çalışmaya katılan hastaların; farklı hipospadias tipleri için gen varyantı tespit edilen hasta sayısı ve gen varyantı çeşitleri.....	46
Tablo 7. Çalışmaya katılan hastaların; hipospadias tipleri, varyant saptanan genleri ve zigositeleri ve ACMG değerlendirmeleri... ..	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Hipospadias klinik sınıflaması.....	4
Şekil 2: Ekdodermal penetrasyon ve endodermal transformasyon teorisi.....	12
Şekil 3: Penisin enine kesiti.....	13
Şekil 4: Penisin arter ve ven görüntüsü, korpus kavernozum ve spongiozumlarla ilişkisi.....	15
Şekil 5: Penis invazyonu.....	16
Şekil 6: Artifisyonel Ereksiyon.....	22
Şekil 7: Dorsal orta hat plikasyonu: Buck's fasyası eğriliğın en fazla olduğu yerden orta hatta kesilir. 6/0 Polydioksanone (PDS) dikiş ile onarılır.....	23
Şekil 8: Çalışmada varyant saptanan genler, Clinvar değerdendirmesi.....	39
Şekil 9: Çalışmada saptanan varyantların ACMG kriterlerine göre değerdendirilme sonuçları.....	40
Şekil 10: A:3 no lu hastada AR geni novel hemizigot c.1675A>T (p. T559S) varyantının NGS görüntüsü. B: annede heterozigot varyant sanger analizi görüntüsü C: Sağlıklı erkek kardeş sanger analizi görüntüsü D: Hastada hemizigot varyant sanger analizi görüntüsü.....	41
Şekil 11: 12 no lu hastada SRD5A2 geni homozigot c.586G>A (p. G196S) varyantının NGS görüntüsü.....	43
Şekil 12: A: 15 no lu hastada GATA4 geni heterozigot c.487C>T (p. P163S) varyantının NGS analizi görüntüsü B: Hastada GATA4 geni heterozigot c.487C>T (p.P163S) varyantının sanger analizi görüntüsü C: Hastanın hipospadias olan babasında sanger görüntüsü.....	45
Şekil 13: 46,XY CGB Hastalarında, NGS gen paneli patojenik varyant sıklığı	62
Şekil 14: 46, XY CGB hastalarında NGS analizi gen sayısı ile patojenik varyant sıklığı ve hipospadias olanlarda patojenik varyant sıklığının karşılaştırması.....	63
Şekil 15: A: Literatürde ve çalışmamızda hipospadias ile birlikte ek anomalisi olan hastalarda patojenik varyant değerdendirmesi B: Literatürde ve çalışmamızda izole hipospadias hastalarda patojenikvaryant değerdendirmesi.....	63

ÖZET

Amaç: Üretra, prepişyum ve penisin ventral bölümünün gelişimindeki anomali, hipospadias olarak tanımlanır. Hipospadias erkek genital sisteminin en sık görülen konjenital anomalilerinden biridir. Olguların önemli bir bölümünün etiyolojisinde, genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, hipospadiaslı hasta grubunda Yeni-Nesil Dizi Analizi (NGS) hedef gen paneli analiz sonuçları retrospektif olarak incelenerek; varyant saptanan genleri belirlemek ve hipospadias alt tipleri ile gen varyantlarını karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: S.B.Ü. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesine 2003-2020 yılları arasında başvurmuş, hipospadias nedeniyle takip ve tedavi edilen 68 hastanın kayıtları retrospektif olarak incelendi. Hastalardan alınan kan örneklerinde Yeni-Nesil Dizi (NGS) hedef gen paneli analizi gerçekleştirildi. NGS analizi ile varyant saptanan olgularda, Sanger sekans analizi ile ilgili gende varyant bölgesi dizi analizi yapılarak doğrulandı. Ardından, tüm varyantlar Clinvar veri tabanında araştırıldı. Novel varyant değerlendirmesinde ise PolyPhen2, MutationTaster bilgisayar programları da kullanıldı. Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (ATGC) kriterlerine göre, varyantın hastalık ile olası ilişkisi araştırıldı. Aile segregasyon analizi de, novel varyant patojenite değerlendirmesinde kullanıldı.

Bulgular: 68 hipospadiaslı hastanın yaklaşık olarak %38'inde distal hipospadias görülürken; yaklaşık olarak %62'sinde proksimal hipospadias kaydedilmiştir. Tüm katılımcıların yaş ortalaması $6,11 \pm 4,62$ olarak hesaplanmıştır. Hastaların ilk operasyon yaşları ise ortalama olarak $3,22 \pm 2,95$ olarak hesaplandı. Çalışmaya dâhil edilen tüm hastaların, doğum sırasında anne yaşı ortalaması $25,79 \pm 4,78$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, tüm katılımcıların doğum haftası ortalaması ise $37,38 \pm 2,74$ olarak bulunmuştur. Çalışmada; 46, XY CGH gen paneli ile 15 hastada, 17 varyant saptandı. 14 varyant novel iken 3 varyant Clinvar'da daha önce bildirilmişti. Varyant saptanan genler: *SRD5A2*, *HSD17B3*, *AMH*, *AR*, *MAMLD1*, *AMHR2*, *LHCGR*, *AKR1C2*, *GATA4* ve *SOX9* genleridir. Distal ve proksimal hipospadias olguları 2 grup olarak düşünülüp, gen varyantı olup olması ile ilişkisi Ki-Kare testi ile bakıldığında; hipospadiasın distal veya proksimal olması ile gen varyantı olup olmaması arasındaki ilişki anlamlı bulunamamıştır ($p=0,945$).

Sonuç: nceki yıllarda yapılan çalışmalara benzer şekilde, bu çalışmada da 46, XY gen panelindeki bazı genlerin varyantlarının hipospadias etiyolojisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hipospadias, Yeni-Nesil Dizi Analizi (NGS), 46, XY Cinsiyet Gelişim Bozukluğu (CGB)



ABSTRACT

Aim: The anomaly of urethra, preputium and ventral part of penis is defined as hypospadias. Hypospadias is one of the most frequently seen congenital anomalies in male genital system. In etiology of significant number of cases, genetic factors are thought to have a role. In this study, it was aimed to identify the variant genes and compare the subgroups of hypospadias with gene variants, by the investigation of analysis data of Next-Generation Sequencing (NGS) target gene panel in hypospadias patient group retrospectively.

Material and Methods: The records of 68 patients who was followed and treated because of hypospadias and who applied İzmir Dr. Behçet Uz Child Diseases and Surgery Education and Research Hospital between 2003-2020 years were investigated retrospectively. The Next-Generation Sequence (NGS) Analysis target gene panel analysis was performed in blood samples taken from patients. The cases in which variant genes were detected, the variant region was affirmed by sequence analysis with Sanger sequence analysis. Then, all variants were searched in Clinvar database. In novel variant evaluation, Polyphen2, MutationTaster computer programs were also used. According to the American College of Medical Genetics (ACMG) criteria, the possible relationship between variant and pathology. Family segregation analysis was also used in novel variant pathogeny evaluation.

Results: While distal hypospadias was seen nearly %38 of 68 patients with hypospadias, proximal hypospadias was recorded nearly %62 of them. The mean age of all participants was calculated as $6,11 \pm 4,62$. First operation age of patients was measured $3,22 \pm 2,95$ averagely. All patients included in the study, the mean maternal age while birth was calculated as $25,79 \pm 4,78$. Moreover, the mean of birth week of all patients was found as $37,38 \pm 2,74$. In the study, 17 variant were detected in 15 patients with 46, XY SDD gene panel. While 14 variant were novel, 3 variant were submitted to Clinvar before. The genes that variance was detected: *SRD5A2*, *HSD17B3*, *AMH*, *AR*, *MAMLD1*, *AMHR2*, *LHCGR*, *AKR1C2*, *GATA4* and *SOX9*. While the distal and proximal hypospadias cases were thought as 2 groups, when the relation with whether gene variance present or not was searched via Chi-square test; the relationship between

whether hypospadias was distal or proximal with whether gene variance was present or not was not found significant ($p=0,945$).

Conclusion: Likewise the previous studies, certain gene variants of 46, XY gene panel were shown to contribute hypospadias etiology in this study.

Key Words: Hypospadias, Next-Generation Sequence Analysis (NGS), 46, XY Disorder of Sex Development (DSD)



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipospadias erkek genital sisteminin en sık görülen konjenital anomalilerinden biridir. Üretra, prepisyum ve penisin ventral bölümünün gelişimindeki anomali, hipospadias olarak tanımlanır (1). Ortalama 250 canlı erkek doğumunda bir görülmektedir (2). Klinik olarak; izole hipospadias ya da mikropenis, kriptorşidizm, bifid skrotum gibi diğer genitoüriner anomalilerle birlikte görülebilmektedir. Etiyolojisinde; ürogenital farklılaşmada rol oynayan gen ya da genlerin ekspresyonunun bozulması, intrauterin hormonal maruziyet ve çevresel faktörlerin rol aldığı gösterilmiş olsa da nedeni büyük ölçüde bilinmezliğini korumaktadır (3). Hipospadias anomalisinde; üretral meatus, glanstan perineye kadar herhangi bir lokalizasyonda bulunabilir ve sınıflama bu lokalizasyona göre yapılır. Üretral meatusun yerleşimine göre; distal (glanüler, koronal, subkoronal) ve proksimal (midpenil, penoskrotal) hipospadias olarak 2 gruba ayrılarak sınıflandırılmaktadır ve distal hipospadias daha sık görülmektedir (4). Olguların %30'ununun etiyolojisinde, genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Hipospadiasın, 200'den fazla sendroma eşlik ettiği bildirilmiştir (5). Fallus gelişimi ve üretral kapanmada rol oynayan genlerdeki ya da sinyal yollarındaki bozukluklar, hipospadiasa yol açabilir. İnsanda dış genitalyanın gelişimi; erken dönem hormon-bağımsız faz (5-8. gebelik haftaları) ve geç dönem hormon-bağımlı faz (8-12. gebelik haftaları) olarak 2'ye ayrılmaktadır. Hipospadias olgularında %4 oranda, SRY genini etkileyen kromozomal anomaliler ve genin nokta mutasyonlarının sorumlu olduğu bildirilmiştir (6). Hormon bağımsız fazda sentezlenen *WT1*, *Diasilgliserol kinaz kappa (DGKK)*, *NR5A1*, *Mitojen aktiveleştirici protein 3 kinaz 1 (MAP3K1)*, *Mastermind bölge içeren protein 1 (MAMLD1)* genlerinin de, hipospadiasla ilgili olduğu görülmüştür. Steriojenik yolak üzerindeki enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, androjen sentezini etkileyerek hipospadias oluşmasına yol açarlar. Bu yolak hormon-bağımlı fazda görev alıp, kolesterolün cinsiyet hormonlarına dönüşümünü sağlar. Sitokrom P450 ailesi 11 alt grubuA üyesi1 (*CYP11A1*), Hidroksi-delta-5-steroid dehidrogenaz 3 beta ve steroid delta izomeraz 1 (*HSD3B1*), *HSD3B2*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, aldo-keto redüktaz 1C-4 (*AKR1C4*)

ve Steroid 5-alfaredüktaz yetmezliği (SRD5A2) enzimleri burada görevlidir. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, yolakta son basamaktaki testosteron ve dihidrotesteron (DHT) eksikliğine sebep olarak hipospadias gelişiminde rol oynarlar. Testosteron ve DHT, AR'ye (androjen reseptörü) bağlanarak etki gösterir ve dış genitalyanın oluşumunu stimüle ederler (7-9). İnsanda dış genital yapısında anormalliklere yol açan varyantların tanımlandığı diğer nadir genler; *DHH*, *GATA4*, *ZFPM2* olarak bildirilmiştir (10).

Bu çalışmanın amacı, 2003-2020 yılları arasında, hastanemiz çocuk cerrahi ve çocuk genetik ve tıbbi genetik polikliniklerinde takipli hipospadias tanılı hastalarda yapılmış olan yeni nesil dizileme yöntemi (NGS) hedef gen paneli analiz sonuçlarını, retrospektif olarak inceleyerek varyant saptanan genleri belirlemek ve hipospadias alt tipleri ile gen varyantlarını karşılaştırarak genotip-fenotip ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNSİDANS

Hipospadias erkek genital sisteminin kriptorşidizmden sonra 2. en sık görülen konjenital anomalisidir ve insidansı ortalama 250-300 canlı erkek doğumda 1 olarak hesaplanmıştır (11). Distal hipospadias daha sık görülmekle birlikte, insidansı 1/80-125 olarak bulunurken, penil hipospadias 1/1250, penoskrotal hipospadias tiplerinde ise insidans 1/3330 olarak hesaplanmıştır (12).

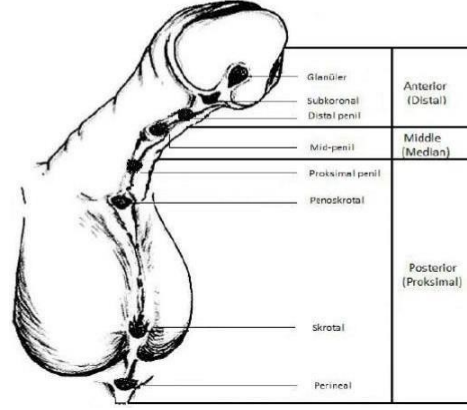
Hipospadiasın görülme sıklığı ırklar arasında farklılık göstermektedir. En az Meksikalılarda, nadiren Afrika kökenlilerde, en çok da beyaz ırkta görülmektedir (13). Bunun yanı sıra; son yıllarda Avrupa ve Kuzey Amerika'da hipospadias sıklığında bir artış meydana gelmiştir. Son yayınlanmış çalışmalardan elde edilen verilere göre, hipospadias sıklık frekansı 1970-1990 yılları arasında yaklaşık olarak 2'ye katlanmıştır (14). Orandaki artışın nedeni olarak; doğum kilosuzluğu ve gelişimini tamamlamamış çocuklar, östrojenik ya da antiandrojenik bileşenlerin etkileşimlerine maruz kalma gösterilmektedir (15).

2.2. SINIFLANDIRMA

Hipospadias üretral meatusun yerleşimine göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Eski, ancak popüler olan sınıflama Smith'in çalışmasına dayanır. Bu sınıflandırmada, koronadan glansın ucuna kadar olan anormal meatus yerleşimleri 1., subkoronal bölgeden penoskrotal birleşim yerine kadar penis gövdesindekiler 2. ve penoskrotal birleşim yerinden perineye doğru daha aşağı yerleşimli olanlar da 3. derece olarak adlandırılmıştır (16).

Hipospadias anomalisi ile birlikte, kordinin de mevcut olması ve kordi düzeltildikten sonra üretral meatusun lokalizasyonunun değişmesi nedeniyle; pek çok çocuk cerrahı kordi düzeltilmesinin ardından, üretral meatusun aldığı lokalizasyona

göre hipospadiası sınıflayan Barcat klasifikasyonunu kullanmaktadır (Tablo 1) (Şekil 1) (17).



Şekil 1: Hipospadias klinik sınıflaması

Tablo 1: Barcat Sınıflaması

ANTERİOR HİPOSPADİAS (% 49 – 73,4)
- Glanüler Hipospadias ve megameatus - Koronal hipospadias - Anterior penil veya subkoronal hipospadias
MİDPENİL HİPOSPADİAS (% 7,1 – 21)
POSTERİOR HİPOSPADİAS (% 17,5 – 30)
- Posterior penil hipospadias - Penoskrotal hipospadias - Skrotal hipospadias - Perineal hipospadias

Hipospadias anomalisinde üretral meatus, glans ile perine arasında herhangi bir lokalizasyonda bulunabilir ve sınıflama da bu lokalizasyona göre yapılır. Üretral meatusun lokalizasyonuna dayalı en kapsamlı hipospadias sınıflaması, Hadidi tarafından yapılmıştır. Hadidi sınıflaması; hem klinik muayenede hem de kordi

düzeltildikten sonraki meatusun yeni yerleşim yerine göre olan, operasyon sırasındaki değerlendirmeyi esas almıştır (18). Cinsel gelişim bozukluğu olan hastaların klinik değerlendirmesinde daha detaylı evreleme yapmaya olanak sağlayan Sinnecker sınıflaması da kullanılmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2: Sinnecker skorlaması

FENOTİP	ALT GRUP	ÖZELLİKLER
Erkek	1a	Belirgin maskülinizasyon eksikliği yok
Erkek	1b	Bozulmuş spermatogenez
Predominant erkek	2a	İzole hipospadias
Predominant erkek	2b	Mikropenis ve şiddetli hipospadias, Bifid skrotum
Belirsiz	3a	Klitoris benzeri glansa sahip mikrofalus, labia major benzeri bifid skrotum, perineoskrotal hipospadias
Belirsiz	3b	3a gibi; ek olarak kısa, kör vajinanın bulunduğu ürogenital sinüs
Baskın olarak dişi	4a	Klitoromegali ve labial füzyon, giriş gölgesi geniş, kısa ve kör vajinanın bulunduğu ürogenital sinüs
Baskın olarak dişi	4b	Hafif derecede androjenik etkiler: hafif klitoromegali veya kısmi labial füzyon, üretra ve vajina girişleri ayrılmış
Dişi	5	Hiç virilizasyon belirtisi yok

2.3. ETİYOLOJİ

İzole hipospadias etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. Androjenler; penis gelişimini aktive ettiklerinden, androjen metabolizması ile ilgili bir bozukluk bu anomaliye yol açabilir. Etiyolojisinde; bozulmuş gen ekspresyonları, intrauterin hormonal maruziyet ve çevresel faktörlerin rol aldığı gösterilmiş olsa da nedeni büyük ölçüde bilinmezliğini korumaktadır (3,19). Birçok olguda, hipospadias sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (20).

Literatürde, olguların gözden geçirildiği yayınlarda, deformitenin oluşmasında; anne yaşı, gebelik sayısı, düşük, ölü doğum, sezaryen doğum sayısı, annede pre-eklamps hikâyesi, ikiz doğum, kan grubu uyumsuzlukları, ilaçlar,

radasyon maruziyeti gibi faktörlerden hiçbirinin dikkate değer bir rolünün olmadığı ifade edilmiştir (21).

Son yıllarda hipospadias insidansındaki artışın nedeni olarak; çevresel faktörler suçlanmaktadır. Gastrointestinal sistem tarafından emilerek, karaciğer ve adipoz dokuda biriken poliklorinlenmiş bileşikler, lipofilik özelliklerinden dolayı plasentaya da geçebilir. Sentetik kimyasalların üretim ve kullanımındaki artış, erkek üreme sisteminde görülen bozukluklarda da artışa yol açmaktadır. Antiandrojenik bir madde olan fitalat; testosteron sentezini etkileyerek, erkek genital sisteminin gelişimini etkiler. Tarımda kullanılan pestisitler, endokrin bozukluğuna neden olan ağır metaller, bifenoller, alkil fenoller, organik solventler hipospadias gelişiminde rol oynar (3).

Penis gelişimini fetal hayatta androjenler stimüle ederler ve androjen metabolizmasıyla ilgili bozukluklar, hipospadias ile sonuçlanabilmektedir. Androjen metabolizmasındaki bozukluk, penis oluşumu için uyarıcı faktörlerdeki yetersizlik (hipotalamik-pituiter-gonadal eksenindeki aksaklıklar) ve dokunun bu uyarılara cevap vermemesinden (penisteki androjen reseptörlerinin yetersizliği) kaynaklanabilir. Hipospadias oluşumundaki en önemli rolü, androjen uyarısında yetersizliğin oynadığı düşünülmektedir (21).

Testosteronun 5-alfa redüktaz tip 2 tarafından DHT'ye dönüşmesi ve DHT ligandının da androjen reseptörüne bağlanarak, androjeni aktive etmesi sonucunda üretral kapanma gerçekleşir ve üretral plak çevresindeki destek dokular gelişimlerini tamamlayabilir (4). 5-alfa redüktaz inhibitörleri, steroid hormon sentezi enzimi inhibitörlerine maruz kalma, androjen reseptörü antagonistleri, düşük testosteron ve DHT düzeyleri, yüksek östrojen ve progesteron düzeyleri hipospadias oluşumunda etkili olduğu tespit edilmiştir (22).

Annenin geç menarş yaşı, ilerlemiş anne yaşı, maternal obezite, primipar olması hipospadias görülme riskini arttırmaktadır (23). İntrauterin büyüme geriliği ve düşük doğum ağırlığı, hipospadias için risk faktörü olarak gösterilmiştir (3). Düşük doğum ağırlığı, gestasyonel yaştan bağımsız olarak riski arttırmaktadır (24). Gatti ve ark.'ları, gestasyonel yaşı küçük olan infantlarda, normal infantlara göre

hipospadiasın 10 kat daha sık görüldüğünü tespit etmişlerdir (25). Birçok çalışmada ise, annenin sigara kullanımının hipospadias riskinde artışla ilişkili olmadığı gösterilmiştir (26).

Oral kontraseptif kullanımı hipospadias riskinde artışa sebep olarak gösterilememiştir ancak; in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile indüklenen gebeliklerde, hipospadias riskinin arttığı belirtilmiştir (27).

Hamileliğin ilk trimesterında östrojenik bileşenler, progestin veya androjen benzeri ilaçlara maruz kalmanın, hipospadias oluşma riskini arttırdığı düşünülmektedir. Östrojenik aktivite; çevresel maddelerde, meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntılarında, verim arttırıcı madde verilen inek sütlerinde, bazı bitki ve farmasötiklerde yaygın olarak bulunmaktadır (28). Soya ürünlerindeki fitoöstrojenlerin, hipospadias insidansında artışa neden olduğu iddia edilmektedir (29). Gebelikte demir takviyesi alınması hipospadias oluşumu için risk faktörüdür (30). Gebelikte progestin kullanımı ile de hipospadias arasında ilişki olduğu gösterilmiştir, ancak kontrasepsiyon amacıyla alınan progesteron ile hipospadias risk artışı arasında ilişki olduğu gösterilememiştir (29).

Hipospadiasta ailesel yatkınlık ve poligenik geçiş de söz konusudur. Fransa'da çok merkezli, hipospadias tanılı hastalar olan 88 aileyi inceleyen bir çalışmada; Oliver ve ark.'ları hipospadiasın ailesel görülme sıklığını %22.3 olarak bulmuşlardır. Ailede birden çok olgu görülme oranı %19.3 olarak belirlenmiştir. Ailesel hipospadias görülme olasılığı %59 oranla paternal yatkınlık ve babada hipospadias mevcutsa da risk %30 olarak bulunmuştur. Hipospadiasın derecesinin ağırlığı bir risk faktörü olarak gösterilmemiş, glanüler ve anterior penil hipospadiasların en sık ailesel geçiş gösteren hipospadias tipleri olduğu belirtilmiştir (31). Schnack ve ark.'ları, 1968-2008 yılları arasında hipospadias tanılı olgularda yaptıkları geniş bir seride hipospadiasın %57-77 oranında kalıtsal geçiş gösterdiğini belirlemişlerdir (32).

Hipospadiasın pek çok kalıtsal hastalıkla birlikteliği de saptanmıştır. WAGR sendromu (Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler, mental

retardasyon), Klinefelter sendromu, Reifenstein, Wolf – Hirschhorn (4p delesyonu), Cat-eye (5p delesyonu), Smith - Lemli - Opitz (hipertelorizm, el - ayak - genital), Denys - Drash, Silver - Russell gibi genetik sendromlarla ilişkili olabileceği fark edilmiştir. Hermafroditizm ve mikst gonadal disgenezis gibi çeşitli sorunlara neden olan ambigu genitalyaya sıklıkla hipospadias da eşlik etmektedir (33,34).

2.4. HIPOSPADİAS GENETİĞİ

Hipospadiasın etiyolojisinde çevresel faktörlerle ilişki içinde olan birçok genin rol aldığı düşünülmektedir. Erkek fenotipte dış genitalyanın oluşabilmesi için Y kromozomunun varlığı gereklidir. 46 XY bireylerde Y kromozomu üzerinde yer alan *sex determining region Y (SRY) geni*, erkek cinsiyet gelişimini sağlayacak olayları başlatır. *SRY* etkisiyle gelişen fetal testislerde, androjen üretimiyle erkek dış genital organların gelişimi ve maskülinizasyon süreci başlar. Bu süreçte testosteron ve DHT hormonları ve androjen reseptörleri görev almaktadır (35). Bu süreçte oluşacak bozukluklar maskülinizasyon yetersizliğine sebep olur. Dış genitalyanın gelişimi; erken dönem hormon-bağımsız faz (5-8. gebelik haftaları) ve geç dönem hormon-bağımlı faz (8-12. gebelik haftaları) olarak 2'ye ayrılmaktadır. Hormon bağımsız fazda sentezlenen *WT1*, *Diasilgliserolkinaz kappa (DGKK)*, *NR5A1*, *Mitojen aktiveleştirici-protein 3 kinaz 1 (MAP3K1)*, *Mastermind benzeri bölge c içeren protein 1 (MAMLD1)* genlerinin de hipospadiasla ilgili olduğu görülmüştür. Steriojenik yolak üzerinde yer alan enzimleri kodlayan gen mutasyonları, androjen sentezini etkileyerek hipospadias oluşmasına yol açarlar. Bu yolak hormon-bağımlı fazda görev alıp, kolesterolün cinsiyet hormonlarına dönüşümünü sağlar. Sitokrom P450 ailesi 11 alt grubuA üyesi 1 (*CYP11A1*), Hidroksi-delta-5-steroid dehidrogenaz 3 beta ve steroid delta-izomeraz 1 (*HSD3B1*), *HSD3B2*, *HSD17B2*, *HSD17B3*, aldo-keto redüktaz 1C (*AKR1C*) ve Steroid 5-alfaredüktaz (*SRD5A2*) enzimleri de burada görevlidir. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, yolakta son basamaktaki testosteron ve DHT eksikliğine sebep olarak; hipospadias gelişiminde rol oynarlar. Testosteron ve DHT, AR'ye bağlanarak etki gösterir ve dış genitalyanın oluşumunu stimüle ederler (35). İnsanda dış genital yapısında anormalliklere yol açan varyantların tanımlandığı diğer nadir genler; *DHH*, *GATA4*, *ZFPM2* olarak

bildirilmiştir (10). Hipospadias genetiğinde rol alan genlerden etki mekanizması üzerine değerlendirmesi olanlar Tablo 3’de gösterilmiştir.

Ailesel hipospadias %10 sıklıkta görülmektedir. Ağır hipospadias, sıklıkla sporadik olarak görülmektedir. Ailesel olguların, hafif hipospadiasta daha sık olduğu bildirilmiştir. Genetik danışma, hipospadiasın etiyolojisine göre değişmektedir. Ailede hipospadias olması durumunda, etiyolojiden sorumlu gen saptanmamışsa, bir sonraki gebelikte erkek çocukta hipospadias oluşma riski %10’dan fazladır. Hastanın ikinci derece akrabalarında hipospadias riski %3, üçüncü derece akrabalarında da %1’den fazla risk olduğu belirtilir (6). Otozomal resesif kalıtılan bir hastalıkla ilişkili gen patojenik varyantı saptanması durumunda, ailenin her gebeliğinde %25 hastalık riski olduğu belirtilir. Hastanın kendi çocukları ise %50 taşıyıcılık riskine sahip olacaktır.

Otozomal dominant kalıtılan hastalıklarda, varyant de novo ise, sonraki gebeliklerde risk %1 olarak belirtilir. Ebeveynlerden birisinde varyant saptanması durumunda, her gebelikte %50 risk olduğu belirtilir. Aynı şekilde hasta birey, %50 çocuklarına hastalığı aktaracaktır (36).

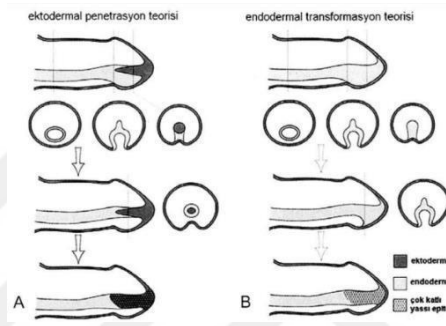
Tablo 3: Hipospadias gelişiminde rol alan genler (37)

Gen	Etki Mekanizması
Erken (hormondan bağımsız) genital gelişim döneminde etkili olan genler	
<i>SRY,SOX9, DMRT1,GATA4</i>	Testiküler farklılaşmanın sağlanması
<i>WT1</i>	Testiküler farklılaşmanın sağlanması
<i>SHH</i>	Üretranın şekillenmesi, Genital tüberkülün mezenkimi, agenezi ve üreteli arasındaki hücre etkileşimlerinin düzenlenmesi
<i>FGFR2</i>	Fibroblast büyüme faktör reseptörü 2, Androjen reseptör transkripsiyonu ile ilişkili
<i>FGF10</i>	Fibroblast büyüme faktörü 10 sentezi
<i>FGF8</i>	Fibroblast büyüme faktörü 8 sentezi
<i>BMP4 BMP7</i>	Kemik matriks proteini, Genital tüberkülde epitelyum- mezenşim etkileşiminde etkili
<i>HOXA HOXD</i>	Non-endokrin penil gelişim FGF8 ve BMP7 proteinlerinin indüksiyonu, AR ekspresyonu
<i>Wnt-beta catenin</i>	GT'nin gelişimi, hücre-hücre adhezyonları
Geç (Hormona bağımlı) genital gelişim döneminde etkili olan genler Androjene bağımlı genler	
<i>5 alfa redüktaz tip 2</i>	Testosteronun dihidrotestosterona dönüştürülmesi
<i>Androgen reseptörü (AR)</i>	Androjenin hücrelerde etki göstermesi
<i>HSD17B3</i>	Androstenodionun testosterona dönüşümünü katalizleyen 17 β -OH steroid dehidrogenaz enzimini kodlar
<i>FKBP52</i>	Androjen reseptörünün ko-şaperonudur.
<i>MAMLD1 (CXorf6)</i>	Testiküler testosteron üretimi
Östrojene bağımlı genler	
<i>Östrojen Reseptör Alfa</i>	Üretral kapanma ve skrotal gelişim
<i>Östrojen Reseptör Beta</i>	Üretral kapanma ve skrotal gelişim
<i>ATF3</i>	Üretral kapanma ve skrotal gelişim

2.5. EMBRİYOLOJİ

Fallus gelişiminin tamamlanması gestasyonun 6-14. haftalarına denk gelir. Dış genital yapının erkek yönünde oluşumu; hormonal sinyal iletimi, enzim aktiviteleri, genetik programları ve hücre farklılaşmalarını içeren kompleks bir süreçtir (38). Gestasyonel 3. haftada primitif çizgiden köken alan mezenşim hücreleri kloakal membranı oluşturmak üzere kloakal membrana göç ederler. Kloakal katlantılar, kranialde orta hatta birleşerek ürogenital sinüsün önünde 6. haftada genital tüberkülü (fallus) oluştururlar (39). Genital tüberkülün oluşmasıyla dış genital gelişim başlar. Kloakal membran; ürogenital membran (ürogenital sinüs) ve anal membranlara ayrılır. Ürogenital sinüsün pelvik parçasından, fallik parçanın da katkısıyla posterior ve membranöz üretra oluşur. 8.gestasyonel haftada üretral katlantıların her iki yanında skrotal şişlik (scrotal swellings) belirir (40). Gestasyonel 2. ayda erkek genital yapılar, fetal testis tarafından sentezlenen testosteron hormonunun etkisiyle oluşmaya başlar. Fetal testislerin Leydig hücreleri, plasental hCG tarafından testosteron üretimi için uyarılır. 5α -redüktaz tip II enzimi ile testosteron DHT'ye dönüştürülür. DHT genital dokudaki androjen reseptörlerine bağlanarak etki gösterir (41). Gestasyonel 7 ve 8. haftada erkek gonadlar, testosteron üretimini sağlayan *SRY* geninin etkisi altında farklılaşırlar. Anüs ve genital yapılar arasındaki mesafe genişler. Ardından fallusun uzaması, penil üretranın oluşumu ve prepisyumun gelişimiyle maskülinizasyonun ilk belirtileri ortaya çıkar (42). Endodermal üretral katlantıların medial köşelerinin, proksimalden distale doğru birleşmesiyle ilk trimesterin sonunda penil üretra oluşur. Üretral kıvrımların ektodermal köşeleri; skrotal ve penil median raphe ve üretranın üstünde prepisyumu oluşturur (43). Prepüsyal katlantılar, üretra ile beraber uzayarak penis shaftını sarar. Hipospadiyak peniste, üretra ventral yüzde inkomplet olduğundan prepüsyal uzama kesintiye uğrar. Prepüsyal dokular ventral yüzde gelişmezken, dorsal yüzde normalden daha fazla gelişir. Üretranın distal kısmı olan glanüler üretra, hormonal ve lokal faktörlerin etkisiyle içedoğru penetre olarak, bir epitelyal kordon veya ek (epithelial tag) oluşturarak tamamlanır. Bu kordonun içinde sonradan gelişen bir kanal oluşumuyla, glans penis ventrale doğru ayrılır ve eksternal üretral meatus meydana gelir. Bu yapının fossa navikülariste, proksimal üretrayla birleşmesiyle tam bir üretra oluşmuş olur (ektodermal içe büyüme teorisi). Glanüler üretranın oluşum

mekanizması tartışmalıdır (Şekil 2). Endodermal hücresel farklılaşma teorisine göre ise; glanüler üretra, bulber ve penil üretranın gelişimine benzer şekilde oluşur. Ürogenital sinüs epitelyumunun distale doğru uzaması ile oluşan glanüler üretra, skuamöz epitelyuma differansiye olur (44). Son çalışmalar; üretra epitelyumunun, ürogenital sinüsten orjinlendiği ve endodermal farklılaşma fikrini desteklemektedir. Glandüler üretra; üretral tabakanın genital tüberkül içerisine doğru büyümesine ek olarak, ventral büyüme ve üretra katlantılarının birleşmesi ile meydana gelmektedir (45). Endodermal üretral katlantıların füzyonundaki eksiklik durumunda hipospadias görülür (40).



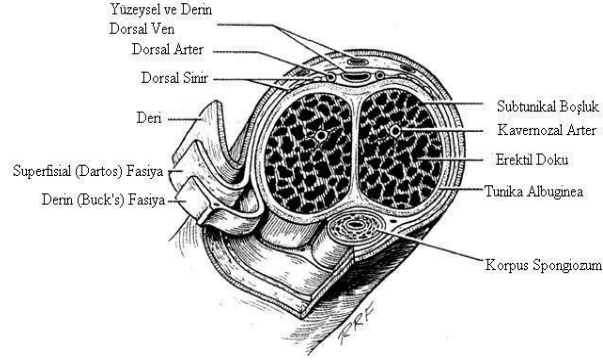
Şekil 2: Ekdodermal penetrasyon ve endodermal transformasyon teorisi

2.6. ANATOMİ

2.6.1. Penis

Penis anatomisi, penis ucundan perineuma dek uzanan korpus penis ve perineumda sabit olarak bulunan radiks penis olmak üzere 2 bölüme ayrılarak incelenir. Penis, bir çift erektile doku olan korpus kavernozum ve bir adet süngerimsi yapıdaki korpus spongiosumdan oluşur. Korpus kavernozumlar dorsalde, korpus spongiosum ve içerisindeki üretra, ventral yüzde yer alır (46). Penisin tabakaları dıştan içe doğru; deri, superfisyal tabaka (dartos tabakası), Tela subfasyalis (eberth tabakası), Buck's fasyası, tunika albuginea şeklindedir. Bu 3 silindirik yapının üzeri elastik liflerden zengin, düzensiz yapıda, gevsek konnektif bir fasya olan tunica

albuginea ile örtülüdür. Tunica albuginea dışında Buck's fasyası yer alır (Şekil 3) (47).



Şekil 3: Penisin enine kesiti

Penis derisi, bez ve kıl yapısı içermez, elastik yapıdadır ve vücudun diğer yerlerindeki deriye göre daha koyu renklidir. Koronanın tabanında smegma oluşturan bez yapıları bulunur. Deri altı yağ dokusu içermez. Ventral yüzde uzunlamasına seyreden kaynaşma çizgisi raphe penis olarak adlandırılır. Penis derisi, penis ucunda kendi üzerine kıvrılır ve prepüsyum penisi (sünnet derisi) oluşturur (48).

Buck's fasyası dorsalde her iki korpus kavernoza, ventralde korpus spongiosuma da çevreler. Buck's fasyasının lifleri; proksimalde rektus kasının lifleri ile birleşir ve penisin fundiform ligamanını, distalde pubisten gelen lifler ile birleşerek penisin suspansuar ligamanını oluşturur. Perinede Buck's fasyası, tunika albuginea ile birleşir ve erektile dokunun kas yapısına dek uzanır. Koronada glans penisin tabanı ile birleşir (49).

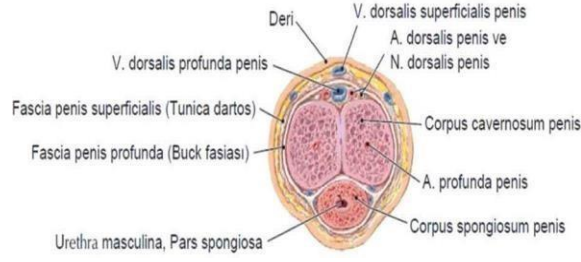
Tunica albuginea, kollajen ve elastik liflerden oluşur ve penise elastikiyet, dayanıklılık ve sertlik kazandırır. Tunika albuginea 2 tabakadan oluşur. Sirküler iç tabaka korpus kavernoza içinde radyal olarak dağılarak ve erektile dokuyu ve septumu destekleyen sütunları meydana getirir. Dış longitudinal tabaka, glans penisten proksimal kruraya dek uzanarak saat 5 ve 7 hizasında ramus pubik inferiora yapışır. Korpus spongiosumun, ereksiyon sırasında basıncının korpus kavernoza'dan daha düşük olmasının sebebi tunika albugineanın radyal dağılımıdır (50). Korpus kavernoza'lar; bir septumla birbirinden ayrılırlar ve iskiopubik

ramusun altında ayrı olarak bulunurlar ve pubisin penil hilum bölgesinde birleşerek penis saftını oluşturturlar. Tunika albugineadan gelen longitudinal lifler, fibröz ağ, periarteriyel ve perinöral fibröz kılıflardan oluşan fibröz bir yapıya sahiptirler (51). Korpus spongiosum ventralde yerleşmiştir. Penis bulbusundan sonra incelir ve genişleyerek glans penisi oluşturur. Yapısı korpus kavernoza benzerdir ancak, tunikası daha incedir ve yalnızca sirküler liflerden oluşur (49).

2.6.1.1. Penisin kan damarları

Penisin arteriyel kanlanmasını; *a. pudenda internanın* dalları olan *a. dorsalis penis*, *a. profunda penis*, *a. bulboüretralis* sağlar. *A. femoralisin* dalları olan *a. pudenda eksternaların* yüzeysel ve derin dalları, *a. pudentalis internanın* dalları ile anastomozlar yaparak da penis derisini beslerler. Glans ve üretranın damar yapısı oldukça zengindir ve bu durum üretra rekonstrüksiyonunu kolaylaştırmaktadır. Penisin arteriyel yapısı sıklıkla varyasyon göstermektedir. Kavernoza arter tek olarak görülebilir. Bunun yanında, penil arter pudental arterin daha proksimalinden, obturator veya inferior vezikal arterden de köken alabilir.

Penisin; *v. profunda penis*, *v. dorsalis penis superfisialis* ve *v. dorsalis penis profunda* olmak üzere 3 adet veni bulunmaktadır. *V. dorsalis penis superfisialis*, *v. saphena magna*'ya drene olur. Buck's fasyası derindeki ven ağı ve korpus kavernozaumlardan çıkan emisser venler ile çok sayıda sirkumfleks penil ven, *v. dorsalis penis profunda*'ya drene olur. Korpus kavernozaumları ve korpus spongiosumu drene eden venler, pudental pleksusa drene olur. Ön ve arka üretral venler distal üretrayı drene eder. Üretral venlerin ön grubu, posterior emisser venler ile birleşerek sirkumfleks venöz grubu oluşturur. Penisin cilt ve cilt altının venöz dönüşü, superfisiyal dorsal ven ile safen vene drene olmaktadır (52).



Şekil 4: Penisin arter ve ven görüntüsü, korpus kavernozum ve spongiozumlarla ilişkisi (53)

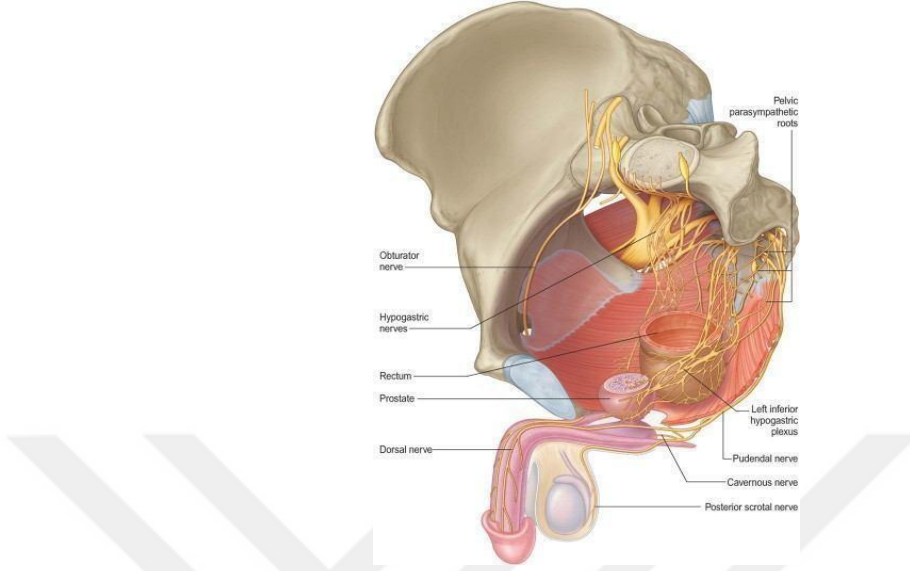
2.6.1.2. Penisin lenfatikleri

Glans ve distal üretranın lenfatik drenajı, derin inguinal ve eksternal iliak lenf bezlerine; korpus kavernozum ve proksimal üretranın drenajı ise internal iliak lenf bezlerine olmaktadır. Penil cildin lenfatikleri de süperfisiyal inguinal lenf bezlerine boşalmaktadır (54).

2.6.1.3. Sinirler

Penisin inervasyonu otonom ve somatik yolla olmaktadır. Spinal kord ve periferik gangionlardan kaynaklanan parasempatik ve sempatik lifler, korpus kavernozum ve spongiozuma kavernoza sinir aracılığıyla ulaşır. İskiokavernoza ve bulbokavernoza kas kasılması ve penil duyunun iletilmesi somatik sinirlerle sağlanır. Sempatik sinir lifleri; alt torasik ve üst lomber bölgeden kaynaklanarak aortik bifurkasyonun altında, süperior hipogastrik pleksusu (presakral sinir), daha ileride rektumun yan kenarlarında inferior hipogastrik pleksusu (pelvik pleksus) oluşturur. Pelvik pleksustan kaynaklanan lifler; penis, rektum ve alt üriner sistemi inerve eder. Pelvik pleksustan sonra korpus kavernozumları inerve eden lifler, kavernoza sinir olarak adlandırılır. Somatosensoriyel lifler; penis cildi, glans, üretra ve korpus kavernozumdan başlar ve penisin ana duyu siniri olan dorsal sinirini meydana getirir. Diğer sinir liflerinin eklenmesiyle de pudental sinir adını alır. Pudental sinir;

ağrı, ısı ve dokunma duyusunu iletmektedir. Parasempatik lifler, S2-4'den köken alarak ve pelvik pleksus aracılığıyla vazodilatasyon oluşturur (Şekil 5) (55,56).



Şekil 5: Penis inervasyonu

2.6.2. Üretra

Erkek üretrası, idrar ve seminal sıvının dışarı atılmasını sağlayan ürogenital duktus yapısındadır. Anterior ve posterior üretra olmak üzere 2 bölüme ayrılır. Posterior üretra, mesane boynundan prostatik üretra olarak başlayarak prostata uzanır ve verumontanum distalinde sona erer. Verumontanum ortasında yer alan yan yana üç delikten, ortadaki delik kör bir boru şeklindedir ve *utrikulus prostatikus* adını alır. Embriyolojik olarak müllerian kanaldan kaynaklanır (57). Ejekulatuar duktuslar utrikulun iki yanına açılır. Membranöz kısım, prostat apeksi ile korpus spongiosum arasında yer alır. En kısa ve dar üretra bölümüdür. Dorsoventral yönde genişleyerek *fossa navikularisi* oluşturur (58).

2.7. HİPOSPADİAS ANOMALİSİ

2.7.1. Hipospadias Klinik

Hipospadias erkek genital sisteminin konjenital bir defektidir. Anterior üretranın tam gelişmemesi ile ortaya çıkan ventral penis anomalisidir. Hipospadias kelimesinin kökü, eski Yunanca'daki altında anlamındaki hypo ve yarık fissür anlamındaki spadon sözcüklerine dayanır. Hipospadiasta; üretral eksternal meatus, penisin ventral yüzünde glansın altından perineye dek herhangi bir yerde bulunabilir (59). Fizik muayenede üretral meatusun yerinin saptanması dışında; kordi deformitesinin varlığı ve derecesi, penil torsiyonun varlığı, üretral meatusun distalindeki derinin mobilitesi ve kalınlığı, penis ve glansın büyüklüğü, testislerin yerleşimi ve büyüklüğüne dikkat edilmesi gerekir. Hipospadias anomalisi, anatomik olarak çeşitli yapısal farklılıklarla birlikte görülür ve değişik derecelerde üretra ve korpus spongiosum yetersizliği sonucu oluşmaktadır. Hipospadias anomalisinde ventral yüzdeki cilt incedir ve eksiktir. Dorsalde sünnet derisi, glans üzerinde şapka gibi durur. Megameatus intakt prepisyum anomalisinde, prepisyum derisi normal görünümündedir ve üretral meatus balık ağzı görünümündedir. Bazı olgularda, glans üzerinde ektopik meatusun kör sonlanması, normal meatusu taklit eder ve ventral prepisyum derisinin eksikliği, hipospadias olduğuna dair tek ipucu olarak görülür. Penisin öne doğru eğrilmesi olarak kliniğe yansıyan kordi deformitesi; cilt altı, yüzeyel ve derin fasya, korpus spongiosum ve korpus kavernozumlardaki yapısal bozukluklardan kaynaklanır ve olguların ¼ ünde değişik derecelerde mevcuttur (11). Kordi, penil ereksiyon ile daha belirgin hale gelir veya sadece penil ereksiyon varlığında fark edilebilir. Kordi, hipospadiasın ağırlığına göre değişik derecelerde görülmektedir. Distal hipospadiasların yaklaşık %10'unda, proksimal hipospadiaslı olguların ise %50'sinden fazlasında, 30°'den fazla eğrilik görülmektedir (59). Hipospadiaslı çocuklar, üretral meatusun anormal lokalizasyonu ve stenoza yatkınlık sebebiyle, kordi deformitesinden bağımsız olarak işemeyle ilgili sorunlar yaşarlar. Bu sorunlar işeme kalibrasyonunun ince olması ve aşağı doğru işeme olarak adlandırılabilir. Kordi varlığında hipospadiaslı çocuklar, ereksiyon sırasında ağrı

duyduklarını belirtirler. Penil eğrilik düzeltilmediği takdirde, erişkin yaşlarda cinsel ilişki ve fertilizasyonla ilgili sorunlar da yaşanabilir. Bunlara ek olarak; dorsalde toplanmış sünnet derisi, yassı görünümde glans ve öne doğru bükük bir penisin sebep olduğu kozmetik görünüm, çocuğun psikoseksüel yaşamını olumsuz etkileyecektir. Penis boyunun kısa olduğu durumlarda, preoperatif testosteron uyarısından yararlanılabilir. İntramüsküler testosteron veya İnsan Koryonik Gonadotropin kullanılması, penisin boyunun ve derisinin uzamasını sağlamakta ve ameliyat sonuçlarını olumlu etkilemektedir (60). Hipospadiaslı olguların, üretral meatusları normal lokalizasyonuna getirilinceye kadar sünnet edilmemeleri çok önemlidir. Meatusu normal lokalizasyonda, ancak ‘yarım sünnetli’ veya ‘peygamber sünnetli’ doğan bebekler de, kordi deformitesi açısından değerlendirilmelidir.

2.7.2. Tarihçe

Hipospadias ameliyatını tarihte ilk kez milattan sonra I.ve II. yüzyıllarda yaşayan İskenderiyeli cerrahlar Heliodorus ve Antyllus tanımlamıştır. Üretral meatusun, penisin ventral yüzünde yerleşimini tanımlamak amacıyla hipospadias terimini ilk kez milattan sonra II. yüzyılda Galen ve Pergamon kullanmışlardır (60). İlk kez Galen deformitesinden bahsetmiş ve aynı tarihlerde Romalı bir cerrah olan Oribasius, hipospadiasın üriner sistem problemleri ve cinsel ilişkide güçlüğüne sebep olduğunu ifade etmiştir. Hipospadias anomalisi, glans penisin üretral meatusa dek ampute edilerek tedavi edilmesi gereken bir cerrahi hastalık olarak tanımlanmıştır.

19. yüzyılda Amerikalı cerrahlar Mettauer ve Bushe tarafından bir trokar yardımıyla meatus ve glansı içeren bir kanal oluşturma tekniğine dek, hastalığın cerrahi tedavisinde belirgin bir gelişme olmamıştır. Benzer bir teknik 1837’de Dieffenbach tarafından da tanımlanmış ancak başarılı bir tedavi sağlanamamıştır (61). 1874’te Anger Thiersch tarafından epispadias tamirinde kullanılan lateral deri flepleriyle, neoüretra tübularizasyonu tekniğiyle penoskrotal hipospadiası başarıyla tedavi etmiş ve bu teknik hipospadias cerrahisinde yeni bir dönemi başlatmıştır. Duplay 2 aşamalı tekniği tanımlamış ve ilk aşamada glanüloplasti ve kordi düzeltilmesi, 2. aşamada lokal deri fleplerini kullanarak bir kateter üzerinden üretrayı tübularize etmiştir. 1950’lerde kullanımı yaygın olan gömülü şerit-buried strip tekniği Denis Browne

tarafından tanımlanmıştır. 1896 yılında Hook, vaskülarize prepusyal flep kullanmış ve prepişyumun dorsal yüzünden hazırladığı flepleri, glans ucundan proksimale doğru tübularize etmiştir (62). Serbest deri grefti ilk kez 1897’de, Nova-Josserand tarafından kullanılmış ve 1961’de Devine ve Horton tarafından popülerize edilmiştir (63). Neoüretra oluşturmak amacıyla; safen ven, üretra ve apendiks kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Mesane mukozası ve yanak-dudak içi mukozadan hazırlanan fleplere, prepüsyal fleplerin yetersiz olduğu primer hipospadias onarımı sırasında veya nüks hipospadias olgularında ihtiyaç duyulabilmektedir. Mesane mukozası ilk kez 1947’de Memmelaar, bukkal mukoza ise 1942’de Humby tarafından kullanılmıştır. Bukkal ve yanak içinden hazırlanan mukozal greftler ince olması sebebiyle, difüzyonla beslenmesinin vaskülarizasyonu diğer greftlere göre daha iyi olmaktadır (64). Prepişyum ve meatal tabanlı vaskularize fleplerin kullanılmasıyla son 30-40 yıl içerisinde hipospadias cerrahi tedavisinde hızlı gelişme kaydedilmiştir. Günümüzde en ağır hipospadias formları bile Mathieu, Barcat, Mustarde, Fuqua, Horton, Snodgrass ve Duckett gibi cerrahların geliştirdiği tek aşamalı tekniklerle başarıyla tedavi edilebilmektedir.

2.7.3. Eşlik Eden Anomaliler

Hipospadiasla birlikte en sık görülen anomaliler %7-13 inmemiş testis ve %9-15 sıklığında inguinal hernidir (66). Proksimal hipospadiasla birlikte, inmemiş testis ve inguinal herni görülme sıklığı artmıştır. Proksimal hipospadiasa, doğumsal ve edinsel inmemiş testis eşlik edebilir (67). Penoskrotal ve perineal hipospadias olguların inmemiş testis varlığının yaklaşık %25’inde, interseks anomalisi olabileceğini düşündürür ve endokrinolojik değerlendirme önerilir (68). Posterior hipospadiaslı çocuklarda, yaklaşık %11 belirsiz cinsiyet (gonadal disgenezi ve gerçek hermafroditizm) ve fallus varlığı görülebilir (69).

Anterior hipospadiaslı olgularda %1, posterior hipospadiaslı olgularda %5 oranında vezikoüreteral reflü (VUR), hidronefroz, üreteropelvik bileşke darlığı, pelvik veya atnalı böbrek, rotasyon anomalileri gibi üst üriner sistem anomalileri görülebilir, ancak semptomatik hasta sayısı fazla değildir (66). Hipospadiasin

derecesi ile görülen ek anomaliler arasında doğrudan ilişki vardır. Anterior ve orta hipospadias sıklıkla izole anomaliler olarak görülürler (70).

Müllerian kanalının embriyonik kalıntısı olan prostatik utrikul, genellikle hipospadias, inmemiş testis ve renal agenezi ile birlikte görülür. Cinsel gelişim bozukluğu olan olgularda %11, perineal hipospadiaslarda %50 sıklıkta görülebilmektedir (71).

2.7.4. Cerrahi Tedavi Zamanı

Hipospadias tanılı olgular 6-24 ay arasında opere edilmelidir (14). Hipospadias tipi, kordi derecesi, penis büyüklüğü ve prepisyum uzunluğu operasyon zamanı kararını etkileyen faktörlerdir. Kordinin ağır olduğu ve greft kullanımını gerektirecek olgular 1-2 yaş arasında opere edilmelidir. Postoperatif fistül gelişmesi durumunda veya ikinci bir onarım gerektiren ağır olgularda, operasyon en erken 6 ay sonra yapılmalıdır (72). Küçük bebek ve çocuklarda, daha ileri yaşlarda yapılan onarımlarla kıyaslandığında; ameliyat sonrası bakım kolaylığı, daha az anksiyete ve kateterin daha kısa sürede çıkarılabilmesi sebebiyle komplikasyon oranı daha düşüktür. Operasyon 2 yaşına dek yapılamazsa, sosyal ve psikolojik sebeplerle operasyon en geç okul öncesi dönemde yapılmalıdır. Okul çağında hipospadiaslı çocukların atipik cinsiyet davranışı gösterdikleri bildirilmiştir (73).

2.7.5. Cerrahi Tedavi

Hipospadias onarımı; cinsel ilişki için düz bir penis oluşturulması, üretral meatusun glansın ucuna taşınması, simetrik ve konik bir glans oluşturulması, normal ereksiyon ve işeme, normale yakın kozmetik görünümü amaçlar.

Hipospadias cerrahisinin aşamaları; ventral eğriliğin düzeltilmesi, üretroplasti, neoüretra ile deri arasına destek doku getirilmesi, prepisyumun çıkarılması ve rekonstrüksiyondan oluşmaktadır.

2.7.5.1. Ameliyat yönteminin seçilmesi

Hipospadias deformitesinde; üretral meatus, penisin anatomisi ve glans çok geniş bir fenotip spektrumunda herhangi bir yapıda olabildiği için, tanımlanmış pek çok başarılı cerrahi teknik mevcuttur. Deformitenin tipine göre her hastada farklı olmak üzere, en iyi sonucu vermesi beklenen cerrahi yöntem tercih edilmelidir. Tercih edilecek operasyon türüne her hastada; kordi varlığı, eksternal üretral meatus lokalizasyonu, prepüsyal derinin uzunluğu, penis ventral yüzündeki derinin kalitesi, glansın büyüklüğü, distal üretra çevresinde korpus spongiosum ve destek dokuların yeterliliği gibi parametreler değerlendirilerek karar verilmelidir (74).

Kordinin eşlik etmediği veya çok hafif olduğu distal hipospadiaslı olgularda hangi cerrahi tekniğin uygulanacağına; üretral meatusun çapı, meatus çevresindeki deri ve destek dokusunun konfigürasyonu ve glansın durumuna göre karar verilmelidir. Meatus çevresinde, iyi gelişmiş ve mobil deri olan, derin ventral oluğa sahip, distal hipospadiaslı olgularda neoüretranın perimeatal lokal deriden faydalanılarak oluşturulduğu yöntemlerin tercih edilmesi mümkündür (Mathieu, Barcat, Thiersch-Duplay veya Mustard flebi).

Üretral plak dar ise, Onlay veya Snodgrass gibi yöntemler tercih edilmelidir. Perimeatal doku yeterli kalınlıkta değil veya atrofikse neoüretra oluşturulmasında prepisyum kullanılabilir.

Üretral meatus lokalizasyonu; midpenil düzeyde yer alan olgularda seçilecek cerrahi yöntemi belirlemede, kordi derecesi, meatusun distalinde yer alan üretral plağın durumu ve proksimaldeki destek dokunun yeterliliği değerlendirilmelidir. Oluşturulacak neoüretranın etrafında sağlıklı bir anastomoz için yeterli korpus spongiosum bulunmalıdır. Meatusun proksimalindeki üretra çevresinde korpus spongiosum yoksa proksimale doğru diseke edilerek üretral meatus daha proksimale taşınabilir.

Hipospadias onarımı sırasında cerrah, seçilmiş olan cerrahi yöntemi ameliyatın herhangi bir evresinde modifiye edilebilecek ve gerekli durumlarda planı değiştirebilecek bilgi ve beceriye sahip olmalıdır.

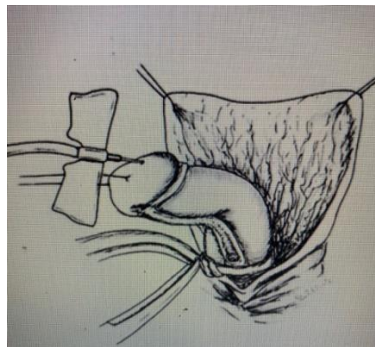
2.7.5.2. Kordi deformitesi ve onarımı

Kordi deformitesi, penisin ventral yüzünde mezenşimal dokuların gelişimindeki bozukluk sonucu ortaya çıkar. 4 ana sebebe bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

- 1- Korpus spongiosum kaynaklı santral fibröz bantlar (Distal üretrada korpus spongiosum oluşmamıştır, üretra zayıf ince yapılıdır.)
- 2- Buck's ve dartos fasyalarının kalınlaşmasından oluşan lateral fibröz bantlar
- 3- Üretra kısalığı (Korpus kavernosumların ön ve arka yüzlerinin orantısızlığı)
- 4- Cilt ve cilt altı dokuların (yüzeyel dartos fasyası) gerginliği

Kordi derecesi, hipospadiasın ağırlığına göre değişmektedir. Distal hipospadiaslı olguların %10 unda 30 derecenin altında eğrilik mevcuttur. Proksimal hipospadiaslı olguların %50'den fazlasında 30 dereceden fazla eğrilik görülmektedir (75). Fetal hayatta kordi, normal penis gelişimi sırasında görülmektedir; penil gelişimin duraksaması ile kordi arasında bağlantı mevcuttur (76).

Cerrahi yöntemden bağımsız olarak, olguların yaklaşık ¼'ünde hipospadias onarımının önemli bir bölümünü kordinin düzeltilmesi oluşturur. Eğriliğin derecesinin değerlendirilmesi ameliyattan önce tam anlamıyla mümkün olmamaktadır. Operasyon sırasında çocuk uyuduktan sonra, korpus kavernosumlar içine serum fizyolojik enjekte edilerek, artifisyonel ereksiyon oluşturularak kesin değerlendirme yapılır (Şekil 6).



Şekil 6: Artifisyonel Ereksiyon

Eğrilik; cilt ve cilt altı fibrotik dokulardan kaynaklanıyorsa, deri ve dartos fasyasının penoskrotal bileşkeye dek serbestleştirilmesi ile giderilebilir (77). Düzelmeyen; distal hipospadiaslı olgularda, yüzeysel dartos fasyası her iki yandan üretral meatusun proksimaline dek rezeke edilebilir ya da 2 seanslı onarım planlanan proksimal hipospadiaslı olgularda, üretral meatusun proksimalindeki deri ve daha derin dokular transvers kesilip, Henineke-Mikulicz yöntemiyle vertikal dikilebilir.

Tunica albugineanın; penisin ventral ve dorsal yüzlerindeki gelişim farkından kaynaklanan korpus kavernosumların orantısızlığına bağlı kordillerin düzeltilmesinde, tunica albuginea plikasyonu (TAP), Nesbit prosedürü, Dorsal orta hat plikasyonu (Şekil 7), Korporal rotasyon, penisi parçalara ayırmak, deri ve tunica vaginalis greftigibi yöntemlerden yararlanılabilir.



Şekil 7: Dorsal orta hat plikasyonu: Buck's fasyası eğriliğin en fazla olduğu yerden orta hatta kesilir. 6/0 Polydioksanone (PDS) dikiş ile onarılır (78).

2.7.6. Hipospadias Cerrahisi

Hipospadias tedavisinde tek bir standardize yöntem olmamakla birlikte cerrahi onarımın amaçları; kordinin düzeltilerek penisin düzleştirilmesi, meatusun anatomik olarak glans ucuna doğru taşınması, konik glans, normal bir ereksiyon ve işeme fonksiyonunun kazandırılması, kozmetik ve simetrik görünütünün oluşturulması şeklinde sıralanabilir. Temel olarak hipospadias cerrahisi; ventral

eğriliğin düzeltilmesi, üretroplastinin gerçekleştirilmesi, neoüretra ve üstünde kalan deri arasına doku getirilmesi, prepüsyumun uzaklaştırılması ve yeniden yapılandırılmasını içerir. Bu operasyon için birincil hedefler; düzgün konumlandırılan üretral meatus ile hastanın ayakta idrar yapabilmesi, uniform kalibrasyon ve düzgün görünümlü bir penis ile yeterli neoüretranın sağlanması ve olabilecek en az komplikasyonla hastayı tedavi edebilmektir (79,80).

Operasyon öncesi değerlendirme sonucu; hastada kordinin olup olmaması durumu, meatusun yerleşim yeri ve genişliği, ventral cildin kalınlığı, prepüsyal derinin yeterliliği ve üretra etrafındaki korpus spongiosumun durumu gibi faktörler göz önünde bulundurularak operasyon yöntemine karar verilir. Literatürde hipospadias tedavisi için bir çok yonteme rastlanmakla birlikte, bu yöntemlerden hiç biri bütün olgular için tek başına uygulanabilir değildir. TIPU, Mathieu ve MAGPI gibi metotlar distal hipospadias olgularında tercih edilirken, 2 aşamalı operasyonlar da perineal veya penoskrotal hipospadias olgularında kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak; ağır hipospadias veya kordi durumunda, kordinin bütünüyle eksizyonu da önerilmektedir. Prepisyum ise, üretroplasti için kullanılabileceğinden sünnet operasyonunun kontredike olduğu söylenebilir (81).

Standart bir hipospadias cerrahisi 5 temel evreden oluşur:

2.7.6.1. Ortoplasti

Penis eğriliğinin düzeltilmesi olarak da adlandırılan bu evrede; dorsal plikasyon ile veya ventral korpus kavernozumun kesilmesi ve yeniden greftlenmesi yöntemleri kullanılır. Dorsal plikasyon metodunda; öncelikle Buck's fasyası eğriliğin en belirgin olduğu bölgenin karşısına gelecek yerden orta hattan kesilir. 6/0 Polidiokzanon (PDS) yerleştirilerek, artifisyel ereksiyon tekrarlanır ve eğriliğin kaybolup, kaybolmadığı teyit edilir. Ventral korpus kavernozumun kesilmesi yönteminde ise; eğriliğin olduğu bölgede saat 3-9 pozisyonunda ve tunica albugineaya transvers olacak şekilde bir kesi yapılır ve ardından greft yara kenarı hizasında ventral korpus kavernozum yüzeyini genişletecek şekilde dikilir (82,83).

Bu işlemler öncesinde; penisteki eğriliğin durumu artifisyonel ereksiyon gerçekleştirilerek değerlendirilebilir (84).

2.7.6.2. Üretroplasti

Hipospadias cerrahisinde en önemli evre olarak görülmektedir. Ortoplasti işlemi tamamlandıktan sonra kordinin düzeltilmesinin ardından üretroplasti işlemi uygulanır. Defektin proksimal veya distalde yer almasına bağlı olarak, üretroplasti için farklı yöntemler tercih edilmektedir. Tübülarize insize plate üretroplasti (TIPU), midpenil veya distal hipospadias vakalarında ve kordinin olmadığı veya minimal olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Özellikle bu yöntemde; deri flepleri olmadan meatoplasti yapıldığı için, normal bir kozmetik görünüme sahip vertikal yarık ile güvenilir neomeatus sağlanabilmektedir. Meatal advancement and glanuloplasti incorporated (MAGPI) yöntemi ise glanüler ve bazı koronal meatuslu vakalarda iyi bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Literatürde bu yöntemlere ek olarak başka metotlar da bulunmakla birlikte; cerrahi sırasında flep ve greftlerin enlerinin çok dar olmaması ve ince hazırlanmaları önemli görünmektedir. Ayrıca bu greftlerin yerleştirildikleri yerlerin ve üzerindeki dokuların sağlıklı olması da cerrahinin başarısını oldukça etkilemektedir (84).

2.7.6.3. Glanüloplasti

Üretral tüpün distal ucunun, glansın tam tepe noktasına gelmesi amacıyla; oluşturulan üretral tüpün glansta hazırlanan tünelden geçirilmesi veya glans kanatlarının kenarlara doğru açılıp, üretral tüpün yerine yatırılıp tekrar orta hatta birleştirilmesi işlemidir (85).

2.7.6.4. Prepisyoplasti

Ortoplasti ve granüloplastik aşamalarının ardından, çoğunlukla prepisyum cildi kullanılarak penisin ventral yüzü deri ile kapatılır. Prepisyum cildi; Byars Fleb yönteminde olduğu gibi ortadan 2'ye ayrılarak ya da Ombradenne yöntemindeki gibi düğme iliği gibi açılan prepüsiyal aralıktan glansın geçirilip ventral yüze transfer edilebilir (86). Bu işlemten önce, neoüretra üstünde yer alan sütür hattının da deepitelize bir doku ile örtmek fistül insidansının da azalmasını sağlayacaktır (87). Güncel uygulanan metotlarda; prepisyum derisinden elde edilen vaskülarize yüzeyel dartos fasyası, eksternal spermatik fasya flepleri ya da skrotumdan transfer edilen tunika vaginalisin taşınması da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (86-88).

2.7.7. Postoperatif Komplikasyonlar

Postoperatif dönemde ilk 7 ile 10 gün içerisinde olan komplikasyonlar, erken dönem komplikasyonları olarak sınıflandırılır. Bunlar; hematoma, kanama, yara açılması veya enfeksiyonu, şaft derisinde nekroz oluşması, fleb kaybı, katater ile ilgili problemler, mesane spazmları veya penil ereksiyon bozuklukları olarak sıralanabilir (89,90). Geç dönemde görülen komplikasyonlar ise; üretral darlık veya divertikülün oluşması, ürokütanöz fistül oluşumu, kordide şekil bozuklukları, meatal stenoz, üretral striktür, meatal prolapsus ve psikoseksüel problemler olarak sıralanabilir (91,92).

Geç dönem komplikasyonlarından sıklıkla karşılaşılanı, ürokütanöz fistül olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak günümüzde yeni metotların ve güncellemelerin tanımlanması, sütür için kullanılan materyallerin geliştirilmesi, artan literatür ve tecrübeler neticesinde fistül riski önceki yıllara oranla epey azalmış görünmektedir (93).

Miksiyon sırasında ıkınma veya ağrı, idrar kalibrasyonunda azalma ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları ile belirti gösteren meatal stenoz da, fistülden sonra hipospadias tedavisinde ikinci en sıklıkla karşılaşılan geç dönem komplikasyon olarak ortaya çıkmaktadır. Meatal stenoz ya da üretral striktür, neoüretanın

herhangi bir bölgesinde olabileceği gibi sıklıkla proksimal üretral anastomoz hattında veya üretral meatusta gözlenmektedir. Ardından; üretrografi, üroflowmetri veya sistoskopi kullanılarak; stenoz daha ileri şekilde değerlendirilir. Meatal stenoz varlığında ilk etapta meatal dilatasyon yöntemine başvurulurken, daha ağır olgularda meatotomi uygulanır. Stenoz, proksimal anastomozda ise; dilatasyon ya da striktürün eksizyonu gerçekleştirilirken, daha ileri durumlarda reanastomoz tercih edilebilir (94). Kronik ve progresif seyirli bir hastalık olan balanitis kserotika obliterans (BXO), meatal stenozun en sık nedeni olarak görünmektedir. BXO'ya sekonder gelişen strüktür olgularında topikal steroid kullanımı işe yarar görünmekle birlikte, çoğu vaka cerrahi ile tedavi edilmektedir (95).

Sıklıkla distal tıkanıklık ya da üretroplasti sırasında kullanılan flebin enli olmasından kaynaklanan, üretrosel ve üretral divertikül; özellikle preüsyal cilt kaynak ada flepleri ile yapılan olgularda % 4 ile 13 arası vakalarda rastlanmaktadır (96,97). Persistan kordi ise, az rastlanan bir komplikasyon olmakla birlikte; tedavi için penil deri, sünnet insizyonundan skrotuma kadar sıyrılıp, üretra korpus kavernozumlarından serbestleştirilip ve önceki cerrahiye bağlı fibrotik dokular eksize edilir. Buna rağmen; penil şaft eğriliği yeterince düzelmediyse, dorsal yüzde yapılacak tunica albuginea plikasyonu ya da ventral yüzde yapılacak olan tunica albuginea transvers insizyonu ile oluşturulan açıklık tunica vajinalis greftleri ile kapatılır (98).

Erken dönem komplikasyonlarından olan kanama ise; çoğunlukla operasyon sırasında karşılaşılan; bipolar koter, turnike uygulanması ya da adrenalinli (1/100000) tamponlarla kontrol edilebilir. Özellikle postoperatif süreçte kanama nadir görülen bir komplikasyondur (99).

2.8. YENİ-NESİL SEKANSLAMA (NEXT-GENERATION SEQUENCING, NGS)

İnsan Genom Projesi (2004) çalışmaları sırasında önceki tekniklerle çok fazla zaman ve kaynağa ihtiyaç duyması nedeniyle; daha hızlı, daha fazla ürün veren ve

daha ucuz teknolojilerin geliştirilmesi gerekmiştir. Bu nedenle aynı yıl, Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü girişimleri sayesinde, önceden kullanılan ve ilk-jenerasyon teknolojisi otomatize Sanger metodunun yerine NGS metodu bulunmuştur. Bu yöntem önceki yöntemlere kıyasla en belirgin olarak 3 majör gelişme içeriyordu. Birincisi, DNA fragmanlarının bakteriyel klonlarına ihtiyaç duymayıp, hücre gerektirmeyen (cell-free) bir sistemde NGS kütüphanesinin hazırlanması esasına dayanıyordu. İkincisi; yüzler, binlerden milyonlara kadar birçoksekanslama reaksiyonu paralel olarak yürütülebilmekteydi. Üçüncüsü ise; elektroforeze ihtiyaç duymadan sekans sonucu direkt olarak tespit edilip, baz kontrolü siklik ve paralel bir şekilde yapılmıyordu. Bu avantajlar sayesinde, NGS tüm genomu oldukça hızlı bir şekilde okunmasını sağlamış oldu. Öyle ki bu tekniğin geliştirilmesi ile birlikte, genomik araştırmaları alanında önemli bir atılım olurken, bir çok küçük laboratuvarın da genom sekanslamaya erişimini gerçekleştirdi. NGS protokolünde en temel adım; kaynak nükleik asit materyalini koruyup bir sekanslama için bir kütüphane hazırlamaktır. Birçok çeşit NGS kütüphane hazırlama tekniği olsa da, her metodun ortak noktası DNA veya RNA molekülleri veya fragmanları, platform-spesifik adaptörlerle birleşir. Öncelikle uzun DNA veya RNA molekülleri uygun ölçülere (50-500 nükleotit) bölünür ve ardından adaptörler eklenir. Ardından, iki ucunda da adaptör olan moleküller PCR yapıları ile bulunup, sekanslama için yeterli miktar elde edilir. Adaptörlerin sonlarında, kütüphane molekülünün katı bir zemine sabitlenmesini ve sonra çoğalmasını sağlayan elementler bulunur. Diğer bitişik diziler ise sekanslama için primer bölgelerini oluştururlar (100).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

S.B.Ü. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesine 2003-2020 yılları arasında başvurmuş, hipospadias nedeniyle takip ve tedavi edilen 68 hastanın kayıtları retrospektif olarak incelendi. Karyotip analizi ya da kromozomal array karşılaştırmalı *genomik hibridizasyon* (aCGH) analizi ile 46, XY kromozoma sahip olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların geriye dönük olarak; ayrıntılı fizik muayene, geçmiş hastalıkları ve operasyon öyküleri, doğum kilosu ve haftası, aile öyküsü, hormon terapisi ve de moleküler genetik analiz sonuçları incelenmiştir. Hastanemiz Tıbbi Genetik ve Çocuk Cerrahisi polikliniklerimize başvurmuş ve izole hipospadias ve genitoüriner anomalilerin eşlik ettiği hipospadiaslı hastalardan hipospadias tanısı olan ve dosyalarından verilerine ulaşılabilen tüm hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Sendromik ve tanıli genetik hastalığı olan hastalar çalışma grubuna dahil edilmemiştir. İlgili çalışma için gerekli izinler S.B.Ü. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Ayrıca, çalışmaya dahil edilen hastalardan aydınlatılmış onam formu alınmıştır.

3.1. HASTALARDAN ÖRNEK TOPLANMASI ve DNA İZOLASYONU

Çalışmaya katılan her hastadan en az 2 ml olacak şekilde periferik kan, Etilendiamintetra-asetat (EDTA) tam kan tüpüne alınıp, ticari kit ile (QIACube, Qiagen, Germany) üretici firma uygulama talimatlarına uyularak DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri dizi analizi işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ (NEXT-GENERATION SEQUENCING, NGS)

Alınan örnekteki DNA konsantrasyonunun ve miktarının yeni nesil dizi analizi (Next Generation Sequencing; NGS) işlemi için test kiti (Celeomics, Güney Kore) uygunluğunu değerlendirmek için Qubit (ThermoFisher, ABD) ile DNA ölçümü gerçekleştirilmiştir. Yeterli miktarda DNA elde edilmesinin ardından, NGS cihazı için kütüphane hazırlama aşamasına geçildi. Kütüphane hazırlamak için, Hedef Yakalama (Target Capture) yöntemi temelli NGS kiti kullanıldı. Hedef Yakalama Temelli NGS kitinin çalışma adımları; DNA fragmentasyonu ve purifikasyonu, DNA ucu onarımı (End repair), ve ardından yeniden purifikasyon, A ucu takılması (A-tailing), yeniden purifikasyon, adaptör ligasyonu, purifikasyon, indeks ile işaretleme, purifikasyon, prob hibridizasyonu, streptavidin boncuk ile hedef kütüphane seçimi ve hedef kütüphanenin amplifikasyonu, son adım olarak tekrar purifikasyon ile üreticinin önerdiği sıra ile işlemler gerçekleştirilmiş ve nihayetinde elde edilen kütüphane de NGS cihazında (MiniSeq, Illumina, ABD) çalışılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler; Genomize Seq (V.16.7) (Genomize, Türkiye) yazılımı ile analiz edilmiştir. Ayrıca değerlendirme için ClinVar veritabanı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) ve Varsome (<https://varsome.com/>) analiz aracından da yararlanılmıştır.

Çalışmaya katılan toplam 68 hastada *AMH*, *AMHR2*, *ANKR1C4*, *AR*, *ARX*, *ATRX*, *CYB5A*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *DHCR7*, *DHH*, *GATA4*, *HCCS*, *HSD17B3*, *LHCGR*, *MAMLD1*, *MAP3K1*, *NR5A1*, *OPHN1*, *SOX9*, *SRD5A2*, *SRY*, *WT1*, *ZFPM2* genlerinin kodlayıcı bölgelerine ait (± 10 baz çifti intronik dahil) analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Genetik değişimlerin patojenitesinin belirlenmesinde ACMG kılavuzu belirtilen kriterlerin skorlaması esas alınmıştır (101). NGS panelinde bulunan genler ve ilişkili olduğu hastalıklar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4: 46 XY Cinsiyet Gelişim Bozuklukları NGS Panelinin kapsadığı genler, kromozomal lokalizasyonları ve ilişkili olduğu hastalıklar (102).

GEN SAYISI	GEN	GEN AÇIK İSİM	KROMOZOMAL LOKALİZASYON	HASTALIKLAR
1	AMH	ANTI-MULLERIAN HORMONE	19p13.3	Persistan Müllerian Kanal Sendromu, Tip I, OR
2	AMHR2	ANTI-MULLERIAN HORMONE TYPE II RECEPTOR	12q13.13	Persistan Müllerian Kanal Sendromu, Tip II, OR
3	AKR1C4	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1, MEMBER C	10p15.1	46XY sex reversal 8
4	AR	ANDROGEN RECEPTOR	Xq12	- Androjen İnsensivite, XLR - Hypospadias 1, X-linked, XLR
5	ARX	ARISTALESS-RELATED HOMEODOMAIN, X-LINKED	Xp21.3	Hidrocefali - anormal genitalya, XL
6	ATRX	ATR-X GENE	Xp21.1	- Alfa Talasemi/mental retardasyon Sendromu, XLD(mikropenis, hipospadias) - Mental retardasyon-hipotonik yüz Sendromu, XLR(mikropenis, hipospadias, hipoplastik skrotum)
7	CYB5A	CYTOCHROME b5, TYPE A (MICROSOMAL)	18q22.3	Methemoglobinemi – ambigus genitalya, OR
8	CYP11A1	CYTOCHROME P450, SUBFAMILY XIA, POLYPEPTIDE 1	15q24.1	Konjenital Adrenal Yetmezlik (46,XY) Parsiyel ya da komplet, OR
9	CYP17A1	CYTOCHROME P450, FAMILY 17, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1	10q24.3	17,20-liyaz eksikliği, OR 17-alfa-hidroksilaz/17,20-liyaz eksikliği, OR
10	DHCR7	7-DEHYDROCHOLESTEROL REDUCTASE	11q13.4	Smith-Lemli-Opitz Sendromu, OR
11	DHH	DESERT HEDGEHOG SIGNALING MOLECULE	12q13.12	46XY parsiyel gonadal disgenezis, minifasiküler nöropati 46XY sex reversal 7, OR
12	GATA4	GATA-BINDING PROTEIN 4	8p23.1	Testiküler anomaliler ve/veya konjenital kalp hastalığı, OD
13	HCCS	HOLOCYTOCHROME C SYNTHASE	Xp22.2	Linear cilt defektleri with multipl konjenital anomaliler 1, XLD (hipospadias, mikropenis)
14	HSD17B3	17-BETA HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE III	9q22.32	Erkek psödohermafroditizm, jinekomasti, OR
15	LHCGR	LUTEINIZING HORMONE/CHORIOGONADOTROPIN	2p16.3	- Leydig hücre hipoplazisi, hipergonadotropik hipogonadizm, OR - Leydig hücre hipoplazisi, psödohermafroditizm, OR - LH Hormon rezistansı, OR

		RECEPTOR		• Puberte prekoks, erkek, OD
16	MAMD1	MASTERMIND-LIKE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1	Xq28	Hipospadias 2, XLR
17	MAP3K1	MITOGEN-ACTIVATED KINASE KINASE KINASE 1	5q11.2	46 XY sex reversal 6, OD
18	NR5A1-SF1	NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 5, GROUP A, MEMBER 1	9q33.3	• 46, XX sex reversal 4, OD • 46, XX sex reversal 3, OD • Adrenokortikal yetmezlik, OD • Prematur over yetmezlik 7, OD
19	OPHN1	OLIGOPHRENIN 1	Xq12	Mental retardasyon, serebellar hipoplazi, XLR (mikropenis, hipoplastik skrotum)
20	SOX9	SRX-BOX 9	17q24.3	• Akampomelik-kampomelik displazi, OD • Kampomelik displazi, OD • Kampomelik displazi, sex reversal, OD
21	SRD5A2	STEROID 5-ALPHA-REDUCTASE 2	2p23.1	Psödovaginal perineoskrotal hipospadias, OR
22	SRY	SEX-DETERMINING REGION Y	Yp11.2	46 XX sex reversal 1
23	WT1	WT1 TRANSCRIPTION FACTOR	11p13	• Nefrotik Sendrom Tip 4, OD • Wilms tumor, tip 1, OD • Denys-Drash Sendromu, OD ve SMU -WILMS TUMOR ve PSODO YA DA GERÇEK HERMAFRODITİZM NEFROPATİ, WILMS TUMOR VE GENITAL ANOMALİLER • Frasier Sendromu, OD
24	ZFPM2	ZINC FINGER PROTEIN, MULTITYPE 2	8q23.1	46 XY sex reversal 9, OD

3.3. SEKANS ANALİZİ

NGS analizi ile varyant saptanması durumunda, sanger sekans analizi ile ilgili gende varyant bölgesi sekans (dizi) analizi yapılarak doğrulama gerçekleştirildi. Sekans analizi ile değerlendirilecek bölge için, primerler kullanıldı. Otozomal resesif ve otozomal dominant kalıtılan genlerde anne ve baba dizi analizi ile, varyantın kalıtımı araştırıldı. X'e bağlı kalıtım gösteren genlerde de anne analizi yapıldı. Ailesel kalıtım saptandığında kardeş analizi yapıldı.

3.4. VARYANT ANALİZİ

Tüm varyantlar, Clinvar veri tabanında araştırıldı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Varyantların populasyon sıklığı, 1000 genom projesi ve dbSNP datalarına bakarak değerlendirildi (<http://www.1000genomes.org/>). Patojenik varyant diyebilmek için, populasyon frekansının <1% olma sıklığı arandı. İnsan Genom Varyasyon Topluluğunun belirlediği kurallara uygun olarak novel (yeni saptanan) varyant adlandırması yapıldı (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Sinonim varyantlar (aminoasit değişikliği yapmayan) değerlendirme dışı bırakıldı. Missense (kodlanan aminoasiti değiştiren), nonsense (dur kodonu oluşturarak aminoasit oluşumunu engelleyen), frameshift (gende çerçeve şeklinde okuma kaymasına yol açan), varyantlar değerlendirmeye alındı.

Novel varyant değerlendirmesinde, PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2), MutationTaster bilgisayar programları da kullanıldı. Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (ACMG) kriterlerine göre, varyantın hastalık ile olası ilişkisi araştırıldı. Aile segregasyon analizi de, novel varyant patojenite değerlendirmesinde kullanıldı.

3.4.1. Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (ACMG) kriterlerine göre varyantların sınıflandırılması

Genetik analiz yapılarak saptanan gen değişikliğinin, hastalık ile ilişkisinin yorumlanması gerekmektedir. İlk başlarda, gende saptanan değişiklikler mutasyon ya da polimorfizm olarak adlandırılıyordu. Bir varyantın mutasyon ya da polimorfizm diye isimlendirmek, varyantın hastalık açısından patojen ya da iyi huylu olarak algılanmasına sebep olur. Bu yüzden genetik analiz sonucuna saptanan gen değişikliğine “varyant” denilmeye başlandı. Varyantlar patojenik (pathogenic), muhtemel patojenik (likely pathogenic), etkisi bilinmeyen (uncertain significance), muhtemelen iyi huylu (likely benign) veya iyi huylu (benign) olarak ayrılır. Bu sayede varyantlar klinik olarak tanımlanır ve standart olarak tek bir adlandırma yapılmış olur. Varyantların yorumlanması için yardımcı birçok in silico araç kullanılabilir. ACMG’nin 2015 yılında öngördüğü kriterlere göre, varyantın klinik olarak önemini değerlendirilir (<https://www.acmg.net/>). Varyantın patojenik olması yönünde yorumlanmasını sağlayan kriterler, çok güçlü (PVS1), güçlü (PS1-4), orta (PM1-6) ve destekleyici (PP1-5) değerlendirmesidir. İyi huylu olduğu yönünde yorumlanmasına katkı sağlayan kriter, tek başına (BA1), güçlü (BS1-4) veya destekleyici (BP1-6) olarak sınıflandırılmıştır.

3.4.2. ACMG Patojenik kriterleri:

1-) Çok Güçlü Patojenite Kanıtı

- **PVS1:** Fonksiyon kaybının bilinen bir hastalık sebebi olduğu durumlarda nonsense, frameshift, $\pm 1-2$ splice bölge (ekzon intron birleşme bölgesi) başlama kodonu mutasyonları ya da birçok ekzonun delesyonu

2-) Patojeniteye Güçlü Kanıtlar

- **PS1:** Nükleotid değişikliğine bakmaksızın, aynı aminoasit değişikliğinin patojenik olduğunun daha önce bildirilmiş olması

- **PS2:** Varyantın de novo (anne ve babada varyant saptamamak) olması ve beraberinde anne baba doğrulama analizi

- **PS3:** İnvivo ve İnvitro fonksiyonel çalışmalarla, gen ürününün zararlı etkisinin gösterilmiş olması

- **PS4:** Etkilenen bireylerde varyant prevalansının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artması

3-) Patojeniteye Orta Dereceli Kanıtlar

- **PM1:** Varyantın, hot-spot noktalar ve kritik fonksiyonel alanlarda bulunması

- **PM2:** varyantın ExomeSequencing Project, 1000 Genom veya ExAC gibi büyük projelerde olmaması. Resesif kalıtılan hastalık ile ilişkili ise düşük frekansta olması

- **PM3:** Resesif kalıtılan hastalık ile ilişkili genlerde varyantın, patojenik bir varyantla trans olarak tespit edilmesi

- **PM4:** Protein uzunluğunun in-framedeletion ya da insersiyonla kısılması

- **PM5:** Aynı aminoasitde, farklı missense değişikliğin daha önce patojen olarak bildirilmiş olması

- **PM6:** varyantın de-novo olarak kabul edilmesi ancak kimerizm ile anne-babalık testinin yapılmamış olması

4-) Patojeniteyi Destekleyen Kanıtlar

- **PP1:** Hastalığa yol açtığı bilinen bir gende, etkilenen aile bireylerinde varyant olması

- **PP2:** Hastalık etiyolojisinde, missense varyantın sık olması ve benign missense varyantın nadir görüldüğü bir hastalıkta, genin missense varyantının saptanması

- **PP3:** Bilgisayar varyant patojenite hesaplama programlarında, birden fazlasında patojenite önerilmesi

- **PP4:** Hastanın fenotipi ve aile öyküsünün, hastalık ile uyumlu olması

1.) Tek değerlendirme ile benign kanaati getiren bulgu

- **BA1:** ExomeSequencing Project, 1000 Genom veya EcAC projelerinde allel frekansı %5' in üzerinde olması

2.) Benin getkinin güçlü kanıtı

- **BS1:** Allel sıklığı beklenenden daha yüksek

- **BS2:** erken yaşlarda tam penetrasyon gösteren bir hastalıkta, sağlıklı bir yetişkinde varyant olması

- **BS3:** İn vivo ve invitro çalışmalarla patojenitenin gözlemlenememesi

- **BS4:** Bir ailenin etkilenen üyelerinde varyantın olmaması

5-) Bening etkiyi destekleyen kanıtlar

- **BP1:** Hastalığın etiyolojisinden sıklıkla truncating mutasyonlar (proteinin beklenen uzunluktan kısa olması) sorumlu iken, missense mutasyon saptanması

- **BP2:** Otozomal dominant kalıtılan ve penetrasyonu tam olan bir hastalıkta, patojen olduğu bilinen bir varyant ile trans pozisyonunda olması ya da herhangi bir kalıtım modelinde patojenik varyant ile cis pozisyonunda olması

- **BP3:** Genin tekrar bölgelerinde, delesyon/ insersiyon işlemleri

- **BP4:** Bilgisayar varyant patojenite hesaplama programlarından birçoğunda, zararsız değişim olduğunun önerilmesi
- **BP5:** Varyantın, hastalık için alternatif bir moleküler yolda bulunan gende olması
- **BP6:** Birçok kaynak varyantı bening olarak belirtse de, bağımsız sonuçlar için laboratuvar bilgisi olmaması
- **BP7:** Ekzon-intron birleşim bölgesi dışında, Sinonim (sessiz: aminoasit değişikliği yapmayan) varyantın saptanması

Bu değerlendirmeler sonucunda, bir varyantın klinik ile ilişkisi hakkında fikir sahibi olunur ve varyant, elde edilen verilere göre 5 gruptan birisi olacak şekilde adlandırılır (101).

Buna göre;

- 1- Patojenik
- 2- Muhtemel Patojenik
- 3- Klinik önemi bilinmeyen (VUS)
- 4- Muhtemel benign
- 5- benign olarak sınıflandırıldı (101)

3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Çalışmanın tüm istatistiksel analizleri için IBM SPSS Statistics programı 22. sürüm programı (SPSS inc. Chicago, IL, USA) kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı verilerin istatistiksel analizinde; ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. Parametrik verilerin analizinde T-test kullanılması planırken, parametrik olmayan verilerinin analizinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arası niteliksel verilerin analizinde Kikare (χ^2) testi kullanıldı. p değeri 0,05'in altında iken istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.

BULGULAR

Çalışmamıza 2003-2020 yılları arasında S.B.Ü. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Cerrahisi, Tıbbi Genetik ve Çocuk Genetik polikliniklerine gelen, izole hipospadias ve genitoüriner anomalilerin eşlik ettiği, hipospadiaslı 68 hastanın dosyası geriye dönük olarak incelenmiştir. Bu hastalardan yaklaşık olarak % 38'i (26/68 hasta) distal hipospadias görülürken; yaklaşık olarak % 62'sinde (42/68 hasta) proksimal hipospadias kaydedilmiştir. Distal hipopadias olgularının çoğunluğunu (21/26 hasta) koronal ve subkoronal gruplar oluştururken; proksimal hipospadiaslı olgularda, olguların büyük bir çoğunluğunun penoskrotal grupta (34/42 hasta) olduğu saptanmıştır. Çalışmaya katılan hastaların yaşları 0-18 yaş arasında değişmekte olup, tüm katılımcıların yaş ortalaması $6,11 \pm 4,62$ olarak hesaplanmıştır. Hastaların; hangi hipospadias tipi ile ilişkilendirildiği ve yaş ortalamaları Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5: Çalışmaya katılan hastaların; farklı hipospadias tipleri için sayı, yaş, ilk operasyon yaşı, anne yaşı ve doğum haftası verileri

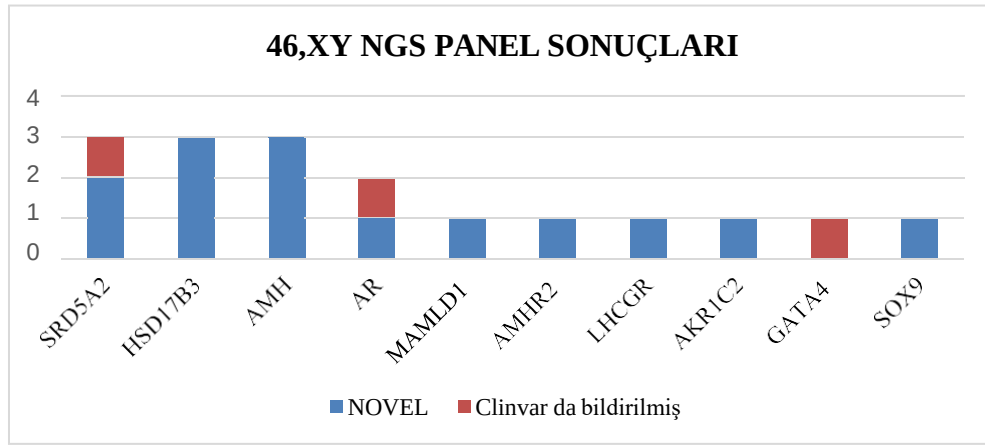
	Sayı (n)	Yaş	İlk Operasyon Yaşı	Anne Yaşı	Doğum Haftası
Distal Hipospadias	26	5,15±3,98	3,75±3,24	27,08±5,35	37,58±2,47
Glanüler	5	3,2±1,79	2,00±1,41	22,4±3,36	39,00±1,00
Koronal	10	5,6±4,06	4,29±4,03	28,0±5,87	37,60±2,07
Subkoronal	11	5,67±4,54	4,38±3,29	28,36±4,74	36,91±3,08
Proksimal Hipospadias	42	6,69±4,94	2,78±2,65	25,00±4,27	37,26±2,91
Midpenil	8	5,75±4,27	2,50±1,05	25,00±5,07	38,63±1,51
Penoskrotal	34	6,91±5,12	2,86±2,97	25,00±4,14	36,94±3,08

*veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir

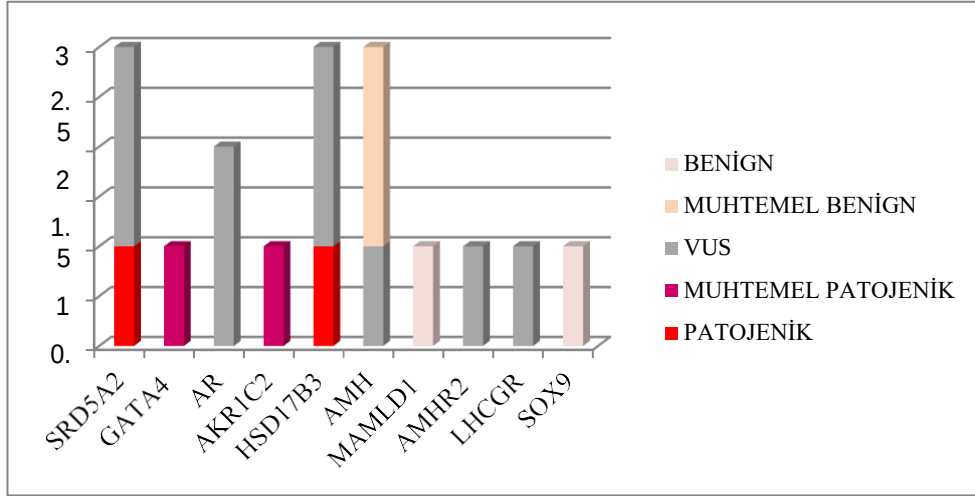
Hastaların ilk operasyon yaşları ise ortalama olarak $3,22 \pm 2,95$ olarak hesaplandı. Hastaların ilk operasyon yaşı verisi, çalışmaya dâhil edilen farklı hipospadias tipleri için Tablo 3’de gösterilmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen tüm hastaların, doğum sırasında anne yaşı ortalaması $25,79 \pm 4,78$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, tüm katılımcıların doğum haftası ortalaması ise $37,38 \pm 2,74$ olarak bulunmuştur. Hastaların farklı hipospadias grupları için; anne yaşı ve doğum haftası bilgileri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Çalışmada; 46, XY CGB gen paneli ile 15 hastada, 17 varyant saptandı (15/68 hasta; %22). 14 varyant novel iken, 3 varyant Clinvar’da daha önce bildirilmiştir (1 patojenik, 1 muhtemel patojenik ve VUS, 1 VUS). Varyant saptanan genler: *SRD5A2*, *HSD17B3*, *AMH*, *AR*, *MAMLD1*, *AMHR2*, *LHCGR*, *AKR1C2*, *GATA4* ve *SOX9* şeklindedir (Şekil 8). En sık varyant saptanan genler; *SRD5A2* (3 varyant; 3/17 hasta) *HSD17B3* (3 varyant; 2/17 hasta) *AMH* (3 varyant; 3/17 hasta) ve *AR* (2 varyant; 2/17 hasta) genleridir. Varyantların ACMG kriterlerine göre değerlendirilme sonuçları Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 8: Çalışmada varyant saptanan genler ve bu varyantların Clinvar değerlendirmesi



Şekil 9: Çalışmada saptanan varyantların ACMG kriterlerine göre değerlendirilme sonuçları

1. Olgu:

Glanüler hipospadias tanısı olan 1 yaşında olgu henüz opere edilmemiştir. Hastada *SOX9* geni heterozigot c.76A>G (p.M26V) varyantı ve *AMHR2* geninde intronik bölgede heterozigot c.853-11C>T varyantı saptandı. *SOX9* geninde saptanan missense varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre de benign olarak değerlendirildi. Hipospadiası olmayan babada da bu varyant saptandı.

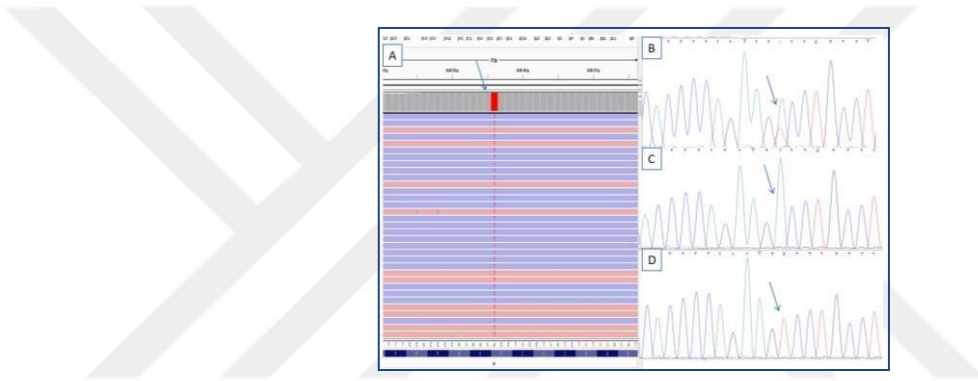
AMHR2 geni heterozigot intronik varyantı da, aynı şekilde Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre ise VUS olarak değerlendirildi.

2. Olgu:

Koronal hipospadias tanılı, 3 yaşında olan hasta, 2 yaşındayken opere oldu. Hastada *AR* geninde hemizigot c.1424C>T (p. A475V) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da VUS olarak bildirilmiştir ve ACMG kriterlerine göre de VUS olarak değerlendirildi. Aile analizinde, annede varyant heterozigot, 5 erkek karderşinden 2'sinde hemizigot olarak saptandı. Varyant saptanan kardeşlerin genital muayeneleri normaldi.

3. Olgu:

Midpenil hipospadias tanılı 1 yaşında olgu, sağ inguinal herni nedeniyle opere edildi. *AR* geninde hemizigot c.1675A>T (p. T559S) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiş. ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirildi. Hastanın 2 amcasında hipospadias olduğu öğrenildi. Aile segregasyon analizinde, anne *AR* gen analizi yapıldı. Annesinde varyant heterozigot olarak saptandı. Penis muayenesi normal olan erkek kardeşinde ise *AR* gen varyantı yoktu. Annenin 2 erkek kardeşinde hipospadias yoktu ancak bu kişilerde *AR* gen analizi yapılamadı. Olgunun hipospadias onarımı cerrahi polikliniğince planlanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10: A:3 no lu hastada *AR* geni novel hemizigot c.1675A>T (p.T559S) varyantının NGS görüntüsü. B: annede heterozigot varyant sanger analizi görüntüsü C: Sağlıklı erkek kardeş sanger analizi görüntüsü D: Hastada hemizigot varyant sanger analizi görüntüsü

4. Olgu:

Koronal hipospadias tanılı 3 yaşında olgu hasta, henüz opere olmamıştır. Hastada, *LHCGR* geninde heterozigot c.1985A>G (p.N662S) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiş. ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Hastanın hormonal değerlendirmesi normaldi. Ailede hipospadias tariflenmedi.

5. Olgu:

Koronal hipospadias tanılı 14 yaşında olguya 11 yaşında bilateral inmemiş testis tanısıyla bilateral orşiopeksi, 12 yaşında hipospadias onarımı ve 1 yıl sonra

fistül onarımı yapılmıştır. Olguda, *AMH* geninde heterozigot c.391G>C (p.V131L) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, muhtemel benign olarak değerlendirildi. Ailede hipospadias öyküsü yoktu.

6. Olgu:

Penoskrotal tanılı 10 yaşında olguya, 2 yaşında hipospadias onarımı ve 6 yaşında üretral kordi sebebiyle penil plikasyon yapılmıştır. Hastada *AMH* geninde heterozigot c.1657G>T (p.V553L) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Ailede hipospadias tariflenmedi.

7. Olgu:

Midpenil hipospadias tanılı 8 yaşında olguya; 1,2 ve 3 yaşlarında BRACA1, BRACA2 ve redoüretroplasti yapılmıştır. Olguda *AMH* geninde heterozigot c.1213G>C (p.A405P) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiş. ACMG kriterlerine göre, muhtemel benign olarak değerlendirildi. Ailede hipospadias öyküsü yoktu.

8. Olgu:

Penoskrotal hipospadias tanılı 2 yaşında olgu henüz opere edilmemiştir. Hastanın dayısında da hypospadias öyküsü vardı. Hastada *HSD17B3* geninde birleşik heterozigot c.761_762delAG ve c.860A>G varyantları saptandı. c.761_762delAG varyantı, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, patojenik olarak değerlendirildi. c.860A>G varyantı da Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirildi. Hastanın hormonal değerlendirmesi normaldi.

9. Olgu:

Penoskrotal hipospadias tanılı 17 yaşında olguya; 2 yaşında üretroplasti ve sonrasında 3,4,7 ve 10 yaşlarında toplamda 5 kez üretral dilatasyon yapılmıştır. Penoskrotal hipospadias olan hastada, *HSD17B3* geninde heterozigot c.109A>G (p.K37E) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir.

ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Genin diğer alleli normaldi. Ayrıca hastanın hormonal değerlendirmesi normaldi. Ailede hipospadias öyküsü yoktu.

10. Olgu:

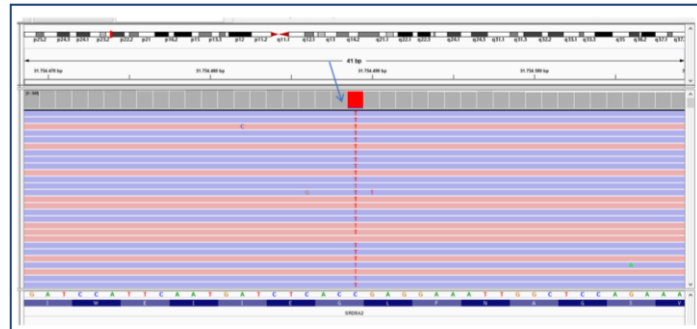
Subcoronal hipospadias tanılı 4 yaşında olguya 2 yaşında üretroplasti yapılmıştır. Hastada, *SRD5A2* geni heterozigot c.433C>T (p.R145W) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Ailede hipospadias öyküsü yoktu.

11. Olgu:

Penoskrotal hipospadias tanılı 2 yaşında olgu henüz opere edilmemiştir. Hastada, *SRD5A2* geni heterozigot c.593T>C (p.I198T) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Aile öyküsünde hipospadias tariflenmedi.

12. Olgu:

Penoskrotal hipospadias tanılı hasta henüz opere edilmemiştir. Olguda *SRD5A2* geni homozigot c.586G>A (p.G196S) varyantı saptandı (Şekil 11). Bu varyant, Clinvar'da patojenik olarak bildirilmiştir. ACMG kriterlerine göre patojenik olarak değerlendirildi. Hastada testosteron değeri yüksekti (854ng/dl). Ancak Dihidrotestosteron bakılmamıştı. Hastanın anne ve babası arasında 2. kuzen evliliği vardı. 2 sağlıklı erkek kardeşi vardı. Ailede başka hipospadias tariflenmedi. Hastanın sağlıklı 2 erkek kardeşi ve anne babasında gen sekans analizi planlandı.



Şekil 11: 12 no lu hastada *SRD5A2* geni homozigot c.586G>A (p.G196S) varyantının NGS görüntüsü

13. Olgu:

Penoskrotal hipospadias tanılı 3 yaşında olgu, henüz opere edilmemiştir. *MAMLD1* geninde hemizigot c.2486C>T (p.A829V) varyantı saptandı. Bu varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, benign olarak değerlendirildi. Ailede hipospadias öyküsü yoktu.

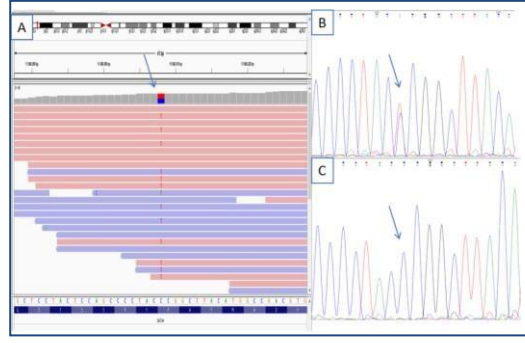
14. Olgu:

Penoskrotal hipospadias ve sağ inmemiş testis tanılı 2 yaşında hastaya 1 yaşında orşiopeksi ve 2 yaşında BRACA1. seans yapılmıştır. Hastada *MAMLD1* geninde hemizigot c.2486C>T (p.A829V) varyantı saptandı. Aile öyküsünde hipospadias tariflenmedi.

15. Olgu:

Subkoronal hipospadias tanılı 4 yaşında olgu, 3 yaşındayken opere edilmiştir. Anne babası arasında akrabalık olmayan hastanın babasında ve erkek kardeşinde de hipospadias nedeniyle operasyon öyküsü bulunmaktadır. Subkoronal hipospadias olan hastada, *AKR1C2* geni heterozigot c.158_159delAT (p.His53ArgfsTer4) varyantı ile *GATA4* geni c.487C>T (p.P163S) varyantı saptandı. *AKR1C2* geninde saptanan frameshift varyant, Clinvar'da daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Hastanın hipospadias olan babasında, kardeşinde ve genital muayenesi normal olan baba dedesinde de bu varyant heterozigot olarak saptandı.

Bu hastada diğer gen değişikliği, *GATA4* geni heterozigot c.487C>T (p.P163S) varyantı, Clinvar'da 4 yayında patojenik, 1 yayında VUS olarak bildirilmiştir ve ACMG kriterlerine göre de muhtemel patojenik olarak değerlendirildi. Hastanın babasında, *GATA4* gen sekans analizi normal olarak değerlendirildi. Annede ve hipospadias olan kardeşinde, varyant saptandı (Şekil 12).



Şekil 12: **A:** 15 no lu hastada *GATA4* geni heterozigot c.487C>T (p.P163S) varyantının NGS analizi görüntüsü **B:**Hastada *GATA4* geni heterozigot c.487C>T (p.P163S) varyantının sanger analizi görüntüsü **C:** Hastanın hipospadias olan babasında sanger görüntüsü.

Distal hipospadias olgularından 6 kişide (% 23,07) gen varyantı saptanırken; proksimal hipospadias olgularından ise toplamda 9 hastada (%21,4) gen varyantı tespit edilmiştir. Distal hipospadias grubunda gözlenen gen varyantı olgularının 1'i glanüler hipospadias grubunda, 3'ü koronal hipospadias grubunda yer alırken; kalan 2'si subkoronal hipospadias grubunda bulunmuştur. Proksimal hipospadias olgularında ise; gen varyantı tespit edilen olguların 2'si midpenil grupta yer alırken, 7'si penoskrotal grupta yer almaktaydı. Hastalarda tespit edilen gen varyantlarının sayısı ve ilgili varyantlar Tablo 6'da özetlenmiştir. Ayrıca çalışmaya katılan hastaların; hipospadias tipleri, varyant saptanan genleri, zigositeleri ve ACMG değerlendirmeleri de Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 6: Çalışmaya katılan hastaların; farklı hipospadias tipleri için gen varyantı tespit edilen hasta sayısı ve gen varyantı çeşitleri

	Gen Varyantı Tespit Edilen Hasta Sayısı/Toplam Hasta Sayısı	Gen Varyantı Çeşitleri
Distal Hipospadias	6/26	
Glanüler	1/5	SOX9 geni heterozigot c.76A>G (p.M26V), AMHR2 geni heterozigot c.853-11C>T
Koronal	3/10	AR geni hemizigot c.1424C>T (p.A475V)
		AMH geni heterozigot c.391N>C (p.V131L)
		LHCGR geni heterozigot c.1985A>G (p.N662S)
Subkoronal	2/11	AKR1C2 geni heterozigot c.158_159delAT (p.His53ArgfsTer4), GATA4 geni heterozigot c.487C>T (p.P163S)
		SRD5A2 geni heterozigot c.433C>T (p.R145W)
Proksimal Hipospadias	9/42	
Midpenil	2/8	AMH geni heterozigot c.1213G>C (p.A405P)
		AR geni hemizigot c.1675A>T (T559S)
Penoskrotal	7/34	MAMLD1 geni hemizigot c.2486C>T (p.A829V)
		MAMLD1 geni hemizigot c.2486C>T (p.A829V)
		HSD17B3 geni heterozigot c.860A>G (p.Y287C)
		HSD17B3 geni heterozigot c.761_762delAG,
		HSD17B3 geni heterozigot c.109A>G (p.K37E)
		SRD5A2 geni heterozigot c.593T>C (p.I198T)
		SRD5A2 geni homozigot c.586G>A (p.G196S)
		AMH geni heterozigot c.1657G>T (p.V553L)

Tablo 7: Çalışmaya katılan hastaların; hipospadias tipleri, varyant saptanan genleri ve zigositeleri ve ACMG değerlendirmeleri

HASTA NO	HİPOSPADİAS	GEN (kalıtım)	ZİGOSİTE	GEN VARYANTI	PROTEİN DEĞİŞİK LİĞİ	Clinvar	ACMG değerlendirme
1	Glanüler	SOX9 (OD)	Heterozigot	c.76A>G	p.M26V	novel	Benign (PP2,P3,BS1, BS2,BP6) VUS (PM2, BP4)
		AMHR2 (OR)	Heterozigot	c.853-11C>T	-	novel	
2	Koronal	AR (XLR)	Hemizigot	c.1424C>T	p.A475V	VUS	VUS (PM1, PP2,BS2)
3	Midpenil	AR (XLR)	Hemizigot	c.1675A>T	p.T559S	novel	VUS (PM1, PP2, PP3)
4	Koronal	LHCGR (OR)	Heterozigot	c.1985A>G	p.N662S	novel	VUS (PM2, PP2, BP4)
5	Koronal	AMH (OR)	Heterozigot	c.391G>C	p.V131L	novel	Muhtemel Benign (PM2, BP1, BP4)
6	Penoskrotal	AMH (OR)	Heterozigot	c.1657G>T	p.V553L	novel	VUS (PM1, PM2, PP3, BP1)
7	Midpenil	AMH (OR)	Heterozigot	c.1213G>C	p.A405P	novel	Muhtemel Benign (PM2, BP1, BP4)
8	Penoskrotal	HSD17B3 (OR)	Heterozigot	c.761_762del AG		novel	Patojenik (PVS1, PM2, PP3) VUS (PM2, PP2, BP4)
		HSD17B3 (OR)	Heterozigot	c.860A>G	p.Y287C	novel	
9	Penoskrotal	HSD17B3 (OR)	Heterozigot	c.109A>G	p.K37E	novel	VUS (PM2, PP2, BP4)
10	Subkoronal	SRD5A2 (OR)	Heterozigot	c.433C>T	p.R145W	novel	VUS
11	Penoskrotal	SRD5A2 (OR)	Heterozigot	c.593T>C	p.I198T	novel	VUS
12	Penoskrotal	SRD5A2 (OR)	Homozigot	c.586G>A	p.G196S	Patojenik	Patojenik
13	Penoskrotal	MAMLD1 (XLR)	Hemizigot	c.2486C>T	p.A829V	novel	Benign (BA1, BP1, BP4)
14	Penoskrotal	MAMLD1 (XLR)	Hemizigot	c.2486C>T	p.A829V	novel	Benign (BA1, BP1, BP4)
15	Subkoronal	AKR1C2 (OR)	Heterozigot	c.158_159del AT	p.H53RfsTer4	novel	Muhtemel Patojenik (PM2) Muhtemel Patojenik (PS1, PM2, PP2, PP3, PP5,BS4)
		GATA4 (OD)	Heterozigot	c.487C>T	p.P163S	Patojenik VUS	

Distal ve proksimal hipospadias olguları 2 grup olarak düşünülüp, gen varyantı olup olması ile ilişkisi Ki-Kare testi ile bakıldığında; hipospadiasın distal veya proksimal olması ile gen varyantı olup olmaması arasındaki ilişki anlamlı bulunamamıştır ($p=0,945$).

Hastalar eşlik eden ek patolojiler açısından da incelendiğinde; distal hipospadias olgularının sadece 2'sinde (yaklaşık %8); proksimal hipospadias grubunda ise 13 hastada (yaklaşık %31'inde) ek patoloji saptanmıştır. Ek patolojiler; hidrosel, bilateral inmemiş testis, sağ/sol inmemiş testis, bilateral intrabdominal testis olarak değişmekteydi.

Çalışmaya katılan 68 hastadan 25'i (% 37'si) henüz opere edilmemiş olup, olgulardan biri dış merkezde opere edilmiştir. Postoperatif dönemde; kliniğimizde opere olan distal hipospadiaslı olguların %4'ü (1/18 hasta) üretral dilatasyon, %8'i (2/18 hasta) fistül onarımı, %4'ü de (1/18 hasta) redoüretroplasti amacıyla reopere edilmiştir. Proksimal hipospadiaslı olguların ise %16'sında (4/25 hasta) postoperatif dönemde üretral dilatasyon ihtiyacı olmuştur. 1 olguya (%4) fistül onarımı yapılmış, 10 olguya (%40) redoüretroplasti yapılmıştır.

68 hastadan sadece 2'sinde annenin gebeliği sırasında hormon kullanımı kaydedilmiştir. Buna ek olarak; hastalar aile öyküleri açısından incelendiğinde; 10 olguda (yaklaşık % 15) aile öyküsüne rastlanmış olduğu tespit edilmiştir. Bu 10 olgunun 4'ü distal hipospadias grubunda görülmekle birlikte; 6'sı proksimal hipospadias grubunda yer almaktaydı.

Üretral meatusun normal glanüler pozisyonundan daha proksimalde; skrotum, penis gövdesi veya perine boyunca yer almasına bağlı olarak oluşan konjenital anomali hipospadias olarak adlandırılır. Hastalığın oluşmasında; endokrinal, genetik, maternal faktörler ve çevresel etkilerin rolü olduğu düşünülmektedir (103). Ayrıca; hastalığa eşlik eden mikropenis, prepusyum yetersizliği, kordinin varlığı ve korpus spongiozumdaki yapısal anomalilerle de sıklıkla karşılaşmaktadır (104). Anormal penil ve üretral gelişim ile sonuçlanan hipospadias, erkeklerde kriptorşidizmden sonra 2. en sık karşılaşılan konjenital patoloji olmakla birlikte, her 125 canlı doğumda 1 olacak şekilde karşılaşmaktadır (105). Birçok başarılı cerrahi girişim metodu geliştirilse de, hipospadias etiyolojisini anlamada henüz çok ilerleme kaydedilememiştir. Testislerden serbestlenen androjenler; eksternal genital oluşumu tamamlamak için anahtar hormonlar olmakla birlikte, bozulmuş fetal androjen etkisinin bu hastalık ile sonuçlandığının bilinmesine rağmen, bu bozulmuş etkinin izole hipospadiasa nasıl neden olduğu ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Eksternal genital yapıların oluşumunu etkileyen moleküler genetik ile ilgili elde edilen yeni bilgiler, hipospadias sebepleri ve risk faktörlerinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Aile bazlı yapılan çalışmalar neticesinde, hipospadiasta poligenik bir kalıtımının söz konusu olduğu, birçok genin ve/veya çevresel faktörün birlikte etkileşimi sonucu bu hastalığın ortaya çıktığı bildirilmiştir (106,107). CGB hastalıklarında, klinik çok değişkendir ve etiyolojisinden yaklaşık 75 gen sorumludur. Bu genler seks hormonları sentezinde rol alan ya da gonadal gelişme sürtecinde görevli olan genlerdir (108). Bu çalışmada da, erken ve geç embriyolojik dönemde görev alarak erkek tipi fenotipin gelişmesinde rol oynayan seks hormon biyosentezi ve metabolizması ile ilişkili genlerin saptanması ve hipospadias kliniği ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, hipospadias tanısı almış 68 hastanın periferik kan örneklerinde çalışılan *AMH*, *AMHR2*, *ANKR1C4*, *AR*, *ARX*, *ATRX*, *CYB5A*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *DHCR7*, *DHH*, *GATA4*, *HCCS*, *HSD17B3*, *LHCGR*, *MAMLD1*, *MAP3K1*, *NR5A1*, *OPHN1*, *SOX9*, *SRD5A2*, *SRY*, *WT1*, *ZFPM2* genlerini içeren NGS hedef gen panel analizi sonuçları, retrospektif olarak değerlendirildi ve genotip fenotip ilişkisi araştırıldı.

Çalışmamızda hastaların fenotiplerini değerlendirdiğimizde, hastalardan yaklaşık olarak %38'inde (26/68 hasta) distal hipospadias görülürken, yaklaşık olarak %62'sinde (42/68 hasta) proksimal hipospadias kaydedilmiştir. Distal hipospadias olgularının çoğunluğunu ise koronal ve subkoronal gruplar (21/26 hasta) oluştururken; proksimal hipospadiaslı olgularda, olguların büyük bir çoğunluğunun penoskrotal grupta (24/42 hasta) olduğu saptandı. Hipospadias alt tipleri ile ilgili yapılan çok sayıdaki çalışmada da bizim bulgularımızdan farklı olarak, distal (anterior) hipospadias olguların çoğunluğu (%50-70) oluşturduğu fark edilmiştir (109-111). Duckett ve ark.'ları ise; anterior, orta ve posterior olarak sınıflandırdığı hipospadias alt tiplerinin görülme oranını sırasıyla %50, %30 ve %20 olarak sıralamıştır (112). Çalışmamızda literatürden farklı olarak distal hipospadias olan hasta sayımız düşüktü. Bu oran düşüklüğünün, hipospadias tanılı hastalardan sadece genetik analizi yapılmış olan hastaları çalışmaya dâhil etmemizden kaynaklandığını düşünüyoruz.

Hipospadias olgularında meanın pozisyonu, ilgili operasyonun başarısını oldukça etkileyen ve uygun tedavi metodunun da belirlenmesine yön verdiği kaydedilmiştir. Örneğin, mea yerleşiminin daha proksimale doğru ilerlemesi, tedavinin daha kompleksleşmesine ve ilgili operasyonun başarısının düşmesine neden olduğunun iddia edildiği birçok yayına rastlanmaktadır. Snodgrass ve ark'larının 2007 yılında gerçekleştirdiği bir çalışma neticesinde; distal, midshaft ve proksimal olarak ayrılan hipospadias çalışma gruplarında, komplikasyon oranları sırası ile %2,5, %12 ve %25 olarak hesaplanmıştır (113). Bizim hasta verilerimiz göz önüne alındığında; kliniğimizde opere edilen olgularda komplikasyon görülme oranı distal hipospadiaslı olgularda %16 (4/18 hasta), proksimal hipospadiaslı olgularda ise %60 (15/25 hasta) olarak saptanmıştır. Bu hastalardan bir kez cerrahi öyküsü olan 43 hasta arasından; %28'i (19/43 hasta) ikinci bir operasyona ihtiyaç duyarken, %20 sinde (9/43 hasta) 3 ve daha fazla sayıda operasyona ihtiyaç duyulmuştur. Bar-Yosef ve ark.'ları; 34 hipospadias hastasından oluşan çalışma gruplarında, daha önce operasyon geçiren 22 hastadan 6'nın ikinci bir operasyona, 6'sının ise 3 ve daha fazla sayıda ek operasyonlara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir (114). Emir ve ark.'larına ait başka bir çalışmada ise, daha önce bir kez opere olmuş 37 hipospadias

hastasından 6'sında ve birden fazla sayıda opere olmuş 18 hastadan ise 8'inde komplikasyon geliştiği tespit edilmiştir (115).

Çalışma verilerimiz değerlendirildiğinde, çalışmaya katılan hastaların ilk operasyon yaşları ortalama olarak $3,22 \pm 2,95$ olarak hesaplandı. Daha önce yapılan çalışmalar neticesinde, erkek çocuklarının genital organlarının farkına varma yaşı 3 ile 5 yaş arası olarak bulunmuştur. Eğer ailede kendinden daha büyük bir erkek çocuğu varsa, bu farkındalığın daha önce oluştuğu kaydedilmiştir (116). Hipospadias cerrahisi zamanlaması için ise; hastanın penis boyu, anestezi riski, psikolojik olarak etkilenmesi gibi birçok unsur dikkate alınır. Çocuk hastalarda, anestezi için risk 6 aydan sonra erişkinlerle benzer olurken, penis boyu da 1 yaş civarında ortalama olarak, okul öncesi çocuğun penis boyundan yaklaşık olarak 0,8 cm kadar kısa olması nedeniyle cerrahi açısından risk oluşturmaz (117). Anestezi ve hipospadias cerrahisinde tekniklerin artması, pediatriye sağlanan geniş hareket alanı ile birlikte ebeveynin çocuk ile birlikte kalabilmesi sayesinde çocuk hastada ayrılma anksiyetesi problemi aşıldı ve Amerikan Pediatri Akademisi hipospadias cerrahisinin 6-12 ay ya da 4 yaşın üzerinde gerçekleştirilmesi gerektiğine karar verdi (118).

Çalışma verilerimize bakıldığında 68 hasta katılımcıdan 15'inde (%22) hipospadiasa ek olarak; hidrosel, bilateral inmemiş testis, sağ/sol inmemiş testis, bilateral intrabdominal testis patolojilerinin de bulunduğu fark edildi. Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde Bizim çalışmamızda tüm katılımcıların doğum haftası ortalaması ise $37,38 \pm 2,74$ olarak bulundu. Çalışmamızda sağlıklı bireyler için verilerin olmaması nedeniyle, gestasyon yaşı ve ek patolojilerin bulunma durumunun hipospadias ile ilişkisini inceleme olanağımız olmadı.

Androjen ve östrojen sentezini bozan, androjen reseptörü (AR) antagonisti, 5α redüktaz inhibitörleri, steroid hormon sentezindeki enzimlerin inhibitörleri, seksüel farklılaşma sırasındaki sinyal yollarındaki bozukluklar gibi deneysel olarak indüklenen ortamların hipospadiasa neden olması ile hastalığın altında yatan biyokimyasal ve genetik süreçler daha iyi anlaşılabilmiştir (119,120). Bunlara ek olarak; 2 çalışma gebeliği süresince progestin kullanan annelerin bebeklerinde hipospadias riskinin 2 katına çıktığı kaydedilmiştir (121,122). Bizim çalışma grubumuzda sadece 2 annenin progestin kullandığı fark edildiğinden dolayı, gebelik

sırasındaki hormon kullanımı ile hipospadias ilişkisi hakkında bir yorum yapabilmemiz mümkün olamamaktadır.

Hipospadiasın yüksek bir ailesel insidansı olduğu yapılan çalışmalar ile gözlenmiş ve poligenik kalıtımın olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da hastalar aile öyküleri açısından incelendiğinde; 10 olguda (yaklaşık olarak % 15) aile öyküsüne rastlanmış olduğu tespit edilmiştir. Poligenik kalıtımın söz konusu olduğu hipospadiasta ailesel olguların incelendiği çalışmalar, hafif ve izole hipospadiastan daha çok kriptorşidizm ve mikropenis ile birlikte hipospadiası bulunan hastalarda yapılmış çalışmalardır (6). Ancak ağır hipospadias olguları sıklıkla sporadik iken, hafif hipospadiasda ailesel kalıtım daha sık görülmektedir (kalfa). Hipospadias alt tiplerine bakılmaksızın ailesel olgular, yaklaşık %10 sıklıkta görülmektedir. Ollivier ve ark.'larının izole hipospadias olan 395 hastayı değerlendirdikleri bir çalışmada, pozitif aile öyküsünün %22,3 (88/395 hasta) sıklıkta olduğu saptanmıştır (118). Hipospadias tiplerine göre değerlendirdiklerinde, ailesel olgular en sık (%75) glanüler veya penil anterior yerleşimli hipospadiasta görülmüştür. Ayrıca; aile öyküsü olan bireylerde yapılan gen analizi neticesinde; 88 olgunun 5'inde (%5,68) gen varyantı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da hastalar aile öyküleri açısından incelendiğinde, literatür ile uyumlu olarak, 10 olguda (yaklaşık olarak % 15) ailede hipospadias öyküsü vardı. Ancak, çalışmamızda literatürden farklı olarak en sık proksimal hipospadiaslı olgularda aile öyküsü saptanmıştır. Bunun sebebinin hastalarımızın yaklaşık %61'inin proksimal hipospadias olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Çalışmamızda, 10 ailesel olgunun 2'sinde (%20) patojenik/muhtemel patojenik varyant saptandı. Oranımızın yüksek olmasının, ailede hipospadias öyküsü olan hasta sayımızın az olmasından kaynaklandığını olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışma hastalarımızın genotiplerini değerlendirdiğimizde; 46, XY CGB gen paneli ile 15 hastada, 17 varyant saptandı (15/68 hasta; %22). Varyant saptanan genler: *SRD5A2*, *HSD17B3*, *AMH*, *AR*, *MAMLD1*, *AMHR2*, *LHCGR*, *AKR1C2*, *GATA4* ve *SOX9* genleridir. En sık varyant saptanan genler; *SRD5A2* (3 varyant; 3/17 hasta) *HSD17B3* (3 varyant; 2/17 hasta) *AMH* (3 varyant; 3/17 hasta) ve *AR* (2 varyant; 2/17 hasta) genleridir. Saptanan varyantların 14'ü novel iken, 3 varyant Clinvar'da daha önce bildirilmiştir. Bildirilmiş olan varyantlar; *SRD5A2* c.586G>A

(patojenik), AR geni c.1424C>T (VUS) ve GATA4 geni c.487C>T (4 yayında patojenik ve 1 yayında VUS) varyantlarıdır.

SRD5A2 geninde saptanan varyantlar; c.586G>A c.433C>T ve c.593T>C varyantlarıdır. Günümüz literatüründe genler ve hipospadias arasındaki ilişki, daha çok genital tüberkül gelişimi ve seks steroid metabolizması ile ilgili olası genler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu genlerden *SRD5A2*; 5 α -redüktaz tip II kodlayan gen olup, testesteronun dihidrotesterona dönüşümünden sorumludur. *SRD5A2* geninde ortaya çıkabilecek bir defekt, steroid 5 α -redüktaz tip II enziminin etkinliğinin bozulmasına ve otozomal resesif kalıtılan Psödovaginal perineoskrotal hipospadias (MIM#264600) hastalığının ortaya çıkmasına neden olur. Günümüze kadar, *SRD5A2* geninde 120'den fazla varyant tespit edilmiştir. Bu varyantlar sıklık sırasına göre; missense (%65), küçük delesyon-insersiyonlar (%25), splicing mutasyon (%4), nonsense (%3) ve büyük delesyonlardır (%3) (İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı (The Human Gene Mutation Database), Clinvar and PubMed). Patojenik varyantlar gende en sık ekzon 1 ve ekzon 4'de görülmektedir (123). Çalışmamızda, 3 hastada *SRD5A2* gen varyantı saptadık. Hepsi missense olan bu varyantların 2'si ekzon 4'de 1 tanesi ekzon 2 deydi. Subkoronal hipospadiası olan novel heterozigot c.433C>T (p.R145W) varyantlı hastada (hasta no: 10) ve penoskrotal hipospadiası olan novel heterozigot c.593T>C (p.I198T) varyantlı hastada (hasta no: 11), genin diğer alleli normaldi. Bu 2 varyant da, ACMG kriterlerine göre, VUS olarak değerlendirildi. Ancak *SRD5A2* geni ile ilişkili hipospadias, otozomal resesif kalıtılmaktadır. Bu 2 hastada, heterozigot varyant olduğu için hastalık ile ilişkilendirilmedi. Penoskrotal hipospadiası olan diğer hastada (hasta no: 12), homozigot c.586G>A (p.G196S) varyantı saptandı. Bu varyant, hipospadias ile ilişkili olduğu gösterilmiş patojenik bir varyanttır. Hastanın kliniği ile uyumluydu. Hastanın anne ve babası arasında 2. kuzen evliliği vardı. Ailede başka hipospadias tariflenmedi.

SRD5A2 geninde hot spot mutasyon bölgeleri bildirilmiştir (124). Bu bölgeler; 196, 227, 235 ve 246aa lokuslarıdır. p.G196S, genin sık görülen patojenik varyantları arasındadır. Türkiye'den yapılan çalışmada da, androjen insensivitesi olduğunu düşündükleri (müllerian yapıların olmadığı, testisin normal olduğu 46,XY

karyotipi olan, Testesteron yüksekliği, normal ya da yüksek LH, normal FSH ve/veya testesteron/dihidrotestesteron oranı olan) 46 indeks hasta değerlendirilmiş, 6 hastada *SRD5A2* geninde patojenik varyant saptanmış ve bu varyantların 3'ünün p.G196S olduğu bildirilmiştir (125). Yine ülkemizde yapılmış başka bir çalışmada, *SRD5A2* gen varyantı saptanan 85 hastadan 13'ünün p.G196S olduğu bildirilmiştir (abacı). Bu varyantın Türk toplumunda sık görülmesinden dolayı, founder effekt (mutasyon kurucu etki) olduğu öne sürülmektedir. Çalışmamızda da *SRD5A2* geninde saptanan 3 varyanttan 1'i p.G196S idi. 44 ülkede, 5 alfa redüktaz tip 2 enzim eksikliği olan 434 hastanın değerlendirildiği çalışmada, hastalarda ortalama tanı yaşı 12.56 ± 8.41 (1 ile 47 yaş arası) olarak belirtilmiştir. Hastaların %58'i çocukluk döneminde, %25'i puberte dönemi ve %17'si erişkin dönemde tanı almış. Hastaların %69,4'ü, kız olarak büyütülmesine karar verilmiş (124). *SRD5A2* genotip- fenotip değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada, hastaların fenotiplerini Sinnecker's Score a göre değerlendirmişler. Sıklıkla, izole hipospadias gibi hafif fenotip yapan patojenik varyantlar (p.R246Q) olduğu gibi, dışı dış genital yapıya yol açabilen varyantlar da bulunmaktadır (p.G183S and p.Q126R). p.G196S patojenik varyantı olan hastalarda, fenotipin 1a-4a arasında değiştiği bildirilmiştir (124). Bununla birlikte Türkiyede 2019 yılında yapılmış çalışmada, *SRD5A2* gen patojenik varyantı olan 85 hasta değerlendirilmiş ve en sık dış genital yapı fenotipinin Sinnecker skora göre dışı dominant fenotip (4a-4b, %42,3) olduğu belirtilmiştir. Hastaların sadece %14'ünün predominant erkek (2a-2b) olduğunu saptamışlar (123). p.G196S varyantı olan 13 hastanın 11'inde dış genital yapının erkek ve predominant erkek fenotip ile uyumlu olduğu ve bu hastalardan 3'ünün Sinnecker skoruna göre 2b fenotipinde olduğu bildirilmiştir (123). Çalışmamızda *SRD5A2* p.G196S varyantı olan 1.5 yaşında tanı alan hasta Sinnecker Skorlamasına göre 2b fenotipinde idi ve hipospadias onarımı planlandı. Genetik danışma ile aileye her gebelikte %25 homozigot varyantı olan çocuk riski olduğu ve erkek hastaların etkilenebileceği anlatıldı. Ayrıca bu varyantı taşıyan hastalarda, fenotipin değişken olduğu belirtildi.

Çalışmamızda *HSD17B3* geninde saptadığımız varyantlar; c.761_762delAG, c.860A>G ve c.109A>G varyantlarıdır. *HSD17B3* geni; androstenedionun testesterona dönüşümünden sorumlu b-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 3 enzimini kodlamaktadır. Otozomal resesif kalıtılan 46, XY cinsiyet gelişim bozukluğu

hastalığından (MIM#264300) sorumludur. HSD17B3 yetmezliği ilk olarak 1971’de tanımlanmıştır. XY genotipindeki bu hastalarda; dış genital organlarda yetersiz virilizasyon, çoğunlukla dışı dış genital görünüm, klitoromegali ve/veya labial birleşme ve kör uçlu (blind-ending) vajina görülebilmektedir. Daha az sıklıkla olmakla birlikte, mikropenis veya hipospadiasın eşlik ettiği belirsiz dış genital organ görüntüleri de kaydedilmiştir. Hastaların çoğunlukla testislerinin ve normal Wolffian kanal türevlerine sahip olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, çocuklukta HSD17B3 yetmezliği klinik bulgusunun, Androjen Duyarsızlık Sendromu (AIS: Androgen Insensitivity Syndrome) olarak ele alınmasına karar verilmiştir. HSD17B3 yetmezliği çeşitli klinik fenotipler ile karakterize olup, bu durum testislerdeki HSD17B3 enziminin kısmi aktivitesine bağlanabileceği gibi, bazı hastalarda HSD17B5 gibi diğer enzimelerin androstenedionu testesterona testise ek olarak (extratesticular) üretebileceği ile açıklanmaktadır. Ancak her koşulda; HSD17B3 yetmezliği, serum androstenedion yüksekliği ve HCG (human koryonik gonadotropin) uyarımı sonrası düşük serum testesteron/androstenedion oranı ile kolayca tespit edilebilmektedir (126,127). Japonya’da gerçekleştirilen ve bu genin 6 tek nükleotit polimorfizminin (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) araştırıldığı 89 olgunun incelendiği bir çalışmada G289S, SNP ile hipospadias risk artışı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (128). Bizim çalışmamızda, 2 hastada *HSD17B3* gen varyantı saptandı. Penoskrotal hipospadias olan hastada (hasta no:9) *HSD17B3* heterozigot c.109A>G varyantı (VUS) varken, diğer allelde varyant saptanmadı. Hastanın hormonal değerlendirmesi normaldi. Penoskrotal hipospadiası olan hastada (hasta no:8), Clinvarda daha önce bildirilmemiş olan *HSD17B3* geni birleşik heterozigot c.761_762delAG (muhtemel patojenik) ve c.860A>G (VUS) varyantları saptandı. Hastada, sadece doğumdan sonra ACTH (Adrenokortikotropik Hormon) yüksekliği saptanmış, ancak tedavi uygulanmadan normale döndüğü tespit edilmiştir. Hastanın takip hormonal değerlendirmesi normal olduğu için, klinik ile *HSD17B3* gen varyantları ilişkilendirilmedi.

Hipospadias olan hastalarımızı değerlendirdiğimiz çalışmamızda, AR geninde saptanan varyantlar; hemizigot c.1424C>T ve hemizigot c.1675A>T varyantlarıdır. X kromozomu üzerinde yer alan AR ise; daha önce de bahsedildiği gibi gonadal androjenlerin biyolojik etkilerini göstermelerini sağlar (129). Bu gen,

X'e bağı resesif kalıtılan Androjen insensivite sendromu (MIM#300068) ve X'e bağı resesif kalıtılan hipospadias Tip 1'den (MIM#300630) sorumludur. AIS, 3 klinik subgruba ayrılır; komplet, parsiyel ve hafif. AR gen mutasyonu olması durumunda klinik, normal testisten kriptorşidizm, bifis skrotuma, mikrofallustan hipospadiasa kadar değişebilmektedir. Hastaların %95-97'sinde AR gen sekans anomalisi bulunurken, %3-5'inde genin büyük delesyon ve duplikasyonları klinikten sorumludur. AR gen mutasyonları, komplet AIS hastaların %65-95 kadarından, parsiyel AIS hastaların %50'den azından sorumludur. Hafif AIS olan hastalarda ise AR gen mutasyon oranı bilinmemektedir (130). 2019 yılında 80 (73'ü 46,XY, 7'si 46,XX) cinsiyet gelişim bozukluğu olan hastada, 30 geni değerlendiren NGS analizi sonucunda, 7 hastada AR gen varyantı saptanmış. Bu hastalardan 2'sinde ağır hipospadias, 1'inde ise hipospadias ve mikropenis olduğu bildirilmiştir (%4,1) (131). AR genine CAG tekrar sayısında artmanın, azalmış AR ekspresyonuna neden olduğu fark edilmiştir (132). Çalışmamızda, 2 hastada AR gen varyantı saptandı. Koronal hipospadias olan hastada (hasta no: 2) saptanan missense p.A475V varyantı, Clinvar'da VUS olarak bildirilmiş ve ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmiştir. Ancak aile segregasyon analizinde, hastanın 2 kardeşinde de bu varyant saptanmış olup, her iki kardeşin de genital muayeneleri normal idi. Clinvar da VUS olarak bildirilmiş olan bu varyantın, hastalığa yol açmadığı gösterilmiş oldu. Midpenil hipospadiası olan bir diğer hastada (hasta no:3) novel missense p.T559S varyantı (Clinvar'da bildirilmemişti) saptandı. Varyant, ACMG kriterlerine göre de VUS olarak değerlendirildi. Annede taşıyıcılık saptandı ve penis muayenesi normal olan erkek kardeşinin AR gen sekans analizi normaldi. X'e bağı kalıtılan bu hastalıkta saptanan novel varyantı değerlendirmek için, annenin 2 erkek kardeşinin analizi planlandı.

Gebelik sırasında fetal hipofiz bezinden salgılanan lüteinleştirici hormon (LH), Leydig hücrelerinden androjen üretiminin devam etmesini sağlar. Lüteinleştirici hormon/koryonik gonadotropin reseptörü (*LHCGR*) ise, her 2 hormonun da etkisini göstermesini sağlarken, bu reseptör erkek cinsiyet farklılaşmasında oldukça önemli olduğu gibi erişkin normal üreme fonksiyonunda da gereklidir (139). *LHCGR* geni, otozomal resesif kalıtılan leydig hücre hipoplazisi ile psödohermafroditizm ve hipergonadotropik hipogonadizme (MIM#238320) yol

açar. Bu genin inaktivasyon mutasyonlarında 46,XY kromozomal yapısı olanlarda, predominat dişi dış genital fenotip, kör sonlanan vajina ve bilateral kriptorşidizm, pubertede sekonder seks karakterleri gelişiminde gerilik görülür. Puberteden önce saptanan olgular, sıklıkla kız olarak büyütülür. Bu hastalığın ılımlı formunda ise, LH ve HCG hormonuna kısmi yanıtıslık vardır. Klinik, mikropenis ve/veya hipospadias şeklinde tamamlanmamış erkek seksüel diferansiasyondan, hipergonadotropik hipogonadizme kadar değişebilmektedir. CGB olan 46,XY kromozoma sahip 73 hastanın genetik analizinin yapıldığı çalışmada, patojenik *LHCGR* gen varyantı saptanmamıştır (131). Biz de çalışmamızda patojenik olduğu bilinen *LHCGR* varyantı saptamadık. Ancak koronal hipospadiası olan bir hastada (hasta no: 4), klinik önemi bilinmeyen novel heterozigot missense varyant (p.N662S) saptandı. Bu varyant VUS olarak değerlendirildi. *LHCGR* geninin sorumlu olduğu hastalıkta, otozomal resesif kalıtım söz konusu olduğu ve diğer allelde varyant saptanmadığı için klinik ile uyumlu bulunmadı.

AMH, otozomal resesif kalıtılan Persistan müllerian dukt sendromu tip 1'den (MIM#261550) sorumludur. *AMHR2*, *AMH* proteinin bağlandığı reseptördür. *AMHR2* geni de Persistan müllerian dukt sendromu tip 2 hastalığı ile ilişkilidir. *AMH*, erkeklerde, fetal yaşamdan, puberteye kadar sıklıkla sertoli hücrelerinden sentezlenir. Serum *AMH* düzeyinin saptanamaması, komplet gonadal disgenezis ve anorşidizm olgularında görülür. Feyaerts ve ark.'ları 32 hipospadiaslı çocuk ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında; 2 hastada düşük *AMH* plazma seviyelerine rastlamış ve bunun Sertoli hücre yetmezliği olarak yorumlanabileceğini iddia etmişlerdir (142). 2019 yılında yapılan 46,XY DSD (Disorders of Sex Development) olan 73 hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada, 6 hastada *AMH* geninde varyant (3 patojenik, 3 VUS) saptanmış, ancak bu hastalardan sadece birisinde hipospadias olduğunu bildirmişlerdir (143). Düşük *AMH* seviyesi ise primer testiküler disfonksiyon ve kriptorşidizm parsiyel gonadal disgenezis ve ya da santral hipogonadizm de görülür. Bu nedenle, izole hipospadias olan olgularda, *AMH* sıklıkla normaldir (141). Bizim çalışmamızda, 3 hastada *AMH*, 1 hastada *AMHR2* geninde varyant saptandı. *AMH* geni novel heterozigot c.391G>C, c.1657G>T ve c.1213G>C varyantları, sırasıyla koronal (hasta no: 5), penoskrotal (hasta no: 6), ve midpenil hipospadiası (hasta no:7) olan hastalarda görüldü. ACMG'ye göre

c.391G>C ve c.1213G>C muhtemel benign, c.1657G>T ise VUS olarak değerlendirildi. *AMHR2* novel heterozigot c.853-11C>T varyantı, glanüler hipospadiası olan hastada (hasta no:1) saptandı. ACMG'ye göre VUS olarak değerlendirildi. *AMH* ve *AMHR2* genlerinin sorumlu olduğu hastalıklar, otozomal resesif kalıtılmaktadır. Hastalarda genlerin diğer alleli normal olmakla birlikte, klinik değerlendirmesinde persistan müllerian yapılar ve testiküler anomali yoktu. Bu nedenle *AMH* ve *AMHR2* gen varyantları klinik ile uyumlu bulunmadı.

AMHR2 gen varyantı saptadığımız hastada, aynı zamanda *SOX9* geninde de heterozigot c.76A>G varyant saptandı. Y geninin cinsiyet-belirleyici bölgesi (sex-determining region, *SRY*); Sertoli hücrelerinin gelişimini indükleyerek, erkek seksüel farklılaşmasında kritik rol oynadığı bilinmektedir. *SRY* box (*SOX9*) ise; *SRY*'nin cinsiyet belirleyen sinyal yolağındaki hedeflerden biri olup, Sertoli hücrelerine-spesifik anti-Mülleryan hormon ekspresyonu ve fetal testislerde testesteron sentezinin düzenlenmesinde görev alır (136,137). *SOX9* gen mutasyonları, otozomal dominant kalıtılan kampomelik displazi ve 46,XX cinsiyet gelişim bozukluğuna yol açmaktadır. Çin'de 90 hipospadiası hasta ile yapılan çalışma neticesinde; *SRD5A2*, *AR* ve *WT1* genlerinde SNP saptanmasına rağmen; *SRY* ve *SOX9* genlerinde varyant saptanmamıştır (138). Wang ve ark.'ları; hipospadiası hastalarında rastlanan gen varyantlarının sıklıkla androjen aktivitesi ve metabolizmasını kontrol eden genlerde (*SRD5A2*, *AR*, *WT1*) görülürken; daha nadir olarak cinsiyet farklılaşmasının erken evrelerinden sorumlu olan genlerde (*SRY*, *SOX9*) de rastlandığını iddia etmişlerdir (138). Genin promotor bölge delesyon ve kopya sayısı değişikliklerinde 46,XY cinsiyet gelişim bozukluğu görülebilmektedir. Bu hastaların çoğunda dışı dış genitası görünüm bulunmaktadır. Hipospadiası ile *SOX9* gen dizi değişikliği bugüne kadar bildirilmemiştir. Çalışmamızda, glanüler hipospadiası olan hastada (hasta no: 1), *SOX9* geni heterozigot novel missense p.M26V varyantı saptandı. Aile segregasyon analizinde, hipospadiası olmayan babada da aynı varyant saptandığı ve ACMG kriterlerine göre benign olabileceği önerildiği için hastalıkla ilişkisi olmadığı düşünüldü.

Çalışmamızda *MAMLD1* geninde c.2486C>T varyantı, 2 hastada saptandı. *MAMLD1* geni X'e bağlı resesif kalıtılan Hipospadiası tip 2 hastalığından

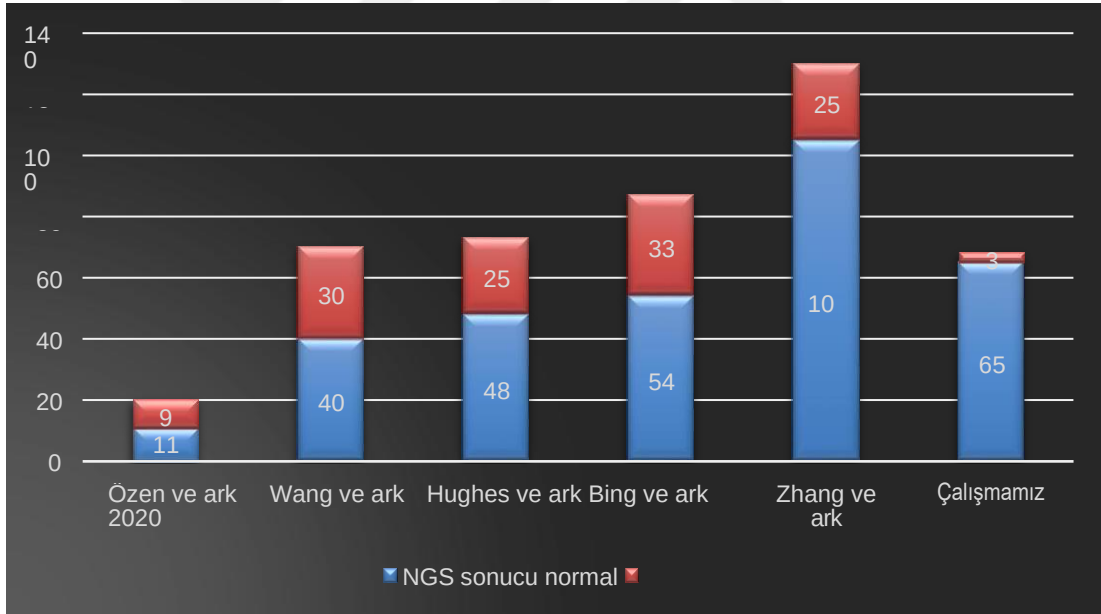
(MIM#300120) sorumludur. Bugüne kadar az sayıda (~20) gen varyantı bildirilmiştir. Hastaların çoğunda, hipospadias bulunmaktadır. Ek olarak kriptorşidizm, bifid skrotum, mikropenis, bildirilmiştir. *MAMLD1*; miyotübüler miyopatiden sorumlu gen olup, hipospadias ile ilişkisi birçok çalışmada gösterilmiştir. *MAMLD1* geni ile ilgili yapılan çalışmalar neticesinde; bu genin cinsiyet gelişiminin kritik döneminde fetal Seroli ve Leydig hücrelerinde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, hayvan çalışmalarında geçici olarak susturulan (knockdown) *MAMLD1* mRNA gen ekspresyonunun, Leydig hücrelerinde testosteron üretimini anlamlı derecede düşürdüğü kaydedilmiştir. *MAMLD1*, sterodojenik faktör (SF-1) ile birlikte eksprese olup, cinsiyet oluşumuna katılan genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Hipospadiaslı hastaların moleküler genetik analizlerinde, *MAMLD1* geninde çeşitli nokta mutasyonlarına rastlanmış olup, bunların *MAMLD1* proteini etkinliği tespit edilmiştir. Chen ve ark.'larının 99 hipospadias hastasında *MAMLD1* geninin direkt sekanslamasının araştırıldığı çalışmada, 5 non-sinonim (non-synonmous) mutasyon, 1 sinonim mutasyon ve 1 kodlama olmayan bölge (non-coding) mutasyona rastlanmıştır (133). Hughes ve ark.'larının CGB olan 80 hastada, NGS moleküler genetik analizi ile yaptıkları çalışmada, 1 hastada X'e bağlı hipospadias saptanmıştır (aile öyküsünde 2 erkek kardeş ve annede de bu variant kaydedilmiştir) (134). 46,XY CGB olan 166 hastanın değerlendirildiği çalışmada, hipospadiası olan 3 hastada *MAMLD1* geni nonsense varyantı saptanmıştır (135). Çalışmamızda penoskrotal hipospadiası olan 2 hastada (hasta no: 13 ve 14) aynı *MAMLD1* gen varyantı saptandı. Ancak ACMG kriterlerine göre, normal populasyonda da sık bulunan varyant olduğu için, benign olarak değerlendirildi.

Fetal testislerde androjen sentezi 2 metabolik yolak ile işleyebilir: ilki daha önce de bahsedilen ve testesteronun DHT'ye dönüştürüldüğü klasik yol olup; ikincisi ise "arka kapı" ("backdoor") bir yolak olan ve DHT'nin aldo-keto redüktaz ailesi 1 ile sentezlendiği ve testesteron ara ürünü kullanmayan AKR1C3, AKR1C2 ve AKR1C4 enzimlerini içeren yolaktır. *AKR1C2* geni, otozomal resesif kalıtılan 46,XY sex Reversal hastalığından (MIM#614279) sorumludur. Bu hastalıkta testisler normal ya da inmemiş testis şeklindedir. Dış genital yapıda ambigu genitalya görülmektedir. 2020 yılında yapılan, hipospadias ile *AKR1C2*, *AKR1C3* ve *AKR1C4*

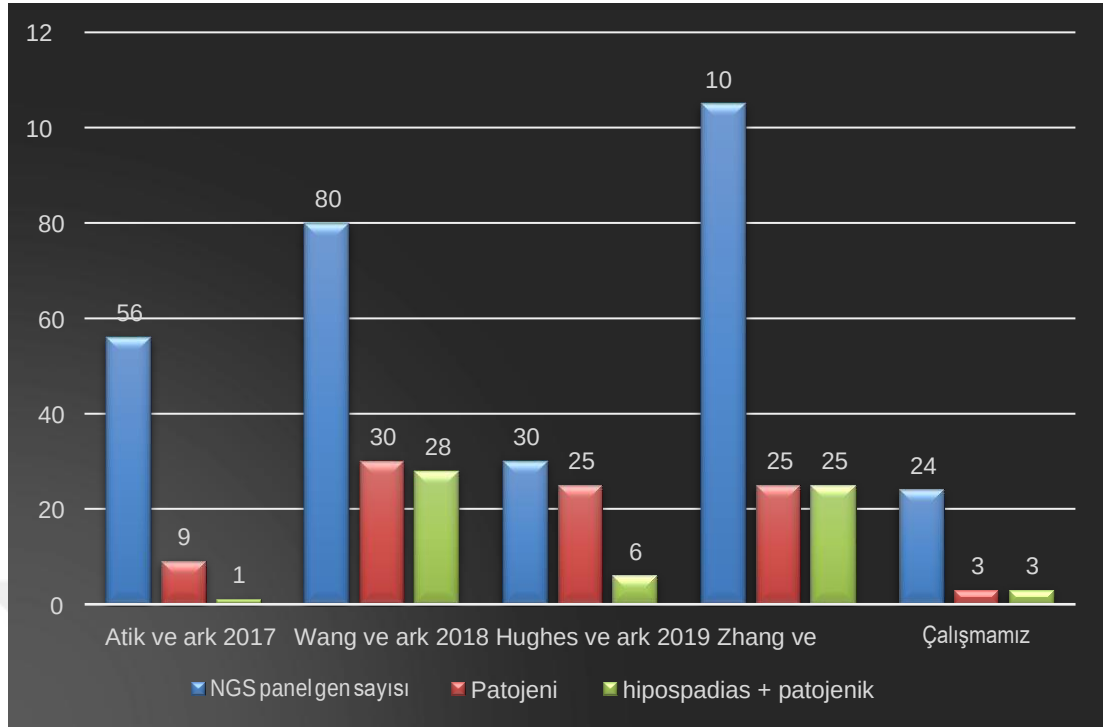
genleri ilişkisini araştıran çalışmada, bu gen patojenik varyantlarından ziyade SNP değişikliklerinin olduğu belirtilmektedir ve hastalığa yatkınlık ile *AKR1C2* gen ilişkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (144). Çalışmamızda, subkoronal hipospadiası olan bir hastada (hasta no: 15) *AKR1C2* gen varyantı saptadık. Ancak diğer allel normaldi. Hastanın hipospadiası olan babasında ve kardeşinde de aynı varyant varken, sağlıklı olan baba-dedesinde de bu varyant gösterildi. Bu nedenle hastalıkla ilişkili olmadığı düşünüldü. Bu hastada aynı zamanda, *GATA4* geni heterozigot c.487C>T (p. P163S) varyantı saptandı. Bu gen otozomal dominant kalıtılan izole kalp anomalileri (vetriküler septal defekt, atrial septal defekt, Fallot Tetralojisi) ve yine otozomal dominant kalıtılan testiküler anomaliler ve/veya konjenital kalp hastalığı (MIM#615542) ile ilişkilidir. Hastamızda saptanan *GATA4* c.487C>T varyantı, daha önce kardiyak patolojisi olan hastalarda 1 yayında VUS, 4 yayında patojenik olarak değerlendirilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), (145). *GATA4* geninin kardiyak patolojiden farklı olarak CGB ile ilişkisi, ilk defa 2011 yılında Lourenco ve ark tarafından bildirilmiştir. Aynı aileden 2 erkek kardeş ve 1 kuzende, *GATA4* gen varyantı saptanmış olup indeks olguda ve erkek kardeşinde hipoplastik labioskrotal kıvrımlar, perineal hipospasias, korpus kavernozum hipoplazisi ve anne tarafından erkek kuzeninde ise, ambigu genitalya kliniği bildirilmiş ancak bu 3 erkek hastanın ve varyant saptanan annenin Ekokardiyografi ile değerlendirilmeleri normal olduğu gösterilmiştir (146). Literatürdeki bu çalışmadan sonra, bugüne kadar bildirilmiş *GATA4* gen varyantı saptanmış CGB olan hasta sayısı 20'den azdır ve varyantların hepsi missense varyanttır. Bu hastalarda klinik, hafif hipospadiasdan dışı dış genital yapıya kadar değişmektedir ve çoğunda eşlik eden kalp anomalisi bulunmamaktadır. Çalışmamızda novel *GATA4* gen varyantı saptadığımız hastamız ve hipospadiası nedeni ile opere olan kardeşi, aynı şekilde missense varyanta sahiptir. Hastanın hipospadiası olan babasında ise bu varyant saptanmamıştır. Etkilenmiş aile bireylerinde, kardiyak anomali yoktu. Literatürde 4 yayında patojenik ve 1 yayında VUS olarak bildirilen bu varyant, penoskrotal hipospadiası olan 2 kardeşde kliniği açıklıyordu. Hipospadiasda poligenik kalıtım söz konusudur. Babada, hipospadias etiyolojisinden NGS panelinde yer almayan bir genin sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

Daha önce hipospadias etiyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar neticesinde; bazı olguların altındaki sebebin genetik temelli (<%10) olduğu fark edilse de, birçok olgunun idiyopatik olduğu bildirilmiştir (119). Literatürde, 46,XY CGB olan çocuklarda, etiyolojiye yönelik NGS analizinin yapıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye’de, 46,XY CGB hastalarında, NGS analizi yapılmış tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada *AR* ve *SRD5A2* gen dizi analizinde patojenik varyant saptanmamış hastaları çalışmaya dahil etmişler. 20 hastayı, 56 gen içeren NGS paneli ile değerlendirdikleri çalışmada, 9 (%45) hastada patojenik varyant saptanmış (Şekil 13,14). Varyant saptanan genlerin; *HSD17B3* (6 hasta), *WT1* (1 hasta), *LHCGR* (1 hasta) ve *SRY* (1 hasta) olduğunu bildirmişler. Bu hastalardan sadece *HSD17B3* varyantı saptanan 1 hastada hipospadias olduğunu belirtmişler (147). 2018 yılında yapılan 46,XY CGB olan 70 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, 47 hastalıkla ilişkili, 33 aday geni kapsayan NGS paneli ile hastalar analiz edilmiş (Şekil 14). Bu çalışmada, 30 hastada (%42) patojenik varyant saptanmış (Şekil 13). En sık varyant saptanan genlerin *NR5A1* (10/70; %14,2), *SRD5A2* geni (8/70 hasta; %11,4), ve *AR* (8/70; %11,4) olduğunu bildirmişler Çalışmaya dahil ettikleri hastaların, 62’sinde (%88) hipospadias ile birlikte ek anomali (mikropenis, kriptorşidizm) olduğu ve izole hipospadias hastalarının olmadığını belirtmişler. Bu hastaların 28’inde (%45) patojenik ve muhtemel patojenik varyant saptanmış (148). 2019 yılında 46,XY CGB olan 73 hastanın değerlendirildiği başka bir çalışmada, 30 geni kapsayan NGS paneli ile hastalar analiz edilmiş (Şekil 14). 25 hastada (%34) patojenik ve muhtemel patojenik varyant saptanmış (Şekil 13). En sık varyant saptanan genlerin; *HSD17B3* (%12,3; 9 hasta), *SRD5A2* (%9,6; 7 hasta) ve *AR* (%9,6; 7 hasta) olduğunu bildirmişler. Varyant saptanan hastalardan, sadece 6’sında hipospadias bulunurken, diğer hastalarda; androjen insensivite sendromu, persistan müllerian yapı, ambigus genitalia gibi anomaliler olduğunu belirtmişler. Hipospadias saptanan hastalarda, *AR* geni (3 hasta), *SRD5A2* geni (1 hasta) ve *MAMLD1* gen varyantı (1 hasta) saptanmış (149). 2020 yılında 87 hastanın değerlendirildiği çalışmada, 33 hastada (%40) patojenik ve muhtemel patojenik varyant saptanmış (Şekil 13). En sık varyant saptanan genlerin *AR* geni (%24; 21 hasta), *SRD5A2* (%14,9; 13 hasta) ve *NR5A1* (%14,9; 13 hasta) olduğu bildirilmiştir (150).

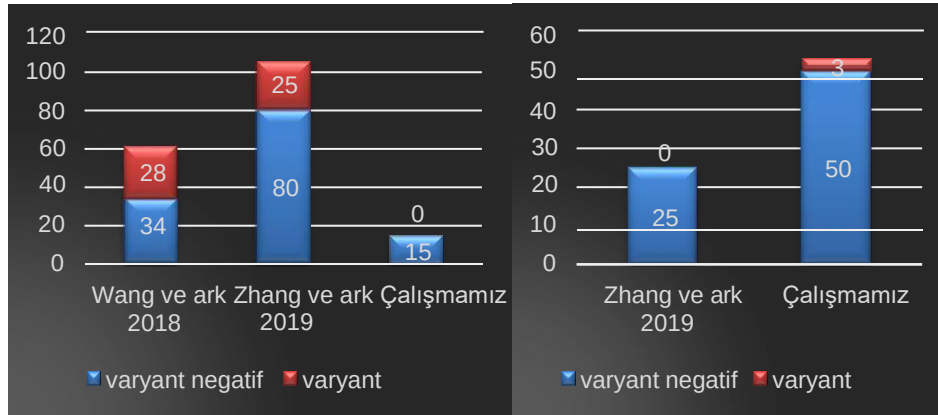
Literatürde, sadece hipospadias etiyojisine yönelik NGS gen analizinin yapıldığı bir çalışma bulunmaktadır. 2019 yılında yapılan bu çalışmada, 105 geni içeren NGS CGB gen paneli ile hipospadias olan 130 hasta değerlendirilmiş (Şekil 14). Hastaların 25'inde (%19) patojenik ve muhtemel patojenik varyant saptanmış (Şekil 13). Bu çalışmada, en sık varyant saptanan genlerin *SRD5A2* (13/130 hasta; %10), *AR* geni (6/130; %4,6) ve *PROK2* (3/130; %2,3) olduğu bildirilmiş. Çalışmaya dahil ettikleri hastaların, 25'inde (%20) izole hipospadias varken, 105 hastada (%80) ek anomali (inmemiş testis, mikropenis, hidrosel, inguinal herni vb) olduğu belirtilmiş. Tüm patojenik varyantların, hipospadias ve ek anomalilerin birlikte olduğu hastalarda saptandığı bildirilmiş (Şekil 15). Patojenik varyant saptanan hastaların %52'si posterior hipospadias, %36'sı midpenil ve %12'si anterior hipospadias olarak değerlendirilmiş (10).



Şekil 13: 46,XY CGB Hastalarında, NGS gen paneli patojenik varyant sıklığı.



Şekil 14: 46, XY CGB hastalarında NGS analizi gen sayısı ile patojenik varyant sıklığı ve hipospadias olanlarda patojenik varyant sıklığının karşılaştırması



Şekil 15: A: Literatürde ve çalışmamızda hipospadias ile birlikte ek anomalisi olan hastalarda patojenik varyant değerlendirilmesi B: Literatürde ve çalışmamızda izole hipospadias hastalarda patojenik varyant değerlendirilmesi

Çalışmamız hipospadias hastalarının etiyolojisinin 46,XY CGB NGS gen paneli ile araştırıldığı ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. 24 geni içeren bu panel ile en

sık varyant saptanan genler literatür ile uyumlu olacak şekilde, *SRD5A2* (%4,4; 3/68 hasta) ve *HSD17B3* (%4,4; 3/68 hasta) genleri idi. 68 hipospadias hastasının 3'ünde (%4,4) fenotip genotip ile uyumlu saptandı (olgu 3, 12 ve 15). Bu 3 hastada *SRD5A2*, *GATA4* ve *AR* genlerinde varyant vardı. Bu genlerden *SRD5A2* (c.586G>A; hasta no: 12; penoskrotal hipospadias), ve *GATA4* varyantları (c.487C>T ; hasta no: 15; subkoronal hipospadias), patojenik olarak bildirilmiş varyantlardı. *AR* geninde saptanan varyant (c.1675A>T; hasta no: 3; midpenil hipospadias) klinik ile uyumlu olsa da VUS olarak değerlendirildiği için, hastanın hipospadias öyküsü olmayan 2 dayısında bu genin sekans analizi planlandı. Literatüre kıyasla 46,XY CGB hastalarında patolojik varyant saptama oranımız düşüktü. Bunun birkaç nedene bağlı olduğunu düşünmekteyiz. İlk olarak, değerlendirdiğimiz 46,XY CGB gen panelinde, diğer çalışmalardan daha az gen bulunmaktaydı. Ayrıca, literatürdeki çalışmaların çoğunluğuna 46, XY CGB spektrumundaki tüm hastalıklar (persistan müllerian kanal, ambigus genital vb.) dahil edilmiştir ancak bizim çalışmamızda yalnızca hipospadias etyolojisi araştırılmıştır. Bir diğer neden de, NGS analizi yapılmış olan çalışmalarda hastaların büyük çoğunluğunda hipospadiasa ek olarak mikropenis, kriptorşidizm bulunmaktadır. Literatür çalışmalarından farklı olarak, çalışmamızda hastaların büyük çoğunluğunu (%78) izole hipospadias hastaları oluşturmaktaydı (Şekil 15).

Sonuç olarak; hipospadias poligenik kalıtım gösteren bir hastalıktır. Bu nedenle 46,XY CGB paneli ile çoklu gen çalışılması, hipospadias hastalarına genetik tanı koymadaki önemini vurgulamak istiyoruz. İdeal olan CGB tanısı olan her hastada genetik tanıyı koyabilmek ve aileyi bilgilendirmek olduğu için, sadece multipl genital anomalisi olan hastalarda değil, izole hipospadias olan hastalarda da genetik analiz yapılmasının gerekli olduğunu belirtmek istiyoruz. Bununla birlikte hipospadias etyolojisinden sorumlu diğer genleri de içeren geniş NGS paneli ile çalışma yapılmasının, hipospadias olgularında etiyolojiyi aydınlatmada daha yararlı olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, 68 hipospadiaslı hastanın dosyalarının geriye dönük olarak incelenmesi sonucunda, hastaların %38'inde distal hipospadias görülürken, %62'si proksimal hipospadias saptandı. Çalışmaya dâhil edilen 68 hastanın %7.3'ü (5/68 hasta) glanüler hipospadias, %14,7 si (10/68 hasta) koronal hipospadias, %16,1 'i (11/68 hasta) subkoronal hipospadias, %11,7 si (8/68 hasta) midpenil hipospadias, %50'si (34/68 hasta) penoskrotal hipospadias tanılı idi. Çalışmaya katılan hastaların yaş ortalaması $6,11 \pm 4,62$ olarak hesaplandı. Hastaların ilk operasyon yaşları ortalama olarak $3,22 \pm 2,95$ olarak bulunurken, hastaların doğum sırasında anne yaşı ortalaması $25,79 \pm 4,78$ olarak hesaplandı. Tüm katılımcıların doğum haftası ortalaması ise $37,38 \pm 2,74$ olarak bulundu.

Aile öyküsü 10 hastada (%15) saptandı. Bu 10 olgunun 4'ünde distal hipospadias 6'sında proksimal hipospadias mevcuttu. Ailesel olgulardan 2 sinde (%20) VUS ve patojenik varyant saptandı (AR ve GATA4).

Çalışmada; 46, XY CGB gen paneli ile 15 hastada, 17 varyant saptandı (15/68 hasta; %22). Varyant saptanan genler: *SRD5A2*, *HSD17B3*, *AMH*, *AR*, *MAMLD1*, *AMHR2*, *LHCGR*, *AKR1C2*, *GATA4* ve *SOX9* genleridir. Bu varyantlardan sadece üç tanesi Clinvar'da daha önce bildirilmiştir. *SRD5A2* geni c.586G>A varyantı patojenik, *GATA4* geni c.487C>T varyantı patojenik ve VUS, *AR* geni c.1424C>T varyantı VUS olarak belirtilmiştir. Diğer 14 varyant novel varyanttı. En sık varyant saptanan genler; *SRD5A2* (3 varyant; 3/17 hasta) *HSD17B3* (3 varyant; 2/17 hasta) *AMH* (3 varyant; 3/17 hasta) ve *AR* (2 varyant; 2/17 hasta) genleridir.

SRD5A2 geni c.586G>A varyantı homozigot olarak bir hastada saptandı. Penoskrotal hipospadias olan hastanın kliniği, 5 alfa redüktaz eksikliği ile uyumluydu.

GATA4 geni c.487C>T varyantı saptanan subkoronal hipospadiası olan 2 erkek kardeşde, ek kalp anomalisi yoktu. Kalp anomalisi olan hastalarda patojenik olduğu bilinen bu varyantın ilk defa hipospadiasa yol açtığı gösterilmiş oldu.

AR geni novel hemizigot c.1675A>T varyantı saptanan hastada, midpenil hipospadias vardı. ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirildi. Sağlıklı 2 dayıda AR gen analizi planlandı.

AR geni hemizigot c.1424C>T varyantı saptanan hastada, koronal hipospadias vardı. Clinvarda VUS olarak bildirilmiş ve hipospadiasda tariflenmiş olan bu varyant, hastanın sağlıklı 2 erkek kardeşinde de saptandı. Bunun sonucunda klinik ile ilişkili olmadığı düşünüldü.

HSD17B3 geni birleşik heterozigot c.761_762delAG ve c.860A>G varyantı penoskrotal hipospadiası olan hastada saptandı. Novel ACMG kriterlerine göre c.761_762delAG varyantı patojenik, c.860A>G varyantı VUS olarak değerlendirildi. Hastanın hormonal değerlendirmesi HSD17B3eksikliği ile uyumlu değildi.

Distal hipospadias tanılı 6 olguda (23,07), penoskrotal hipospadias tanılı 9 olguda (%21,4) gen varyantı saptandı. Hipospadiasın distal veya proksimal yerleşimi olmasının, gen varyantı görülmesiyle arasındaki ilişki anlamlı bulunamadı. Hastalar eşlik eden ek patolojiler açısından da incelendiğinde ise; distal hipospadias olgularının sadece 2'sinde (yaklaşık % 8); proksimal hipospadias grubunda ise, 13 hastada (yaklaşık %31'inde) ek patoloji saptandı. En sık eşlik eden anomali inmemeş testis (11/15 hasta; %73) olarak bulundu. Opere olan hastaların ortalama %44ünde (19/43 hasta); dilatasyon, fistül onarımı, redoüretroplasti, penil plikasyon gibi tekrarlayan operasyonlara ihtiyaç duyuldu. Hastalar aile öyküleri açısından incelendiğinde; 10 olguda (yaklaşık %15) aile öyküsüne rastlanmış olduğu tespit edildi.

İzole hipospadias etiyolojisinin aydınlatılması için, hipospadias oluşumundan sorumlu tüm genleri içeren geniş NGS paneli ile çalışma yapılmasının, hipospadias olgularına genetik tanı koymada daha yararlı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Dolk H, Vrijheid M, Scott JE et al. 2004. Toward the effective surveillance of hypospadias. 112: 398.
2. Basaklar, Can. Bebek ve Çocukların Cerrahi Ve Ürolojik Hastalıkları. Ankara : Palpe Yayıncılık, 2006. 1419-1434.
3. Marrocco G, Grammatico P, Vallasciani S, Gulia C, Zangari A, Marrocco F, et al. Environmental, parental and gestational factors that influence the occurrence of hypospadias in male patients. J Pediatr Urol. 2015, 11: 12–19.
4. SNC, Büyüknal. Evolution of hypospadias surgery: Historical Perspective. In Hadidi AT, Azmy AF (editors). Hypospadias Surgery. Berlin : Springer, 2004. 3–15.
5. Rafjer J, Walsch PC. The incidence of intersexuality in patients with hypospadias and cryptorchidism. J Urol. 1999, 116:769.
6. Kalfa N, Phillibert P, Baskin LS, Sultan C. Hypospadias: Interactions between environment and genetics. Molecular and Cellular Endocrinology 335 (2): 89-95.
7. Carmichael SL, Witte JS, Ma C, Lammer EJ, Shaw GM. Hypospadias and variants in genes related to sex hormone biosynthesis and metabolism. Andrology. 2014, 2(1):130-7.
8. Topcu V, Ilgin-Ruhi H, Siklar Z, Karabulut HG, Berberoglu M, Hacıhamdioglu B, et al. Investigation of androgen receptor gene mutations in a series of 21 patients with 46 XY disorders of sex development. J Pediatr Endocrinol Metab. 2015, 28: 1257–1263.
9. Karabulut R, Turkyilmaz Z, Sonmez K, Kumas G, Ergun SG, Ergun MA, et al. Twenty-Four Genes are Up Regulated in Patients with Hypospadias. Twenty-Four Genes are Up Regulated in Patients with Hypospadias. Balkan J Med Genet. 2013, 16: 39–44.
10. Zhang W, Shi J, Zhang C, Jiang X, Wang J, et al. Identification of gene variants in 130 Han Chinese patients with hypospadias by targeted next-generation sequencing. Mol Genet Genomic Med. 2019;00:e827.
11. LS, Baskin. Hypospadias and urethral development. J Urol. 2000, 163: 951–956.
12. Hypospadias. A contemporary epidemiologic assessment Urology. Gallentine ML, Morey AF, Thomson IM. 57, 2001. 877–790.
13. Gallentine ML, Morey AF, thomson IM. hypospadias: A contemporary epidemiologic assesment. Urology. 2001, 57 (4): 877 - 790.
14. LS, Baskin. Hypospadias. Adv Exp Med Biol. 2004, 545: 3 - 22.
15. Paulozzi LJ, Erickson D, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. Pediatrics. 1997, 100: 831 - 4.
16. CK, Smith. Surgical procedures for correction of hypospadias. J Urol. 1938, 40:239.

17. J, Barcat. Current concepts of treatment. In Horton CE (ed): Plastic and Reconstructive Surgery of the Genital Area . 1973, 249-263.
18. Hadidi AT, Azmy AF. Classification of hypospadias. Hypospadias Surgery, an Illustrative Guide. 1st ed. Berlin : Springer-Verlag, 2004. 79-82.
19. Bouty A, Ayers KL, Pask A et al. The genetic and environmental factors underlying hipospadias. 239-259. 2015. 239-259.
20. Van der Zanden LF, Galesloot TE, Feitz WF, Brouwers MM, Shi M, Knoers NV, et al. Exploration of gene environment interactions, maternal effects and parent of origin effects in the etiology of hypospadias. J Urol. 2354-2360, 2012, 188.
21. Czeizel A, Toth J. Correlation between the birth prevalence of isolated hypospadias and parental subfertility. Teratology. 1990, Cilt 41, 167.
22. Kim KS, Baskin LS. Induction of hypospadias in a murine model by maternal exposure to synthetic estrogens. Environ Res. 267-275, 2004, 94.
23. Chen MJ, Macias CG, Gunn SK, Dietrich JE, Roth DR, Schlomer BJ, et al. Intrauterine growth restriction and hypospadias: is there a connection? Int J Pediatr Endocrinol. 20-21, 2014, 2014.
24. Weidner IS, Moller H, Jensen TK, Skakkebaek NE. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. J Urol. 1606 - 9, 1999, 161.
25. Gatti JM, Kirsch AJ, Troyer WA, Perez-Brayfield MR, Smith EA, Scherz HC. Increased incidence of hypospadias in small for gestational age infants in a neonatal intensive-care unit. BJU Int. 548 - 50, Cilt 2001, 87.
26. North K, Golding J, The ALSPAC Study Team. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. BJU Int. 107 - 113, 2000, 85.
27. Fisch H, Liberson G, Cooper KL, et al. Maternal age and hypospadias rates. JUrol. A606, 2000, 163.
28. Carmichael SL, Shaw GM, Laurent C, Lammer EJ, Olney RS. The National Birth Defects Prevention Study. Pediatr Perinat Epidemiol. 406-413, 2005, Cilt 19.
29. Carmichael SL, Shaw GM, Lammer EJ. Environmental and genetic contributors to hypospadias: a review of the epidemiologic evidence. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 499-510, 2012, Cilt 94.
30. De Kort CA, Nieuwenhuijsen MJ, Mendez MA. Relationship between maternal dietary patterns and hypospadias. Paediatr Perinat Epidemiol. 255-264, 2011, 25.
31. Olivier M, Paris F, Philbert F, Gamier S, Coffy A et al. Family history is underestimated in children with isolated hypospadias: a french multicenter report of 88 families. J urology. 890-894, 2018, Cilt 200, 4.
32. Schnack TH, Poulsen G, Myrup C, Wohlfahrt J, Melbye M. Familial coaggregation of cryptorchidism, hypospadias, and testicular germ cell cancer: a nationwide cohort study. J National Cancer. 187-92, 2010, Cilt 102, 3.
33. Leung AK, Hoo JJ. A case of perineal hypospadias with paracentric inversion of chromosome 14. Eur J Pediatr. 144: 503 - 4, 1986.
34. LA, Stokowski. Hypospadias in the neonate. Adv Neonatal Care. 206-215, 2004, Cilt 4.

35. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editors). Thompson & Thompson Genetics in Medicine 8th edition. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2016. 87–102.
36. Mohnach L, Fechner PY, Keegan CE. Initial Posting: May 21, 2008; Last Update: June 2, 2016.
37. Ağras K, Uncugil A. Hipospadiasın etiyolojisi ve epidemiyolojisi. Turk Urol Sem. 173–180, 2011, Cilt 2.
38. Cunha G, Baskin L. Development of the penileurethra. In: L.S. Baskin, Editor, Hypospadias and genital development. Philadelphia : Kluwer Academic/Plenum, 2004. 87-100.
39. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Braver PR, Francis–West P (editors). Development of the reproductive system, development of external genitalia. Larsen’s Human Embryology. 5th ed. Philadelphia :Elsevier Churchill Livingstone, 2015. 415–418.
40. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins;. 1995. 212–285.
41. LA, Stokowski. Hypospadias in the neonate. Adv Neonatal Care. 206 - 15, 2016, 4.
42. FJ, Hinman. Penis and male urethra. In: F.J. Hinman, Editor, Atlas of urosurgical anatomy. Philadelphia :WB Saunders, 1993. 418 - 470.
43. MF, Bellinger. Embryology of the male external genitalia. Urol Clin North Am. 375 - 82., 1981, 8.
44. The Urethral Plate. Introduction Embryology and Practical Anatomy for the Surgeon. Instructional/Postgraduate and AM/PM Course Handouts. H0043 PG (Current hypospadias techniques and complications of hypospadias surgery). W, Snodgrass. California : Annual Meeting, Anaheim, 2002. 13-16.
45. Kurzrock E, Baskin L, Li Y et al. Epithelial-mesenchymal interactions in development of the mouse fetal genital tubercle, Cells Tissues Organs. 1015 - 1020, 1999, 164.
46. Alp T, Vatandaşlar F. Anatomi In Tellaloğlu S, Kadioğlu A (eds): Erkek seksüel disfonksiyonu. İstanbul : Nobel Kitapevi, 2000. 31-38.
47. Arıncı K, Alaitin E. Anatomi. 1. Cilt. Ankara : Güneş Tıp Kitapevleri, 2014. 46–52.
48. Y, Arifoğlu. Her Yönüyle Anatomi. İstanbul : İstanbul Tıp Kitap Evi, 2016. 196–210.
49. JD, Brooks. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In Walsh PC, Retik BA, Vaughan Jr ED, Wein AJ (eds): Campbell's Urology, WB Saunders. Philadelphia : yazarı bilinmiyor, 1998. 89-130.
50. Goldstein AM, Meehan JP, Morrow JW, Buckley PA, Rogers FA. The fibrous skeleton of the corpora cavernosa and its probable function in the mechanism of erection. Br J Urol. 574-578, 1985, 57.
51. Goldstein AM, Morrow JW, Meehan JP, Buckley PA, Rogers FA. Special microanatomical features surrounding the intracorpora cavernosa nerves and their probable function during erection. J Urol. 44-46, 1984, 132.

52. Benson GS, Boileau M. The penis: Sexual function and dysfunction. In Gillenwater JJ, Grayhack JT, Howards SS, Mitchell ME (eds): Adult and Pediatric Urology, Lippincott Williams&Wilkins. Philadelphia : yazarı bilinmiyor, 2002. 1935-1936.
53. FH, Netter. Atlas of Human Anatomy. Philadelphia : Saunders, 2011. 174-186.
54. Fritsch H, Kuehn W. Color Atlas of Human Anatomy (Cilt 2). Kopuz C, (çeviren). İstanbul : İstanbul Tıp Kitapevi, 2012. 141-152.
55. Goldstein AM, Morrow JW, Meehan JP, Buckley PA, Rogers FA. Special microanatomical features surrounding the intracorpora cavernosa nerves and their probable function during erection. J Urol. 44-46, 1984, 132.
56. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins;. 1995. 212-285.
57. Levine L, Han B, Little P. Congenital anomalies of the male urethra. Pediatr Radiol. 851-862, 2007, Cilt 37, 9.
58. Douglas E. Kelly D, Richard W, Allen C (editors). Microscopic Anatomy. Philadelphia : Chapter, 2008. 19: 687-722.
59. Baskin L, Duckett JW. Penil Curvature. Urology. 347-356, 1996, Cilt 48.
59. Snodgrass W, Prieto J. Straightening ventral curvature while preserving the urethral plate in proximal hypospadias repair. J Urol. 1720-1755, 2009, 182.
60. W, Snodgrass. Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias. J Urol. 404, 1994, Cilt 151, 2.
61. AT, Hadidi. History of Hypospadias. J Pediatric Surgery. 211-217, 2017, 52.
62. DO, Rogers. History of external genital surgery. In Horton CE, ed. Plastic and Reconstructive Surgery of the Genital Area. basım yeri bilinmiyor : Little Brown, 1973.
63. Wv, Hook. A new operation for hyposapadias. Ann Surg. 378, 1996, 23.
64. Devine CJ, Horton CE. One stage hypospadias repair. J Urol. 166-172, 1961, 85.
66. Khuri FJ, Hardy BE, Churchill BM. Urologic anomali asassociated with hypospadias. Urol Clin North Am. 565 - 71, 1981, 8.
67. Itesako T, Nara K, Matsui F, Matsumoto F. Acquired undescended testes in boys with hypospadias. J Urol. 2440-2443, 2011, 185.
68. Kaefer M, Diamond D, HendrenWH. The incidence of intersexuality in children with cryptorchidism and hypospadias: Stratification based on gonadal palpability and meatal position. J Urol. 1003, 1999, 162.
69. Devine CJ Jr, Gonzales-Serva L, Stecker JF Jr, Devine PC, Horton CE. Utricular configuration in hypospadias and intersex. J Urol. 407-11, 1980, 123.
70. Kenneth CH, Leung AK. Hypospadias: a reviev. J Singapore Paediatr Soc. 54-6, 1987, 29.
71. Desautel MG, Stock J, Hanna MK. Müllerian duct remnants: Surgical management and fertility issues. J Urol. 1008-1013, 1999, 162.

72. Belman AB, Kass EJ. Hypospadias repair in children less than 1 year old. J Urol. 1273–1274, 1982, 128.
73. Sandberg DE, Meyer–Bahlburg HF, Aranoff GS, Sconzo JM, Hensle TW. Boys with hypospadias: a survey of behavioral difficulties. J Pediatr Psychol. 491–514, 1989, 14.
74. Yücesan, S. Hipospadiasda Genel Cerrahi Prensipier. Türkiye Klinikleri Journal of Pediatric Surgery Special. 2017, 103.
75. Snodgrass W, Prieto J. Straightening ventral curvature while preserving the urethral plate in proximal hypospadias repair. J Urol. 1720-1755, 2009, Cilt 182.
76. Kaplan GW, Lamm DL. Embryogenesis of chordee. J Urol. 769-772, 1975, Cilt 114.
77. Baskin LS, Duckett JW. Dorsal tunica albuginea plication (TAP. for hypospadias curvature. J Urol. 1668-1671, 1994, Cilt 151.
78. Docima SG, Canning DA, Khoury AE. Kelalis–King–Belman Pediatrik Üroloji. Kilciler M, Dayanç M (Çevirenler). basım yeri bilinmiyor : Ed. Habitat, 2010. 1138-1142.
79. Belman AB: Hipospadias. In Welch KJ, Randolph JG, Ravitch MM, O’Neill JA and Rove MI(eds):Pediatric Surgery, Chigago Year Book Medical Publishers, Inc pp.1286,1986.
80. Laurence S. Baskin, and Michele B. Ebberts Hypospadias: anatomy, etiology, and technique J Pediatr Surg 41; 463–72, 2006.
81. Murphy JP; Hypospadias. In Ashcraft KW et al (eds); Pediatric Surgery. WB Saunders Company, Philadelphia; 763–782, 2000.
82. Docima SG, Canning DA, Khoury AE. Kelalis–King–Belman Pediatrik Üroloji. Kilciler M, Dayanç M (Çevirenler), s.1138–1142. 1. Ed. Habitat, 2010.
83. Mingin G, baskin LS; Management of chordee in children and young adults. Urol Clin North Am 29; 277–284, 2002.
84. Borer JG, retij AB; Current trends in hypospadias repair. Urol Clin North Am 26; 15– 37, 1999.
85. Cilento BG, Atala A; Proximal hypospadias. urol clin North Am 29; 311–328, 2002.
86. Nuhoglu B, Ayyıldız A,Balcı U, Ersoy E (eds) Surgical treatment options proximal hypospadias; Retrospective analysis of 171 casee at o asingle institution. Int Urol Nephrol 38; 593–598,2006.
87. Belman AB: The deepithelized flap its influence on hypospadias pedias repair. J Urol 152; 2332–2334, 1994.
88. Erol A, Kayikci A, Memik O, Cam K, Akman Y. Single vs. double dartos interposition flaps in preventing urethrocutaneous fistula after tubularized incised plate urethroplasty in primary distal hypospadias: a prospective randomized study. Urol Int 83: 354–358, 2009.
89. Retik AB, Atala A. Complications of hypospadias repair. Urol Clin North Am 2002; 29: 329–339.

90. Bhat A, Mandal AK. Acute postoperative complications of hypospadias repair. *Indian J Urol* 2008; 24: 241–248.
91. Schneuer FJ, Holland AJ, Pereira G, Bower C, Nassar N. Prevalence, repairs and complications of hypospadias: an Australian population-based study. *Arch Dis Child* 2015; 100: 1038–1043.
92. Bakal Ü, Kazez A. Hipospadias geç dönem komplikasyonları. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Surg Special Tropic* 2017; 7: 321–324.
93. Nuininga JE, de Gier RPE, Verschuren R, Feitz WF. Longterm outcome of different types of 1-stage hypospadias repair. *J Urol* 2005; 174: 1544–8.
94. Duel BP, Barthold JS, Gonzales R; Management of urethral strictures after hypospadias repair. *J Urol* 160; 170–171, 1998.
95. Uemura S, Hutson JM, Woodward AA; Balanitis xerotica obliterans with urethral stricture after hypospadias repair. *Pediatr Surg Int*. 16; 144–145, 2000.
96. Gonzales R, Smith C, Denes ED; Double onlay preputial flap for proximal hypospadias repair. *J Urol* 156; 832–835, 1996.
97. Baskin LS, Duckett JW, Ueoka K; Changing concept of hypospadias curvature lead to more onlay island flap procedures. *J Urol* 151; 191–196, 1994.
98. Vandersteen DR, Husmann DA. Late onset recurrent penil chordee after successful correction at hypospadias repair. *J Urol* 1998; 160(3 Pt 2):1131-3.
99. Duckett JW; The current hype in hypospadiology, *Br J Urol* 76 Suppl 3; 1–7, 1995.
100. Park ST, Kim J. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurourol J*. 2016 Nov; 20(Suppl 2): S76–83.
101. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5):405–24.
102. [www.https://www.omim.org/](https://www.omim.org/)
103. Kraft KH, Shukla AR, Canning DA. Hypospadias. *Urol Clin N Am* 2010; 37: 167
104. Duckett JW. Hypospadias repairs: two-stage alternative. *Br J Urol*. 1996; 78:659-60.
105. Manson JM, Carr MC. Molecular epidemiology of hypospadias: review of genetic and environmental risk factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003; 67:825e36.
106. Harris EL. 1990. Genetic epidemiology of hypospadias. *Epidemiol Rev* 12:29–40.

107. Opitz JM. 1985. Hypospadias [editorial comment]. *Am J Med Genet* 21:57–60.
108. Choi, J.-H., Lee, Y., Oh, A., Kim, G.-H., & Yoo, H.-W. (2020). Molecular Characteristics of Sequence Variants in GATA4 in Patients with 46,XY Disorders of Sex Development without Cardiac Defects. *Sexual Development*.
109. Sheldon CA, Duckett JW: Hypospadias. *Pediatr Clin North Am* 1987;34(5):1259-72.
110. Sauvage P, Becmeur F, Geiss S, Fath C. Transverse mucosal preputial flap for repair of severe hypospadias and isolated chordee without hypospadias: a 350-case experience. *J Pediatr Surg* 1993;28(3):435-8.
111. Borer JG, Bauer SB, Peters CA, Diamond DA, Atala A, Cilento BG, et al. Tubularized, incised plate urethroplasty: Expanded use in primary and repeat surgery for hypospadias. *J Urol* 2001;165(2):581-5.
112. Duckett JW. Hypospadias. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ eds. *Campbell's Urology*. Vol 2. Philadelphia:WB Saunders; 1998. p.2093-119
113. Snodgrass W, Yucel S. Tubularized incised plate for mid shaft and proximal hypospadias repair. *J Urol* 2007;177(2):698-702.
114. Bar-Yosef Y, Binyamini J, Matzkin H, BenChaim J. Salvage Mathieu urethroplasty: reuse of local tissue in failed hypospadias repair. *Urology* 2005;65(6):1212-5
115. Emir L, Erol D. Mathieu urethroplasty as a salvage procedure: 20-year experience. *J Urol* 2003;169(6):2325-7.
116. Al-Agha AE, Thomsett MJ, Batch JA. The child of uncertain sex: 17 years of experience. *J Paediatr Child Health* 2001;37(4):348-51.
117. Kelalis P, Bunge R, Barkin M, Perlmutter AD, Friedman DB, Friedman DB, et al. The Timing of Elective Surgery on the Genitalia of Male Children With Particular Reference to Undescended Testes and Hypospadias. *Pediatrics* Sep 1975, 56 (3) 479-483.
118. Manley CB, Epstein ES. Early hypospadias repair. *J Urol* 1981;125(5):698-700.
119. Noriega NC, Ostby J, Lambright C, et al. 2005. Late gestational exposure to the fungicide prochloraz delays the onset of parturition and causes reproductive malformations in male but not female rat offspring. *Biol Reprod* 72:1324–1335.
120. Ostby J, Monosson E, Kelce WR, et al. 1999. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health* 15:48–64.
121. Kallen B, Martinez-Frias ML, Castilla EE, et al. 1992. Hormone therapy during pregnancy and isolated hypospadias: an international casecontrol study. *Int J Risk Safety Med* 3:183–198.

122. Carmichael SL, Shaw GM, Laurent C, et al. 2005. Maternal progestin intake and risk of hypospadias. *Arch Pediatr Adolesc Med* 159:957–962.
123. Abacı A, Çatlı G, Kırbıyık Ö, Şahin NM, Abalı ZY, Ünal E, ve ark. Genotype-phenotype correlation, gonadal malignancy risk, gender preference, and testosterone/dihydrotestosterone ratio in steroid 5-alpha-reductase type 2 deficiency: a multicenter study from Turkey. *J Endocrinol Invest*. 2019 Apr;42(4):453-470.
124. Batista RL, Mendonca BB. Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide. *Appl Clin Genet*. 2020 Apr 14;13:83-96.
125. Akcay T, Fernandez-Cancio M, Turan S, Güran T, Audi L, Bereket A. AR and SRD5A2 gene mutations in a series of 51 Turkish 46,XY DSD children with a clinical diagnosis of androgen insensitivity. *Andrology*. 2014 Jul;2(4):572-8.
126. Rhouma BB, Belguith N, Mnif MF, Kamoun T, Charfi N, et al. A Novel Nonsense Mutation in *HSD17B3* Gene in a Tunisian Patient with Sexual Ambiguity. *The Journal of Sexual Medicine*, 10(10).
127. George MM, New MI, Ten S, Sultan C, Bhangoo A. The clinical and molecular heterogeneity of 17β-HSD3 enzyme deficiency. *Horm Res Paediatr* 2010;74:229–40.
128. Sata F, Kurahashi N, Ban S, et al. 2010. Genetic polymorphisms of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 3 and the risk of hypospadias. *J Sex Med* 7:2729–2738.
129. Hiort O, Holterhus PM. 2000. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142:101–110.
130. Gottlieb B, Trifiro MA. Androgen Insensitivity Syndrome. Initial Posting: March 24, 1999; Last Update: May 11, 2017.
131. Hiort O, Holterhus PM. 2000. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142:101–110.
132. Lim HN, Chen H, McBride S, et al. 2000. Longer polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with moderate to severe undermasculinized genitalia in XY males. *Hum Mol Genet* 9:829–834.
133. Chen Y, Thai HTT, Lundin J, Lagerstedt-Robinson K, Zhao S, Markljung E, et al. (2010). Mutational study of the *MAMLD1*-gene in hypospadias. *European Journal of Medical Genetics*, 53(3), 122–126.
134. Hughes LA, Bounford KM, Webb EA, Dasani P, Clokie S, Chandran H, et al. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD). *Endocrine Connections* (2019) 8, 100–111.

135. Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K, et al. 2006. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat Genet* 38:1369–1371.
136. McElreavey K, Fellous M: Sex determination and the Y chromosome. *Am J Med Genet* 1999; 89: 176–185.
137. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B et al: Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6653–6665.
138. Wang, Y., Li, Q., Xu, J., Liu, Q., Wang, W., Lin, Y., ... Shen, Y. (2004). Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *European Journal of Human Genetics*, 12(9), 706–712.
139. Fowler, P.A., Bhattacharya, S., Gromoll, J., Monteiro, A., O'Shaughnessy, P.J., 2009. Maternal smoking and developmental changes in luteinizing hormone (LH) and the LH receptor in the fetal testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 4688–4695.
141. Edelstein NY, Grinspon RP, Schteingart HF, Rey RA. Anti-Müllerian hormone as a marker of steroid and gonadotropin action in the testis of children and adolescents with disorders of the gonadal axis. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2016:20.
142. Feyaerts, A., Forest, M. G., Morel, Y., Mure, P.-Y., Morel-Journel, N., Mallet, D., ... Mouriquand, P. (2002). Endocrine Screening in 32 Consecutive Patients with Hypospadias. *The Journal of Urology*, 168(2), 720–725.
143. Hughes LA, McKay-Bounford K, Webb EA, Dasani P, Clokie S, Chandran H, et al. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD). *Endocr Connect.* 2019 Feb;8(2):100-110.
144. Mares L, Vilchis F, Chávez B, Ramos L. Molecular genetic analysis of *AKR1C2-4* and *HSD17B6* genes in subjects 46,XY with hypospadias. *J Pediatr Urol.* 2020 Jul 10:S1477-5131(20)30411-3.
145. Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, Shen J, Manichaikul A, Tomita-Mitchell A, et al. Spectrum of Heart Disease Associated with Murine and Human GATA4 Mutation *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Dec; 43(6): 677–685.
146. Lourenco, D., Brauner, R., Rybczynska, M., Nihoul-Fekete, C., McElreavey, K., Bashamboo, A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 108: 1597-1602, 2011.
147. Özen S, Onay H, Atik T, Solmaz AE, Özkinay F, et al. Rapid Molecular Genetic Diagnosis with Next-Generation Sequencing in 46,XY Disorders of Sex Development Cases: Efficiency and Cost Assessment *Horm Res Paediatr* 2017;87(2):81-87.

- 148.** H Wang, L. Zhang, N. Wang, H. Zhu, B. Han , F. Sun. ve ark Next-generation sequencing reveals genetic landscape in 46, XY disorders of sexual development patients with variable phenotypes. Hum Genet 2018 Mar;137(3):265-277.
- 149.** Hughes LA, Bounford KM, Webb EA, Dasani P, Clokie S, et al. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD) Endocr Connect 2019;8(2):100-110.
- 150.** Yu B, Liu Z, Gao Y, Wang X, Mao JF, Nie M, et al. Prevalence of gene mutations in a Chinese 46,XY disorders of sex development cohort detected by targeted next-generation sequencing Asian J Androl 2020 Sep 25



