

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**SENDROMİK OLMAYAN ANOREKTAL
MALFORMASYONLU OLGULARDA ARRAY CGH
SONUÇLARININ ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pelin ÖZYAVUZ ÇUBUK

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. E. Ferda PERÇİN**

**ANKARA
HAZİRAN 2016**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**SENDROMİK OLMAYAN ANOREKTAL
MALFORMASYONLU OLGULARDA ARRAY CGH
SONUÇLARININ ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pelin ÖZYAVUZ ÇUBUK

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. E. Ferda PERÇİN**

**ANKARA
HAZİRAN 2016**

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

30/06/2016

Adı ve Soyadı	Pelin Özyavuz Çubuk
Baba Adı	Ahmet
Doğum Yeri/Tarihi	Şanlıurfa/01.01.1988
Diploma Tarihi/Diploma No	18.08.2011/158298
Mezun Olduğu Fakülte	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 4
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "Sendromik Olmayan Anorektal Malformasyonlu Olgularda Array CGH Sonuçlarının Analizi"

JÜRİ KARARI: Başarılı
JÜRİ ÜYELERİ:

UYE
Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün

BAŞKAN
Prof. Dr. E. Ferda Perçin

UYE
Doç. Dr. E. Beşir Yüksekeli

TEŞEKKÜRLER

Asistanı olmaktan gurur duyduğum hocalarımdan; disiplini, özgüveni ve dürüstlüğü ile bana hayatım boyunca örnek olacak; üzüldüğümde benimle birlikte göz yaşı döken, başardığımda benden daha fazla gururlanan tez danışmanım Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e; tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar verdiği katkılar ve üzerimdeki bütün emekleri için teşekkür ederim. Tıbbi Genetik asistanı olarak çalıştığım dört yıl boyunca bize bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran kıymetli hocalarımdan; bilimselliğinin yanısıra, empati yeteneği ve hayat enerjisi ile de örnek aldığım, her zaman desteğini hissettiğim, sevgili hocam Prof.Dr.Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, iş ortamında aile sıcaklığı duymamızı sağlayan, çözüm odaklı pragmatik yaklaşımıyla hayatımızı kolaylaştıran, bilgi ve birikimini bize aktarmak için bizden daha çok çaba gösteren sevgili hocam Prof.Dr.M.Ali Ergün'e ve bizi öğrenmeye teşvik eden, düzen ve alışkanlıklarıyla bize örnek olan kıymetli hocam Doç.Dr.Esra Tuğ'a hayat tecrübelerini ve bilgilerini bizden esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Başta her türlü sorumu sabırla yanıtlayan ve bana değerli zamanından ayıran, sevgili ablam Uzm.Dr.Gülsüm Kayhan olmak üzere; bana ablalık ve abilik yapan tüm kıdemlilerime, arkadaşlıklarından büyük keyif aldığım; Uzm.Dr.Hanife Saat, Dr.Aysel Ünal, Dr.Serdar Mermer, Dr.Selvihan Sağdıç, Dr.Abdullah Sezer ve Dr.Yunus Emre Haskılıç'a teşekkür ederim.

Aynı çalışma ortamını paylaştığım ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli iş arkadaşlarım Bio.Işıl Küçün Kiraz, Uzm.Bio.Ebru Aytekin, Uzm.Bio.Halide Gül

Akyar, Bio.Dr.Derya Kan Karaer, Bio.Dr. Sezen Guntekin Ergun, Esra Kucuk, Mehtap Tirpan Yilmaz ve Ayse Erdogan'a tesekkür ederim.

Beni yetistiren anneme ve babama, canimin yarisi kardesime ve esim Mehmet Özgür Çubuk'a varliklari için tesekkür ederim.

Hastalarına gösterdigi özel ilginin yanı sıra eşsiz kişiliği ile de bizlere örnek olan ve elim bir hastalık sonucu aramızdan ayrılan, Çocuk Cerrahisi Anabilimdalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Billur Demiroğulları'na hastalara ve gerekli tıbbi örneklere ulaşmamı sağladığı için sonsuz tesekkür eder ve Allah'tan rahmet dilerim.

Anneme ve babama...



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	3
TEŞEKKÜRLER.....	4
İÇİNDEKİLER.....	7
TABLolar DİZİNİ.....	9
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	10
1.GİRİŞ.....	11
2.GENEL BİLGİLER.....	13
2.1 Anorektal Malformasyonların Tanımlanması ve Embriyolojisi.....	13
2.2. Anorektal malformasyonların cerrahi sınıflandırması.....	14
2.3. Anorektal malformasyonların etiyolojik sınıflandırılması.....	16
2.3.1. Sendromik olmayan (izole) ARM'ler.....	16
2.3.2 Diğer sistemik malformasyonların eşlik ettiği ancak sendromik olmayan ARM'ler.....	17
2.3.3 Sendromik ARM'ler.....	20
2.3.4. Teratojenik Faktörler.....	31
2.4. Anorektal malformasyon etiyolojisinde rol oynayan genler.....	32
2.5. Anorektal malformasyonların etiyolojisinin belirlenmesinde kullanılacak yöntemler.....	34
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Yöntem.....	40
3.2. Verilerin Analiz Edilmesi.....	45
4. OLGULAR.....	48
5. BULGULAR.....	50
6. TARTIŞMA.....	54
7.SONUÇ.....	66
KAYNAKLAR.....	67
8.ÖZET.....	71
9. SUMMARY.....	73

10.ÖZGEÇMİŞ.....74

11.EKLER76



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1; Anorektal malformasyonların Wingspread sınıflandırması	15
Tablo 2; Anorektal malformasyonların Krickenbeck sınıflandırması	15
Tablo 3; Anorektal malformasyonlara eşlik edebilecek sistemik malformasyonlar*	18
Tablo 4; Anorektal malformasyonlu hastalarda tespit edilen kromozomal anomaliler* ..	22
Tablo 5; ARM hastalarında en sık görülen genetik sendromlar ve asosiyasyonlar	27
Tablo 6; Genecards ve OMIM veri tabanına göre ARM ile ilişkili genlerin listesi ve açık isimleri	33
Tablo 7; Bir CNV'nin patojenitesinin değerlendirilmesinde dikkate alınması önerilen kriterler*	39
Tablo 8; In-house veri tabanında 3 veya daha fazla bildirilmiş ve bu nedenle değerlendirmeye alınmayan CNV'ler	47
Tablo 9; Olguların demografik özellikleri, muayene bulguları ve tetkik sonuçları	49
Tablo 10; Olguların moleküler karyotipleme sonuçları	51
Tablo 11; Anorektal malformasyonlu ve kromozom 22q11 delesyonlu Olgu 8, Olgu 1, D2366, D275001 ve D287304 numaralı hastaların özelliklerinin karşılaştırılması	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Anorektal malformasyonların nedenlerine göre sınıflandırılması	16
Şekil 2; Olgu 1'in 22. kromozoma ait moleküler karyotipleme ideogramı	53
Şekil 3; Olgu 8'in moleküler karyotipleme ideogramı	53
Şekil 4; Hastaların delesyon bölgesinin şematik çizimi; Olgu 8 (gri), Olgu 1 (kırmızı), D2366 (yeşil), D275001 (turuncu) ve D287304 (mavi)	63
Şekil 5; Decipher veritabanında 275001ve 287304 numaralı hastaların delesyon bölgesinin UCSC veri tabanındaki görüntüsü; her iki hastanın delesyonun başlangıç noktası aynı olup <i>PRODH</i> ve <i>DGCR5</i> genlerini bölmektedir.	64

1.GİRİŞ

Anorektal malformasyonlar (ARM) cerrahi yöntemlerle tedavi edilen en yaygın doğumsal defektler (2-6/1000 canlı doğum) arasında yer almaktadır. Etiyolojisinde genetik nedenlerin ve çevresel etkenlerin birlikte rol alması nedeniyle multifaktöriyel hastalıklar grubunda sınıflandırılmaktadır (1). Anorektal malformasyonlar tek başına görülebileceği gibi, diğer sistemlere ait anomaliler de ARM'ye eşlik edebilmektedir. Anorektal malformasyonların iyi bilinen sebepleri arasında; kromozomal hastalıklar (Down sendromu, 22q11 delesyon sendromu gibi), tek gen hastalıkları (Currarino Sendromu, FG sendromu gibi) ve çevresel etkenler (gebelikte ilaç kullanımı, maternal diabetes mellitus gibi) sayılmaktadır (2).

Anorektal malformasyonlu hastalarda, %4.5 ile %11 arasında değişen sıklıklarda çeşitli kromozomal anomaliler bildirilmiştir (3-5). Bu nedenle, etiyolojik neden araştırması için seçilecek ilk yöntem olan kromozom analizi yöntemi ile 5 Mb düzeyine kadar olan sayısal veya yapısal; dengeli veya dengesiz kromozom anomalileri tespit edilebilmektedir. Daha küçük delesyon ve duplikasyonların (2-5 Mb arası) tespit edilmesinde amaca özgü probolar kullanılarak, floresan in situ hibridizasyon" (FISH) veya "multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu" (MLPA) yöntemleri uygulanabilmektedir. Array CGH gibi tüm genoma yönelik moleküler tabanlı sistemlerle ise, 2 Mb'dan daha küçük delesyon ve duplikasyonlar araştırılabilmektedir (6).

Bu çalışmada, anorektal anomalisi mevcut olmakla birlikte herhangi bir genetik sendromla ilişkilendirilmemiş olan ve sitogenetik analiz sonuçları normal bulunan 10 hastaya; anabilim dalımız bünyesinde Array CGH (8x60K ISCA) yöntemi ile yapılan moleküler karyotipleme sonuçları analiz edilerek, ortak bir etiyolojik neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1 Anorektal Malformasyonların Tanımlanması ve Embriyolojisi

Anorektal Malformasyon (ARM) her 10000 doğumdan 2 ila 6'sında görülen, fetal gelişimin 4. ve 8. haftaları arasında ürorektal septumun anormal gelişmesi nedeniyle oluşan bir konjenital malformasyondur (7). Cerrahi olarak kolayca düzeltilen önde yerleşimli anüsten, çok daha kompleks ve tekrarlayan cerrahiler gerektiren kloaka anomalisine kadar değişebilen, geniş yelpazede bir görülebilmektedir (8). Nadiren prenatal dönemde belirlenebiliyor olsa da genellikle postnatal dönemde tanı almakta ve klinik bulgu vermeyen hafif tip ARM'ler özellikle kız hastalarda kolaylıkla atlanabilmektedir. Erkeklerde görülme sıklığı kızlara oranla daha fazladır, erkek/kız oranı yaklaşık 1.2-1.6 olarak bildirilmektedir (9). Anorektal malformasyonların şiddeti de cinsiyete göre farklılık göstermektedir; kızlarda hafif bulgularla giden perineal ve vestibüler fistüllerin eşlik ettiği ARM tipleri daha sık görülürken, erkeklerde daha kompleks ARM tipleriyle karşılaşılma olasılığı yüksektir (10).

Gebeliğin 4. ve 8. haftaları arasında hindgutun hatalı embriyonik gelişimi nedeniyle meydana geldiği bilinmekle beraber, anormal anorektal gelişimin embriyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (11). Erken embriyonik dönemde gelişen primitif sindirim kanalının kör tüp şeklindeki arka bölümüne hindgut adı verilmektedir. Bu bölümden; transvers kolonun distal 1/3'ü, inen kolon, sigmoid, rektum ve anal kanalın üst parçası ile mesane ve üretra mukozaları gelişmektedir. Hindgutun kaudal parçası olan kloaka, embriyonik gelişimin ilerleyen

dönemlerinde ventral (ürogenital) ve dorsal (anorektal) kısımlara farklılaşmaktadır. Bu farklılaşmanın sağlanabilmesi için kloakanın, ürorektal septum adı verilen bir doku tarafından uzunlamasına iki kısma ayrılması gerekmektedir. Ürorektal septumun gelişim anomalileri ise anorektal malformasyonlara neden olmaktadır (11).

Anorektal malformasyonların nedeni bilinmemektedir, ancak ailesel olguların sıklıkla bildirilmesi nedeniyle hastalığın gelişmesinde çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı düşünülmektedir (1). Yapılan çalışmalarda, kaudal mezodermal gelişimde önemli rol oynayan Sonic Hedgehog (SHH) sinyal yolağı inhibe edilmiş hayvan modellerinde kloaka anomalisi geliştiği gösterilmiştir, ayrıca all-trans retinoik asite maruz bırakılan rat fetusleri ARM etiyojisinin araştırılmasında model olarak kullanılmıştır (11). Anorektal malformasyon ile doğan çocukların %40 ila 70'inde ek bir konjenital anomali görülmektedir (12). Tüm ARM hastalarının yaklaşık %10-15'i VACTERL (vertebral, anal, kardiak, trakeaözefageal, renal ve ekstremitte anomalisi) tanı kriterlerini karşılamaktadır, %10'una ise bir sendrom tanısı konulmakta veya kromozomal anomali belirlenmektedir (12).

2.2. Anorektal malformasyonların cerrahi sınıflandırması

Farklı cerrahi sınıflandırmalar olmakla birlikte; rektumun kör ucunun levator kaslar ile olan ilişkisine göre yapılan Wingspread sınıflandırmasında ARM'ler yüksek tip (supralevator), alçak tip (infralevator) ve yüksek veya alçak tipe

uymayan ara tip (intermediate) olmak üzere 3 temel gruba ayrılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1; Anorektal malformasyonların Wingspread sınıflandırması

Supralevator (Yüksek)	Intermediate (Orta)	İnfralevator (Alçak)	Diğer
<i>kız</i>			
Fistülsüz rektal atrezi	Fistülsüz anal agenezi	Anal stenoz	Kloakal malformasyon
Rektovajinal fistül	Rektovajinal fistül	Anokutanöz fistül	Nadir malformasyon
	Rektovestibüler fistül	Anovestibüler fistül	
<i>erkek</i>			
Fistülsüz rektal atrezi	Fistülsüz anal agenezi	Anal stenoz	Nadir malformasyon
Rektoprostatik fistül	Rektobulbar fistül	Anokutanöz fistül	

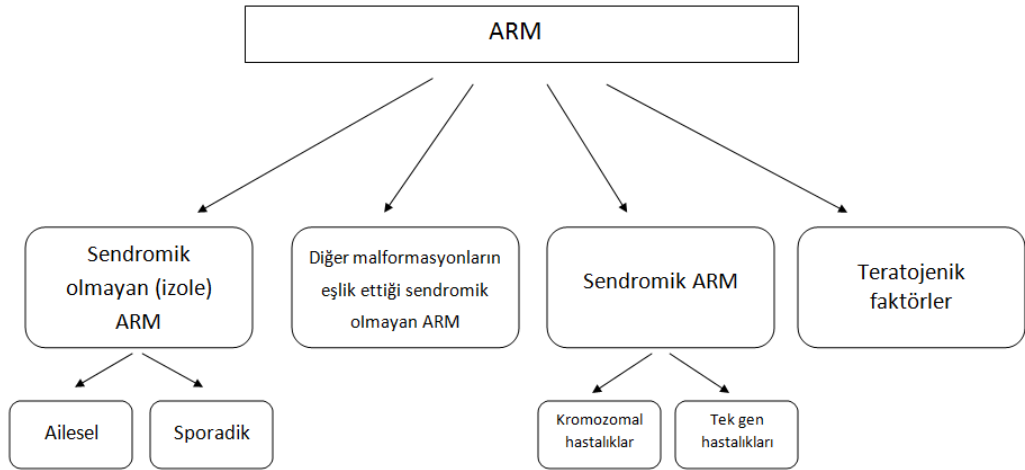
Bu geleneksel sınıflandırma zamanla yerini; tanı, tedavi ve prognoz açısından benzer hasta gruplarının bir araya toplandığı daha basit bir sınıflandırmaya (Krickenbeck sınıflandırması) bırakmıştır (Tablo 2) (13).

Tablo 2; Anorektal malformasyonların Krickenbeck sınıflandırması

Cinsiyet	İsmlendirme
Major grup	Perineal (kutanöz) fistül Rektouretral fistül Bulbar Prostatik Rektovesikal fistül Vestibüler fistül Kloaka Fistülsüz Anal stenoz
Nadir varyantlar	Poş kolon Rektal atrezi/stenoz Rektovajinal fistül H tipi fistül Diğerleri

2.3. Anorektal malformasyonların etiolojik sınıflandırılması

Anorektal malformasyon sadece izole bir patolojik bulgu olabileceği gibi (sendromik olmayan), daha kompleks bir fenotipin parçası da olabilir (sendromik). Ailede etkilenmiş tek bir birey olabileceği gibi (sporadik), aynı ailede birden fazla birey etkilenebilmektedir (ailesel) (Şekil-1). Tüm ARM'lerin yaklaşık %50'si bir sendrom, kompleks multipl anomali veya bir kromozomal hastalıkla ilişkiliyken, %50'si izole görülmektedir (14). Kromozomal hastalıkların %4.5 ile %11'inde ARM'nin bir bulgu olarak eşlik ettiği bildirilmektedir (8).



Şekil 1: Anorektal malformasyonların nedenlerine göre sınıflandırılması

2.3.1. Sendromik olmayan (izole) ARM'ler

İzole ARM'ler iki sınıfta incelenebilmektedir;

- Ailesel ARM olguları; aynı aileden birden fazla bireyde ARM tespit edilen

- Sporadik olgular; ailenin tek bir bireyinde ARM görülen

Ailesel ARM'lerde çeşitli kalıtım modelleri tanımlanmıştır. Literatürde tanımlanan ailesel 11 olgunun; 7'si otozomal dominant (OD), 1 tanesi otozomal resesif (iki etkilenmiş çocuk ve sağlıklı ebeveynler olması nedeniyle) kalıtım modeli ile uyumlu bulunmuştur. Üç ailede ise otozomal veya X'e bağlı kalıtım modeli ayırımı yapmak mümkün olmamıştır (8).

Özellikle OD kalıtım modeline uyan olgularda, değişken ifadenme nedeniyle, önde yerleşimli anüs gibi yakınmasız aile bireyleri kolaylıkla gözden kaçırılabilir. Bu nedenle ailede bir olgu saptandığında ebeveynlerin ve kardeşlerin ayrıntılı bir şekilde muayene edilmeleri gerekmektedir (15).

Ailesel olmayan olgularda ise; etkilenmiş bireyin birinci derece akrabalarında ARM ortaya çıkma riski, aile öyküsünde ARM olmayan bireylere göre yüksek bulunmuştur. Özellikle etkilenmiş bireyin kız cinsiyete sahip olması bu riski belirgin biçimde artırmaktadır. Bu nedenle ARM hastalarının değerlendirilmesinde iyi öykü alma ve aile bireylerin doğru bilgilendirilmesi önem taşımaktadır (13).

2.3.2 Diğer sistemik malformasyonların eşlik ettiği ancak sendromik olmayan ARM'ler

Anorektal malformasyon ile doğan bir hasta için en önemli prognostik faktörlerden birisi de eşlik edebilecek diğer malformasyonların erken dönemde tespit edilmesidir. Anorektal malformasyon ile doğan çocukların %40 ila 70'inde ek bir konjenital anomali görülmektedir (12). Tüm ARM tiplerine en sık ürolojik

anomaliler (%25-55) eşlik etmektedir, tek başına veziköüretal reflü %20-47 oranında görülmektedir. Bunun yanında; genital (kızlarda daha fazla), vertebral, diğer iskeletal, spinal kord ile ilişkili, kardiak, gastrointestinal ve trakeoözefageal anomaliler ARM'ye eşlik edebilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3; Anorektal malformasyonlara eşlik edebilecek sistemik malformasyonlar*

Anomali	Literatürde bildirilen görölme sıklığı	Tespit edildiği görüntüleme yöntemi
Ürolojik	%25-55	USG, IVU
Vesiköüretalreflü (VUR)	%20-47	USG, İSU
Genital	%3-18 (erkek), %26-39 (kız)	
Vertebral	%25-38	DG, MR
Diğer iskeletal	%13-16	DG
Spinalkord ilişkili	%8-6	DG, MR
Kardiak	%10-17	EKG, ekokardiografi
Gastrointestinal	%7-10	DG, biyopsi
Trakeaözefageal	%6-8	
Diğer	%4-5	

* Kaynak; Holschneider, A.M. and J.M. Hutson, Anorectal malformations in children: embryology, diagnosis, surgical treatment, follow-up 2006: Springer Science & Business Media (8).

USG: Ultrasonografi, IVU: intravenöz üetrogram, İSU: işeme sistoüetrogramı, DG: direk grafi, EKG: elektrokardiogram, MR: manyetik rezonans görüntüleme

Anorektal malformasyona eşlik eden diğer sistemik anomaliler iyi bilinen bir sendromun parçası olabileceği gibi, sadece rastlantısal olarak ARM ile birlikte bulunan bir anomali de olabilir. Bu nedenle klinik değerlendirmenin dikkatle yapılması çok önemlidir. Ratan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada incelenen 416 ARM hastasının (%68'i erkek, %32'si kız) %58'inde ek anomali tespit edilmiştir. Yüksek tip ARM erkek hastalarda, kız hastalara oranla 5 kat fazla görülmüştür ve yüksek tip ARM'ye diğer sistem anomalilerinin eşlik etme olasılığı diğer tiplere göre 13 kat fazladır. Erkek hastalarda diğer sistem anomalilerinin eşlik etme olasılığı da kız hastalara oranla 4 kat fazladır. İzole ARM'lerde ise durum tam tersidir; cinsiyet seçilimi göstermez ve alçak tip ARM, yüksek tip ARM'den iki kat fazla görülmektedir. Ratan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre; yüksek tip ARM'li erkek hastalara en sık eşlik eden gastrointestinal anomaliler (en çok kısa megakolon) iken, alçak tip ARM'li erkek hastalarda en çok genital sistem anomalileri birlikteliği görülmektedir. Diğer yandan yüksek tip ARM'si olan kız hastalarda vertebra dışı iskelet ve üriner sistem anomalileri daha sık görülmekteyken, alçak tip ARM'si olan kız hastalarda vesikoüretalreflü (VUR) sık görülmektedir. Ratan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya dahil edilen tüm ARM'li hastaların %50'sinde 2, %29'unda 3 ve %16'sında 4 ayrı sistemde daha anomali olduğu görülmüştür (16).

Anorektal malformasyona eşlik eden anomalilerin analiz edilmesi, ARM'ye neden olan genlerin belirlenmesi için bir başlangıç noktası olacağından önemlidir. Bu alandaki çalışmalar daha çok vertebral, gastrointestinal ve genitoüriner sistemlere odaklanmıştır (10).

Hirschsprung hastalığı (HH) ile ilgili birden fazla gen tanımlanmıştır, bu hastalığın ARM ile birlikteliği, yayınlar arasında oranlar değişmekle beraber, %3 ile %60 arasındadır. Bir hipoteze göre yayınlar arasında bildirilen oranların farklı olmasının sebebi tanı koymada kullanılan teknikler olabilir. Enzimohistokimyasal teknikle çalışılan biyopsi örneklerinde ARM hastalarının %97'sinde anormal innervasyon tespit edilmiştir. Bu bilgi ARM ile ganglion dağılım anomalilerinin birlikteliğinin nadir olmadığını göstermektedir. Bu nedenle ARM'ye sebep olan genler arasında HH'da mutasyon tanımlanan genler sıkça araştırılmıştır (10).

2.3.3 Sendromik ARM'ler

Sendromik ARM'lerin iyi bilinen sebepleri arasında; kromozomal hastalıklar (Down sendromu, 22q11 delesyon sendromu gibi), tek gen hastalıkları (Currarino Sendromu, FG sendromu gibi) ve çevresel etkenler (gebelikte ilaç kullanımı, maternal diabetes mellitus gibi) sayılmaktadır (2).

2.3.3.1. Kromozomal Hastalıklar

Anorektal malformasyonlu hastalarda kromozomal anomaliler %4.5 ile %11 arasında değişen sıklıklarda bildirilmiştir (3-5). Bu sık görülen birliktelik nedeniyle, ARM tanısı konulan hastalara, özellikle diğer sistemlere ait ek bulgular ve/veya dismorfik özellikler eşlik ediyorsa, yüksek rezolüsyonlu kromozom analizi yapılması altta yatan nedenin belirlenmesinde önemli olmaktadır. Bu yöntemle 3 Mb düzeyine kadar olan sayısal veya yapısal; dengeli veya dengesiz kromozom anomalileri tespit edilebilmektedir. Daha küçük delesyon ve duplikasyonların tespit edilmesinde amaca özgü prob kullanılarak, floresan in situ hibridizasyon" (FISH) veya "multipleks ligasyon bağımlı prob

amplifikasyonu” (MLPA) yöntemleri uygulanabilmektedir. Array CGH gibi tüm genomaya yönelik moleküler tabanlı sistemlerle ise, 2 Mb’dan daha küçük delesyon ve duplikasyonlar araştırılabilmektedir (6).

Kromozomal anomalilerin tespit edilmesi, öncelikle hastanın kesin tanısı açısından fayda sağlamaktadır. Ayrıca kırık bölgelerinde yer alan veya delesyonu/duplikasyonu belirlenen genler, ARM’nin genetik sebepleri araştırılırken aday genler olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple ARM ile ilişkili kromozomal anomalilerin belirlenmesi ve literatürde paylaşılması gelecek çalışmalar için temel oluşturmaktadır.

Cuschieri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; ARM tanısı konulan, prenatal, postmortem veya yaşayan 1846 hastanın 129’unda (%11) kromozomal anomali saptanmıştır ve en sık görülen kromozomal hastalık olan Down sendromunun ARM’li hasta popülasyonunda görülme sıklığı normal popülasyona göre 15 kat artmıştır. Bildirilen diğer anomaliler ise Tablo 4’te özetlenmiştir (4).

Tablo 4; Anorektal malformasyonlu hastalarda tespit edilen kromozomal anomaliler*

Kromozomal anomali	En bilinen özellikleri	Hasta sayısı
Trizomi 21 (Down Sendromu)	EY, karakteristik yüz görünümü	39
Trizomi 18 (Edward Sendromu)	EY, pençe el, kardiak anomali (VSD, ASD, PDA)	20
Trizomi 13 (Patau Sendromu)	EY, holoprozensefali, yarık damak/dudak	12
Mozaik trizomi 8	EY, derin palmar ve plantar çizgiler, dolgun dudak ve büyük kulak	1
Cinsiyet kromozom anöplidisi	Değişken	4
Trizomi 22 (Cat-eye Sendromu)	İris kolobomu, anal atrezi, kulak önünde pit, renal ve kardiak anomaliler	3
5p delesyonu (Cri-Du Chat sendromu)	EY, hipertelorizm, epikantus, mikrosefali, tiz sesli ağlama	3
Ring 13	Anal atrezi, ventrikülomegali, baş parmak agenezisi, ambigu genitalya	3
Marker kromozom	Değişken	3
Tetrazomi 12p (Pallister-Killian)	EY, frontotemporal bölgede seyrek saçlar, uzun filtrum, ince üst dudak, cubid-bow ağız yapısı	2
Triploidi	Büyük plasenta ve hidatiform değişiklikler, büyüme geriliği	1
Diğer parsiyel trizomi/monozomi	Değişken	21
Diğer kromozomal anomaliler	Değişken	17
Toplam		58

*Cuschieri ve arkadaşlarının 1846 ARM hastası ile yaptığı çalışmada tespit edilen kromozom anomalileri esas alınarak hazırlanmıştır (4).

EY: entelektüel yetersizlik, VSD: ventriküler septal defekt, ASD: atrial septal defekt, PDA: patent duktus arteriozus

Marcelis ve arkadaşlarının 518 ARM hastası ile yaptığı bir başka çalışmada, 26 hastada (%5) kromozom anomalisi saptanmıştır. Down sendromu yine en sık görülen kromozomal anomali olup, 11 hastada tespit edilmiştir. İki hastaya, 22q11 delesyon sendromu tanısı konulmuştur. Birden fazla sayıda görülen anomalilerden biri de; 5p delesyon (Cri-Du Chat) sendromudur (17, 18).

Marcelis ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı derlemeye göre; literatürde DS dışlandığında toplam 114 ARM hastasında kromozomal anomali tespit edilmiştir. Bu hastalardan 48'i kız, 66'sı erkektir. En sık görülen kromozomal anomali 20 olguda tespit edilen 13q terminal delesyonudur. İkinci sırada 19 olguda tanımlanan Cat-Eye sendromu (tetrazomi 22pter-q11) gelmektedir. Sekiz olguda ise dengesiz 11;22 translokasyonu (11q23qter ve 22q11.2qter duplikasyonu) gösterilmiştir. Birden fazla sayıda tespit edilen diğer kromozomal anomaliler ise; 6 olguda Pallister Killian sendromu (PKS, tetrazomi 12p) ve 5 olguda 10q terminal delesyonu olarak rapor edilmiştir (18).

Tüm kromozomal hastalıklar göz önüne alındığında ARM'li hastalarda kromozom anomalisi ile en çok ilişkilendirilen ARM tipi, fistülsüz alçak tip olmaktadır, bunların büyük bir kısmını Down sendromlu hastalar oluşturmaktadır (4). Down sendromu dışlandığında ise tablo tamamen değişmiş, kromozomal anomaliler ile ARM tipleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir (18).

Down sendromu, 22q11 delesyon sendromu ve Cat-eye sendromu ARM nedenleri arasında en sık görülen kromozomal hastalıklardır. Bu sebeple bu üç hastalığın ARM ile ilişkisi hakkında aşağıda detaylı olarak bahsedilmiştir.

2.3.3.1.1. Down Sendromu (DS)

İyi tanımlanmış yüz özellikleri (brakisefali, upslant palpebral fissürler, epikantus, basık burun kökü, büyük dil, klinodaktili ve sandal gap gibi) nedeniyle klinik olarak kolaylıkla tanınabilen Down Sendromu, insanda mental retardasyonun bilinen en sık sebebidir. Konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle tanısı doğrulanabilen bu sendromda konjenital malformasyonlar hastaların %30-40'ında sendroma eşlik etmektedir. Konjenital kalp anomalisi, duodenal atrezi, Hirschsprug hastalığı ve anorektal malformasyonlar sık görülen bulguları arasındadır (19).

Literatürde ARM'li hastalarda DS sıklığı %2 ila %5 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir (3-5). Japon popülasyonundan 1992 ARM hastasında yapılan bir çalışmada, hastaların %5.1'inde (101 hastada) DS saptanmıştır. DS saptanan 101 hastanın 96'sında (%95'inde) fistülsüz tip ARM mevcuttur. Çalışmaya göre DS hastalarda intermediate tip ARM'ler belirgin olarak daha fazla görülmektedir. ARM ve DS birlikteliği görülen hastaların %95'inde mevcut ARM tipi, fistülsüz imperfore anüs şeklinde olmaktadır (20).

2.3.3.1.2. Delesyon 22q11 Sendromu

“Velokardiofasyal sendrom (VCFS)” ve “Di George Sendromu” gibi farklı isimleri de olan bu sendromun başlıca klinik özellikleri; konjenital kalp hastalıkları (Fallot tetralojisi, VSD, trunkus arteriosus gibi konotrunkal anomaliler), palatal anomaliler (velofaringeal yetmezlik, bifid uvula, yarı damak gibi), karakteristik yüz bulguları (uzun yüz, silindirik-tübüler burun, arkaya düşük, fazla katlantılı ve düşük yerleşimli kulaklar gibi), öğrenme güçlüğü,

davranışsal ve psikiyatrik problemler olarak bildirilmiştir. Daha nadir bulguları arasında; immün yetmezlik, hipokalsemi, gastrointestinal anomaliler (imperfore anüs, özefagus atrezisi gibi), renal anomaliler, işitme kaybı, otoimmün hastalıklar, psikotik bozukluklar ve otizm sayılabilmektedir (21).

Konjenital kalp hastalıkları, palatal anomaliler, karakteristik yüz bulguları ve öğrenme güçlüğü ile karakterize bir sendrom olan 22q11 delesyon sendromu; en yaygın görülen mikrodelyon sendromu olma özelliğine sahiptir. Kalp anomalileri başlıca klinik bulgular arasında yer almakla beraber, sadece psikotik bozukluk bildirilen hastalar ve asemptomatik bireyler de bildirilmiştir. Sendromun daha nadir bulguları arasında; immün yetmezlik, hipokalsemi, gastrointestinal anomaliler (imperfore anüs, özefagus atrezisi gibi), renal anomaliler, işitme kaybı, otoimmün hastalıklar, psikotik bozukluklar ve otizm sayılabilmektedir (21). Sendroma eşlik eden gastrointestinal sistem anomalileri arasında yutma güçlüğü, kabızlık, imperfore veya önde yerleşimli anüs bildirilmiştir (22).

Sendroma eşlik edebilecek bir diğer malformasyon, genitoüriner anomalilerdir ve hastaların %31'inde görüldüğü bildirilmiştir. İnmemiş testis hastaların yaklaşık %6'sında sendromun bir bulgusu olarak ortaya çıkmaktadır (23)

Kalp anomalisi, velofaringeal yetmezlik veya dismorfik yüz özellikleri gibi karakteristik bulguların varlığında; FISH, MLPA veya kromozomal mikroarray yöntemlerinden biri ile tanı kesinleştirilebilmektedir (22).

22q11 delesyonuna sahip olguların %90'ı de novo iken, küçük bir kısmı bir ebeveyninden kalıtılmaktadır (24).

2.3.3.1.3. Cat-Eye Sendromu (CES) (#115470)

İris kolobomu, anal atrezi (fistülün eşlik ettiği tip), göz kapağı kenarlarının aşağı dönük olması ve kulak önünde pit ya da cilt katlantısı ile karakterize bir kromozomal anomalidir. Hastaların yaklaşık yarısında çeşitli derecelerde öğrenme güçlüğü mevcuttur. Hastalarda sıklıkla kardiyak ve renal anomaliler de bildirilmiştir. Hastalığın tanısı kromozom analizinde 21. kromozomdan daha küçük, genellikle iki sentromerden oluşan ve 22q11.2 bölgesine ait ekstra kromozomal materyalin FISH yöntemi ile tespit edilmesiyle konulmaktadır (25).

CES, en sık de novo olarak kalıtılmakta olsa da, nadiren marker kromozomu mozaik olarak taşıyan, etkilenmemiş ebeveylere çocuğa geçebilmektedir (8).

Schinzel ve arkadaşları tarafından yapılan bir derlemede; CES tanısı almış 34 hastanın 22'sinde ARM tespit edilmiştir. ARM 'nin türü, hastaların tamamında fistülün eşlik ettiği anal stenozdur (26). Liehr ve arkadaşlarının çalışmasında; CES tanılı 6 hastanın tamamında anal stenoz mevcuttur (27). Bu bilgiler göstermektedir ki CES, ARM görülme olasılığı en yüksek kromozomal anomalilerden birisidir (18).

2.3.3.2 ARM ile ilişkili genetik sendromlar

ARM'nin eşlik ettiği genetik sendrom ve asosiasyonlar Tablo 5'te gösterilmiştir. Bu sendromlar arasında ARM'nin bir bulgu olarak en çok ön

planda olduğu; Townes-Brocks Sendromu (TBS), Pallister-Hall Sendromu (PHS), FG Sendromu (FGS), Currarino Sendromu (CS), VACTERL/VATER assosiasyonu ve Kaudal Regresyon Sendromu (CRS)/Sirenomeli hakkında ayrıca özet bilgiler verilmiştir (8).

Tablo 5; ARM hastalarında en sık görülen genetik sendromlar ve asosiyasyonlar

Sendrom/Asosiasyon	En Bilinen Özellikleri	OMIM numarası	Kalıtım Paterni	Bilinen lokus veya gen
Townes-Brocks Sendromu (TBS)	ARM, trifalangeal başpamak, işitme kaybı, dış kulak yolu atrezisi, renal anomali	#107480	OD	<i>SALL1</i>
PallisterHall Sendromu (PHS)	Hipotalamik hamartom, postaksiyel polidaktili, anal atrezi	#146510	OD	<i>GLI3</i>
Opitz-Kaveggia/FG Sendromu (FGS)	EY, makrosefali, kabızlık, upsweep, hipotoni	#305450	XR	<i>MED12</i>
Currarino Sendromu (CS)	ARM, presakral kitle ve sakral agenezi/disgenezi	#176450	OD	<i>MNX1</i>
VACTERL/VATER	Vertebral anomali, ARM, kardiak anomali, trakeoözefageal fistül, renal anomali ve ekstremitte anomalisi	#192350	OD veya Sporadik	<i>HOXD13</i>
Kaudal Regresyon Sendromu (CRS)/Sirenomeli	Spinal kolon agenezisi, ARM ve genitoüriner anomaliler	#600145	OD	<i>VANGL1</i>
Opitz G Sendromu	Hipertelorizm,	#300000	XR	<i>MID1</i>

	hipospadias, yutma güçlüğü			
Fraser Sendromu	Kriptoftalmus ve sindaktili	#219000	OR	<i>FRAS1</i>
Johanson-Blizzard Sendromu	Hipoplastik ala nasi, işitme kaybı, pankreas yetmezliği ve hipotiroidizm	#243800	OR	<i>UBR1</i>
CHARGE Sendromu	Kolobom, koanal atrezi, kalp anomali, MR, genital anomali ve displastik kulak	#214800	Sporadik veya OD	<i>CHD7,</i> <i>SEMA3E</i>
EEC Sendromu	Ektrodaktili, ektodermal dislazi, yarı damak/dudak	#129900	OD	<i>TP63</i>
McKusick-Kaufman Sendromu	Hidrometrokolpos, Hirschsprung, hidronefroz	#236700	OR	<i>MKKS</i>

OD: otozomal dominant, OR: otozomal resesif, XR: X'e bağlı resesif, EY:

Entelektüel yetersizlik

2.3.3.2.1 Townes-Brocks Sendromu (TBS)

Townes-Brocks Sendromu, renal-kulak-anal-radial sendrom olarak da bilinmektedir. Karakteristik bulguları arasında; ARM, baş parmak anomali (trifalangeal başparmak, preaksiyel polidaktili gibi), kulak anomali (sensörinöral işitme kaybı, dış kulak yolu atrezisi gibi) sayılmaktadır. Bunların dışında kalp anomali (Fallot tetralojisi, ventriküler septal defekt gibi), genitoüriner sistem anomalileri (displastik böbrek, VUR, hipospadias gibi) eşlik edebilmektedir.

Ekstremiteler, anüs ve kulak anomalileri hastalığının major kriterlerini oluşturur ve üçünün birlikte görülmesi tanıyı oldukça kuvvetlendirmektedir. İki major bulgusu olan hastalarda ise, eşlik eden (renal ve kardiyak) anomalilerin olması, atipik bulguların olmaması (trakeoözofageal fistül, vertebra anomalisi gibi) durumunda klinik tanı konulabilmektedir. Tanının kesinleştirilebilmesi için hastada TBS'ye neden olduğu bilinen tek gen olan *SALL1* geni için yapılan dizi analizi yöntemi ile mutasyonlar belirlenebilmektedir, ancak hastaların sadece %64-83'ünde *SALL1* gen mutasyonu gösterilebilmiştir (8). *SALL1* genini içeren 16q12.1 bölgesinin delesyonlarının TBS'ye yol açtığını gösteren yayınlar mevcuttur. Ayırıcı tanıda Goldenhar ve Holt-Oram sendromları ile VACTERL assosiasyonu göz önünde bulundurulmalıdır (25).

Townes-Brocks Sendromu tanısı prenatal dönemde, 18. ve 20. haftalar arasında ayrıntılı ultrasonografi yapılarak konulabilmektedir. Anorektal malformasyonun prenatal dönemde ultrasonografi yöntemiyle belirlenmesi oldukça zor olsa da ekstremiteler, kulak anomalileri ve renal anomaliler bu dönemde tespit edilebilmektedir (28). *SALL1* mutasyonu tespit edilen olgularda ise prenatal tanı yöntemleriyle ailenin sağlıklı çocuk sahibi olması sağlanabilmektedir.

2.3.3.2.2 FG (Opitz-Kaveggia) Sendromu (FGS)

Öğrenme güçlüğü (%97), makrosefali (%74), anal anomaliler (%38), kabızlık (%69), hipotoni (%90), upsweep (%91) ve korpus kallosum agenezisi ile karakterize bir sendromdur. Santral sinir sistemi tutulumu (epilepsi, hidrocefali, megalensefali, migrasyon defekti, korpus kallosum agenezisi gibi), dismorfik özellikler (frontal belirginlik, hipertelorizm gibi) ve genital anomaliler (inmemiş

testis, hipospadias, inguinal herni gibi) diğer tanı koydurucu bulgularıdır. X'e bağlı resesif kalıtım modeline sahip FG sendromu; erkeklerde daha sık görülür ve taşıyıcı kızlar nadiren semptomatiktir (25).

Hastalığa sebep olan, Xq13' de yer alan *MED12* geni tiroid hormon reseptörü ile ilişkili proteini kodlar. Klinik tanının kesinleştirilmesi için FG sendromuna yol açan diğer genler olan; *FLNA* (Xq28.2; FGS2, özellikle periventriküler nodüler heterotopi varlığında), *CASK* (Xp11.4; FGS4), *UPF3B* (Xq25-26; FGS6), *BRWD3* (Xq21.1; FGS7) için de DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyonların araştırılması önerilmektedir (29).

2.3.3.2.3. Pallister-Hall Sendromu (PHS)

Hipotalamik hamartom (panhipopitütarizm ve puberte prekoks), polidaktili (çoğunlukla santral), imperfore anüs, solunum yolu anomalileri (bifid epiglot gibi) sendromun karakteristik bulgularıdır. Pallister-Hall Sendromunun moleküler tanısı *GLI3* geninde mutasyonların gösterilmesi ile konulmaktadır. Greig sefalopolisindaktili sendromu, PHS ile allelik bir hastalıktır, her ikisinin de etiolojisinde *GLI3* gen mutasyonları yer almaktadır. Hastalıkla ilgili eksik penetrans daha önce bildirilmemiştir, ancak değişken ifadelenme nedeniyle klinik bulguların ağırlığı aile içerisindeki bireylerde farklı olabilmektedir (8).

2.3.3.2.4. VATER/VACTERL Assosiasyonu

VACTERL; vertebral anomali, Anal atrezi, kardiyak anomali, trakeoözefageal fistül, renal anomaliler ve ekstremitte anomalilerini (genellikle radial yol anomalileri, baş parmak yokluğu gibi) içeren bir akronimdir. Birden

fazla sistemi tutabilen bu assosiasyonun embriyonik hayatın 4. haftasında meydana gelen gelişimsel bozukluk nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir. Yaklaşık on bin doğumda bir görülmekte olan bu hastalıkta olguların tamamına yakını sporadiktir. VACTERL hastalarında kromozom anomalileri bildirilmiştir; trizomi 18, kromozom 13q delesyonu, ring kromozom 12, kromozom 6q13q15 delesyonu ve kromozom 22q11 delesyonu bunlardan bazılarıdır. VACTERL assosiasyonu bulgularına sahip hastalarda *SHH*, *HOXD13*, *ZIC3*, *PTEN*, *FANCB*, *FOXF1* ve *TRAP1* genlerine ait mutasyonlar da gösterilmiştir, ancak başka olgularla doğrulanmadıkları için bu genler henüz aday gen konumundadır ve hastalığın etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (8).

2.3.3.2.5. Currarino Sendromu (CS)

Currarino sendromunun triadı; presakral kitle, ARM ve sakral agenezi/disjenezi (hemisakrum veya orak şeklinde sakrum) olarak tanımlanmaktadır. Presakral kitle; anterior meningesel, teratom, dermoid kist, rektal duplikasyon veya sınıflandırılmamış malign bir tümör olabilmektedir. Bunlar dışında ürolojik anomaliler (vesikoüretalreflü, displastik böbrek gibi) veya jinekolojik malformasyonlar (bikorne uterus, septat vajina, bifid klitoris gibi) hastalığa eşlik edebilir. Kız hastalarda, erkeklere oranla 1.7 kat fazla görülmektedir. Currarino sendromu, *MNX1* gen mutasyonları nedeniyle meydana gelmektedir (8).

2.3.4. Teratojenik Faktörler

Anorektal malformasyonların nedenleri arasında çevresel etkenler önemli yer tutmaktadır. Annenin gebelik sırasında kullandığı ilaçlardan olan talidomid

(anjiogenezi inhibe ederek) ve benzodiazepin grubu ilaçlar (özellikle lorazepam) ARM ile ilişkilendirilmiştir. Gebelik sırasında annenin maruz kaldığı yüksek doz retinoik asit (Shh sinyal yolağı ve *BMP4* inhibisyonu yaparak) ve etretinat (hayvan modellerinde Currarino sendromuna yol açtığı görülmüş) gibi toksinlerin de ARM etiolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Sitomegalovirüs ve toksoplasma enfeksiyonlarının fetal dönemde ARM bulgularına yol açabileceği (yaygın bir bulgu olmamakla beraber) bildirilmiştir. Çoğul gebelik, preterm geliş, düşük doğum ağırlığı ve maternal obezite ARM'ye yatkınlık yarattığı gösterilmiş prenatal risk faktörleridir (12).

Çeşitli epigenetik hastalıklara yol açtığı bilinen; IVF (in vitro fertilizasyon) ve ICSI (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) gibi yardımcı üreme tekniklerinin ARM için artmış risk oluşturduğu gösterilmiştir (30).

Çevresel etkenler de sıklıkla sorgulanmış ancak gebelikte sigara kullanımı, annenin tekrarlayan abortus öyküsü ve elektromanyetik alan maruziyeti gibi faktörlerin ARM ile ilişkisi bulunamamıştır (8).

2.4. Anorektal malformasyon etiolojisinde rol oynayan genler

Anorektal malformasyondan sorumlu olduğu bilinen en önemli gen Sonic Hedgehog (SHh) sinyal yolağında yer alan genlerdir (2). Bunun dışında; farklı veritabanlarında ARM gelişimi ile ilişkili olabilecek birçok gen tanımlanmıştır.

Genecards ve OMIM veri tabanlarına göre; bugüne kadar ARM etiolojisi ile ilişkilendirilmiş genler Tablo 6'da özetlenmiştir (19, 31).

Tablo 6; Genecards ve OMIM veri tabanına göre ARM ile ilişkili genlerin listesi ve açık isimleri

Gen	Genin Açık İsmi
<i>FREM1</i>	FRAS1 Related Extracellular Matrix 1
<i>MNX1</i>	Motor Neuron And Pancreas Homeobox 1
<i>SALL1</i>	Spalt-Like Transcription Factor 1
<i>SALL4</i>	Spalt-Like Transcription Factor 4
<i>TP63</i>	Tumor Protein P63
<i>WT1</i>	Wilms Tumor 1
<i>FUZ</i>	Fuzzy Planar Cell Polarity Protein
<i>GLI3</i>	GLI Family Zinc Finger 3
<i>FGFR2</i>	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
<i>MID1</i>	Midline 1
<i>SPECC1L</i>	Sperm Antigen With Calponin Homology And Coiled-Coil Domains 1-Like
<i>TWIST1</i>	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
<i>MSX2</i>	Msh Homeobox 2
<i>GLI2</i>	GLI Family Zinc Finger 2
<i>VANGL1</i>	VANGL Planar Cell Polarity Protein 1
<i>RECQL4</i>	RecQ Helicase-Like 4
<i>SHH</i>	Sonic Hedgehog
<i>FGF10</i>	Fibroblast Growth Factor 10
<i>RUNX2</i>	Runt-Related Transcription Factor 2
<i>BMP4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4
<i>MMP9</i>	Matrix Metalloproteinase 9
<i>RET</i>	Ret Proto-Oncogene
<i>NPY</i>	Neuropeptide Y
<i>TNF</i>	Tumor Necrosis Factor
<i>PCNA</i>	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<i>MTHFR</i>	Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)
<i>EFNB2</i>	Ephrin-B2
<i>LEP</i>	Leptin
<i>EDNRB</i>	Endothelin Receptor Type B
<i>REN</i>	Renin
<i>LBX1</i>	Ladybird Homeobox 1
<i>VIM</i>	Vimentin
<i>ALB</i>	Albumin

<i>POMC</i>	Proopiomelanocortin
<i>GDNF</i>	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
<i>LHFPL5</i>	Lipoma HMGIC Fusion Partner-Like 5
<i>SLC25A19</i>	Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Thiamine Pyrophosphate Carrier)
<i>CALCA</i>	Calcitonin-Related Polypeptide Alpha
<i>HOXD</i>	Homeobox D Cluster
<i>MECP2</i>	Methyl CpG Binding Protein 2
<i>HGF</i>	Hepatocyte Growth Factor (Hepapoinetin A; Scatter Factor)
<i>WNT5A</i>	Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5A
<i>LEPR</i>	Leptin Receptor
<i>SRPK1</i>	SRSF Protein Kinase 1
<i>TAOK1</i>	TAO Kinase 1
<i>CDH15</i>	Cadherin 15, Type 1, M-Cadherin (Myotubule)

2.5. Anorektal malformasyonların etiolojisinin belirlenmesinde kullanılabilir yöntemler

Anorektal malformasyonların nedeni araştırılırken, öncelikle ayrıntılı bir anamnez ile hastanın prenatal maruziyetlerinin, aile öyküsünün ve ek şikayetlerinin öğrenilmesi gerekmektedir. Detaylı bir pedigrî çizilmesi ve ailedeki diğer bireylerin semptomlarının da sorgulanması tanıya yardımcı olabilmektedir. Fizik muayene ile dismorfik bulguların kaydedilmesi ve gerekli görüntüleme yöntemleri kullanılarak hastada ARM'ye eşlik eden diğer sistem anomalilerinin belirlenmesi ayırıcı tanı açısından faydalı olmaktadır. Bütün bu veriler ışığında elde edilen klinik ön tanıların, sitogenetik, moleküler-sitogenetik ve moleküler yöntemlerle doğrulanması tanının kesinleştirilmesi açısından gereklidir.

Tek gen hastalıklarının tanısı için; DNA dizi analizi, tüm ekzom dizileme veya tüm genom dizileme yöntemleri kullanılabilir. Kromozomal

hastalıkların tanısı için ise; öncelikle yüksek rezolüsyonlu kromozom analizi ve buna ek olarak “floresan in situ hibridizasyon” (FISH), “multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu” (MLPA), Q-PCR, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) ve Array CGH yöntemlerinin kullanılması faydalı olabilmektedir (6).

Kromozom analizi ile; G bantlama tekniği kullanılarak yaklaşık 10 Mb büyüklüğündeki değişiklikleri saptanabilmektedir, daha yüksek rezolüsyonlara çıkıldığında ise 3-5 Mb düzeyinde değişiklikler tespit edilebilmektedir. Üç Mb'dan küçük submikroskopik değişimlerin kromozom analizi düzeyinde tespit edilmesi mümkün olmadığı için FISH tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemde amaca özgü DNA probları (lokus spesifik, subtelomerik) kullanılarak 150 Kb veya daha büyük değişimlerin yeri ve sayısı belirlenebilmektedir (6).

Hibridizasyon temelli mikroarray uygulamaları (SNP array ve array CGH) ile daha büyük değişimlerin yanı sıra 100 Kb altındaki kopya sayısı değişiklikleri (CNV) de tespit edilebilmektedir.

Karşılaştırmalı array genomik hibridizasyon yöntemi ile hem benign hem de genetik hastalıklarla ilişkilendirilmiş patojenik kopya sayısı değişiklikleri belirlenebilmektedir. Bazı genler hücrel yolaklar açısından çok kritiktir ve genin tek bir kopyasının kayıp ya da kazancı durumunda bile hücrel işleyiş bozulabilmektedir. Genin tek kopyasındaki kayıpta fenotipik bulguların ortaya çıkması haploid yetersizlik olarak tanımlanmaktadır. Kopya sayısı değişiklikleri; genomik kazanç veya kayıp bölgelerindeki bir veya daha fazla genin dozaj

duyarlılığı nedeniyle hastalığa sebep olabileceği gibi genin kesintiye uğraması (disruption), gen füzyonları veya pozisyon etkisi nedeniyle de fenotipik bulgulara yol açabilmektedir (32).

Array CGH, genomik kopya sayısı değişikliklerinin belirlenebilmesi için güçlü bir araçtır. Prob sayısı arttıkça genomik rezolüsyon artmakta ve intragenik delesyon ve duplikasyonların belirlenebilmesi mümkün olmakta ancak maliyet artmaktadır. İntragenik delesyon ve duplikasyonlar birçok moleküler ve fenotipik etkiye yol açabilmektedir. Bir veya daha fazla ekzonun duplikasyonu veya delesyonu, okuma çerçevesinde bir kaymaya sebep olarak erken stop kodonu oluşmasına ve nonsense-mediated decay (NMD) mekanizması ile mRNA yıkılması sonucu fonksiyon kaybettirici mutasyonlara neden olabilmektedir. Eğer NMD mekanizmasından kaçış mümkün olursa, fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Erken stop kodon oluşması nadiren ekzon atlama mekanizması ile de okuma çerçevesini değiştirebilmektedir (32).

Okuma çerçevesi içindeki in-frame delesyon ve duplikasyonlar; farklı, eksik veya füzyona uğramış ve bu nedenle işlevini kaybetmiş veya yeni bir işlev kazanmış proteinlerin oluşmasına yol açabilmektedir (32).

Kromozom analizi ile gösterilemeyen mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromlarının tanısında yaygın olarak kullanılan array CGH, tüm genomdaki değişimlerin aynı anda test edilmesini sağlama avantajına da sahiptir. Ayrıca kromozomal değişikliklerinin kırık noktalarında yer alan ve kesintiye uğrayan genlerin belirlenmesi array CGH ile mümkün olabilmektedir (33). Mikroarray

yöntemlerinin kısıtlılıkları ise; referans örnekte mevcut olan CNV'leri tespit edememesi, CNV'nin kromozomal lokalizasyonu ile ilgili bilgi verememesi ve kırık noktalarını baz çifti düzeyinde belirleyememesi olarak özetlenebilir. Ayrıca prob dağılım özellikleri nedeniyle hem SNP array hem de array CGH yöntemleri delesyonları belirleme konusunda daha hassas olma eğilimindedir ve homozigot delesyonlar en kolay tespit edilebilen değişikliklerdir. Prob sayısına göre farklılıklar göstermekle birlikte, birçok mikroarray platformu (spesifik bir bölge için dizayn edilmiş custom array uygulamaları hariç) 10 kb çözünürlüğün altında sensitivitesini kaybetmektedir, bu nedenle 10 kb ve üzerindeki değişiklikler anlamlı kabul edilmektedir (34).

Mikroarray yöntemi ile elde edilen sonuçların ikinci bir yöntemle (G-bantlama, FISH, MLPA, qPCR gibi) doğrulanması gerekmektedir (35).

Array CGH platformu; oligonükleotid problara bağlanan iki ayrı örneğin (biri hastanın genomik DNA'sı ve diğeri sağlıklı referans) karşılaştırılması prensibine dayanarak çalışmaktadır. Test ve referans örneklerinin sinyal oranları logaritmik orana dönüştürülerek karşılaştırılır. Referans örneğe göre artmış logaritmik oranlar hastadaki kopya sayısı artışlarını gösterirken, logaritmik oranının azalması hastadaki kayıpları göstermektedir. Rutin array CGH çalışmalarında 2.1 milyon (M) ile 1 M arasında değişen sayılarda prob kullanılmaktadır. Amaca özgü dizayn edilmiş yüksek çözünürlüklü custom array CGH'lerde 24 ila 42 milyon prob kullanılmaktadır, bu platformlarda 500 baz çiftine kadar olan submikroskopik delesyon ve duplikasyonların tespit edilmesi mümkün olmaktadır. Bir değişikliğin CNV olarak belirlenebilmesi için en az 3

prob ile temsil edilmesi gerekmektedir (34). Genellikle 50 baz çifti ve daha büyük değişikler CNV olarak tanımlanırken, daha küçük boyuttaki değişimler insersiyon ya da delesyon (indel) olarak tanımlanmaktadır (36).

Uluslararası standart sitogenomik array konsorsiyumu (International Standard Cytogenomic Array Consortium-ISCA) düzenlediği iki toplantıda 33 bilimsel çalışmadan 21,698 hastanın kromozomal mikroarray sonuçlarını bir araya toplamıştır. Bu konsorsiyumun kromozomal mikroarray sonrası tespit edilen CNV'lerin sınıflandırılmasında kullanılmasını önerdiği kriterler Tablo 7'de gösterilmektedir (33).

Tablo 7; Bir CNV'nin patojenitesinin değerlendirilmesinde dikkate alınması önerilen kriterler*

Bir CNV'nin patojenitesinin değerlendirilmesi (Tek kopya değişikliği)	CNV muhtemelen göstermektedir	
	Patojenik	Benign
Primer kriter		
1- A- Aynı CNV sağlıklı ebeveynden kalıtılmıştır ^a B- Bir ebeveynden kalıtılmış olan CNV genişlemiş veya değişmiştir C- Hasta bir ebeveynden kalıtılan CNV ile aynıdır	✓ ✓	✓
2- A- Sağlıklı bir akrabadaki CNV'ye benzer B- Hasta bir akrabadaki CNV'ye benzer	✓	✓
3- CNV sağlıklı bireylerin CNV veri tabanındaki yüksek rezolüsyonlu bir teknolojiyle belirlenmiş genomik dengesizliğin tam içinde yer almaktadır		✓
4- CNV Entelektüel yetersizlik/ Gelişme geriliği, Otizm spektrum hastalıkları veya multipl konjenital malformasyonlu hastalar için CNV veri tabanındaki yüksek rezolüsyonlu bir teknolojiyle belirlenmiş genomik dengesizlikle örtüşmektedir	✓	
5- CNV bilinen genomik-dengesizlik sendromları için olan genomik bölgeler ile çakışıyor ise (Ör. Daha önce yayımlanmış ya da iyi tanımlanmış olan bir delesyon-duplikasyon sendromu ile)	✓	
6- CNV morbid OMIM genlerini içeriyor ise ^b	✓	
7- A- CNV genden zengin ise B- CNV Az gen içeriyor ise	✓	✓
Genel Bulgular^c		
1- A- CNV bir delesyon ise B- CNV homozigot bir delesyon ise	✓ ✓	
2- A- CNV bir duplikasyon ise (bilinen bir dozaj sensitif gen yok ise) B- CNV bir amplifikasyon ise (bir kopya kazanımından daha büyük)	✓	✓
3- CNV bilinen regülatuar elementler içermiyor ise		✓

^a Hasta bir ebeveynden kalıtılan bir delesyon, OMIM'de resesif olan morbid bir geni barındıran ve aile bağlantılı olarak patojenik olabilen

^b CNV OMIM de hastalığa neden olduğu bilinen mutasyonun aynı tipini oluşturabilir

^c Her olguda görülenler hariç

*Kaynak; Miller, D.T., et al., Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. The American Journal of Human Genetics, 2010. **86**(5): p. 749-764 (33).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalına anorektal malformasyon nedeniyle başvurup Tıbbi Genetik Anabilim Dalına refere edilen hastalar klinik açıdan değerlendirilmiş ve hastalardan genetik incelemeler için kan alınmıştır. Bu kapsamda kromozom analizinde bir patoloji bulunmamış olan bu hastalara ailelerinin de onayı ile Array-CGH analizi uygulanmıştır.

Bu çalışmada, anorektal anomalisi mevcut olmakla birlikte herhangi bir genetik sendromla ilişkilendirilmemiş olan ve sitogenetik analiz sonuçları normal bulunduğu için ARM etyolojisinde submikroskobik değişikliklerin de rol oynadığı bilgisine dayanılarak, anabilim dalımız bünyesinde Array CGH (8x60K ISCA) yöntemi ile moleküler karyotipleme yapılmış olan 10 hastanın analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Böylelikle hastalardan elde edilen verilerin önce birbirleri sonra veri tabanları ile karşılaştırılması ve ortak bir etiolojik neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu retrospektif çalışma için Etik Kurul onayı, 13.01.2016 tarihli Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan 15/1056 karar numarasıyla alınmıştır.

3.1. Yöntem

Tanı için kullanılmış olan Array CGH 8x60K ISCA yöntemi ile ilgili protokol aşağıda listelenmiş 10 ana aşamadan oluşur:

A. DNA Eldesi

- B. Restriksiyon Enzim Kesimi
- C. Ligasyon
- D. PCR
- E. PCR Pürifikasyon
- F. PCR Ürünlerinin Ölçümü
- G. Fragmantasyon
- H. İşaretleme
- I. Hibridizasyon
- J. Yıkama/Boyama/Tarama

A-DNA Eldesi

DNA aşağıda anlatılan “yüksek konsantrasyonlu tuzla çöktürme yöntemi” ile elde edilmiştir.

1. gün

1- 2,5 ml. kan 15 ml.lik steril tüpe alınıp, üzerine 15 ml’ye tamamlayacak şekilde önceden hazırlanmış otoklavlanmış soğuk bidistile su konulur.

2- Aşağı yukarı çalkalayarak 2-3 dk. hızlı olarak karıştırılır.

3- 2200 rpm’de 10 dk. santrifüj edilir.

4- Süpernatant atılıp pelletin üzerine tekrar soğuk su ilave edilip santrifüj yapılır.

5- Arkasından yıkama işlemi 3 kez daha tekrarlanıp, son boşaltmada (içindeki pelletin sabit kalıp düşmeyecek şekilde olduğu zaman) tüpler bir kağıt havlunun üzerine ters çevrilip, süzülmesi sağlanır.

6- Süzüldükten sonra tekrar çevrilerek üzerine 37,5µl Proteinaz K (20 mg/ml), 750 µl lysis buffer, 50 µl SDS konup çalkalanır.

7- Bir gece 37 °C de bekletilir.

2. gün

8- 500 µl Amonyum asetat eklenip, 20 kez aşağı yukarı hızla karıştırılarak 10 dk. oda ısısında bekletilir.

9- 3500 rpm de 15 dak. Santrifüj edilip, üzerindeki süpernatant başka 15 ml tüpe aktarılır.

10- Tüpün içindekinin iki katı kadar absöü etanol konulup, hafif karıştırılarak içindeki DNA belirginleştirilir.

11- Önceden içerisine 250µl TE konan mikrosantrifüj tüplerine pipet ucuyla alınan DNA konulup, 1 gün oda sıcaklığında bekletilecek ve çözünmesi sağlanır. Çözündükten sonra derin dondurucuya kaldırılır (-20°C).

B-Restriksiyon Enzim Kesimi

Çalışmada 250 ng (50ng/ul) genomik DNA kullanılmıştır. Buz üzerinde uygun miktarlarda tampon kullanılan arraye uygun enzim, BSA ile kesim karışımı hazırlanır. DNA ile karıştırılarak uygun inkübasyon programında koşullara göre

2-16 saat arası kesim reaksiyonu yapılır. Kesim sonrası örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edilir ve örnekler -20°C'de saklanır.

C-Ligasyon

Buz üzerinde uygun miktarlarda tampon, ligaz enzimi, ve kesim enzimine uygun adaptör ile ligasyon karışımı hazırlanır. DNA ile karıştırılarak uygun inkübasyon programında yaklaşık 3 saat ligasyon reaksiyonu yapılır. Örnekler -20°C'de saklanır.

D-PCR

Ligasyon sonrası ürünler dilüe edilerek PCR aşamasına hazırlanır. PCR için gerekli olan malzemeler (enzim, primer, dNTP gibi) buzda karışım olarak hazırlanır ve DNA eklenir. Kullanılacak PCR cihazına göre uygun program yazılır ve PCR reaksiyonu yapılır. PCR sonrası örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edilir.

E-PCR Pürifikasyon

Pürifikasyon için PCR reaksiyonuna uygun miktarda magnetic bead solüsyonu eklenir. Karışım magnetik stand de bekletilip tüpün alt kısmında toplanan DNA uygun mikropipetle alınır. İşlem sonu elde edilen ürünler spektrofotometrik analizle ölçülür. Örnekler -20°C'de saklanır.

F-PCR Ürünlerinin Ölçümü

Uygun cihaz kullanılarak pürifiye edilmiş PCR ürünlerinin konsantrasyonu ölçülür. Fragmentasyona hazırlık için ürünlere uygun tampon eklenip, vorteks ve spin yapılır.

G-Fragmentasyon

Pürifiye edilmiş PCR ürünü ve uygun tampon ile fragmentasyon karışımı hazırlanır. Fragmentation Reagent uygun miktarda dilüe edildikten sonra, buzda hazırlanan karışıma eklenir. Termal Cyclers'da uygun programla yaklaşık 45 dk fragmentasyon reaksiyonu yapılır. Fragmentasyon sonrası ürünler agaroz jelde yürütülüp kontrol edilir.

H-İşaretleme

Buzda enzim, tampon gibi malzemelerle işaretleme karışımı hazırlanıp fragmente olmuş DNA karışıma eklenir. Termal Cyclers'da uygun programda yaklaşık 4 saat işaretleme reaksiyonu gerçekleşir. Örnekler -20°C'de saklanır.

I-Hibridizasyon

Hibridizasyon aşaması için gerekli solüsyonlar ve tamponlar önceden gereken miktarda hazırlanır. Bu solüsyonlardan uygun miktarlarda kullanarak bir karışım hazırlanır. Karışıma işaretlenmiş DNA örneği eklenip, gereken sıcaklıklarda inkübasyon yapıldıktan sonra, karışımdan uygun miktar mikropipet ile arraylere enjekte edilir. Arrayler Hibridizasyon Fırınına yerleştirilir ve 49°C, 60 rpm rotasyonla 16-18 saat hibridizasyon gerçekleştirilir.

J-Yıkama/Boyama/Tarama

Yıkama aşaması öncesi gerekli solüsyon ve tamponlar hazırlanır. Yıkama öncesi örneklerle ilgili bilgiler sistem bilgisayarına işlenir. Yıkama-Boyama ve Tarama aşamaları bilgisayar tarafından kontrol edildiği için bu aşama önemlidir. 16-18 saat Hibridizasyon sonrası array içinde olan sıvı mikropipet ile geri çekilip, yerine uygun miktarda tampon enjekte edilir. Solüsyonlar, boyalar ve array yıkama istasyonuna yerleştirilir. Arraye uygun yıkama protokolü bilgisayar programından seçilip, protokol başlatılır. Yıkama işlemi bittikten sonra yine program yardımıyla tarama işlemi gerçekleştirilir.

3.2. Verilerin Analiz Edilmesi

Elde edilen veriler değerlendirilirken; 100 kb ve üzerindeki, gen içeren, minimum mutlak ortalama logaritmik değeri 0.25'in üzerinde olan ve en az 3 prob ile temsil edilen CNV'ler dikkate alınmıştır. Bunun dışında kalan veriler içerisinde, 100 kb'den küçük ancak ARM ile ilişkili olabilecek genleri içeren CNV'lerden ikinci bir yöntemle doğrulananlar sonuçlara dahil edilmiştir. Bu kriterlere göre ayıklanan veriler analiz edilirken şu yöntemler kullanılmıştır:

- 1) Anabilim dalımız bünyesinde aynı platform kullanılarak array CGH uygulanmış farklı hasta gruplarının verileri bir araya getirilerek in-house veritabanı oluşturulmuş, farklı fenotipik özellikler gösteren hastalarda sıklıkla karşılaşılan değişiklikler (bkz. Tablo 8) yanlış pozitif olarak değerlendirilmiştir.

- 2) Toplumda sık görülen ve benign olma olasılığı yüksek polimorfik CNV'lerin belirlenebilmesi amacıyla uluslararası DGV veritabanı kullanılmıştır.

Geri kalan değişiklikler içerisinde ARM etiyolojisi ile ilişkili olabilecek olanların belirlenebilmesi için çeşitli veri tabalarından faydalanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan veri tabanları;

- 1) DGV (Database of Genome Variations)
- 2) UCSC Genome Bioinformatics
- 3) Decipher (Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)
- 4) PubMed (The U.S. National Library of Medicine)
- 5) OMIM (Online Mendelian Inheritance of Man)
- 6) Uniprot
- 7) Genecards
- 8) MGI (Mouse Genome Informatics)

Tablo 8; In-house veri tabanında 3 veya daha fazla bildirilmiş ve bu nedenle değerlendirmeye alınmayan CNV'ler

Kromozom	Kayıp/kazanç	Genomik lokalizasyon (Grch37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	Genler
8p11.22	Kayıp	39283276- 39405025	121 kb	3	<i>ADAM3A</i>
8p23.1		7239491- 8287295	1047kb	9	<i>DEFB4B, DEFB103B, DEFB103A...</i>
10q11.22	Kayıp		705kb	7	<i>SYT15, GPRIN2, PPYR1</i>
10q26.3	Kazanç	135243049- 135404523	161 kb	30	<i>LOC619207, CYP2E1, SYCE1...</i>
14q32	Kazanç	106405703- 107214893	809kb	35	<i>ADAM6, NCRNA00226, NCRNA00221</i>
15q11.2	Kayıp	25166421- 25166795	375 kb	11	<i>SNRPN</i>

Bu kriterlere göre değerlendirmeye alınan değişikliklerden;

- Hastalığa neden olanlar; patojenik,
- Hastalığa neden olduğu düşünölenler; olası patojenik
- Hakkında yeterince çalışma bulunmayanlar; klinik önemi bilinmeyen
- Uluslararası veri tabanlarında sağlıklı popölyasyonda sıklıkla bildirilenler; olası benign olarak sınıflandırılmıştır (33, 34).

4. OLGULAR

Polikliniğimize ARM nedeni ile başvuran hastalar iğerisinden; anorektal anomalisi ve eşlik eden başka bulguları mevcut olmakla birlikte herhangi bir genetik sendromla ilişkilendirilmemiş olan ve rutin sitogenetik analiz sonuçları normal bulunan 10 hastaya ait demografik özellikler, muayene bulguları ve tetkik sonuçları Tablo 9’da özetlenmiştir. Olgulardan ikisinde anal stenoz, geri kalan sekizinde ise anal atrezi mevcuttur ve yalnızca olgu 10’da fistöl bulunmaktadır. Olguların tamamı izole ARM olup, ailedeki başka bireylerde ARM tanımlanmamıştır.

Tablo 9; Olguların demografik özellikleri, muayene bulguları ve tetkik sonuçları

Olgular	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3	Olgu 4	Olgu 5	Olgu 6	Olgu 7	Olgu 8	Olgu 9	Olgu 10
Yaş/Cinsiyet	3,5 yaş/E	4 yaş/E	4,5 yaş/E	7 yaş/E	5 ay/E	9,5 yaş/E	5,5 yaş/E	12 gün/E	7 ay/K	7 yaş/K
Prenatal	Sigara (3 adet/gün)	Özellik yok	Yüksek NTD riski	Özellik yok	Özellik yok	Özellik yok	Özellik yok	Özellik yok	Özellik yok	Özellik yok
Natal	C/S, term	NSVY, term	NSVY, term	C/S, 35 hafta	NSVY, term	NSVY, term	NSVY, term	C/S, term	NSVY, term	NSVY, term
Postnatal	Anal stenoz	Anal atrezi	Anal atrezi	Anal atrezi	Anal stenoz	Anal atrezi	Anal atrezi	Anal atrezi	Anal atrezi	Anal atrezi, rektovestibüler fistül
Akrabalık	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Aynı köylüler	Yok	Yok	Yok	3. derece
Ailede başka ARM	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Dismorfik özellikler	Frontal belirginlik, belirgin metopik sutur, seyrek kaşlar ve displastik kulaklar	Obezite, dar palpebral aralıklar, belirgin kulak lobülleri, fuziform parmaklar	Koyu ten rengi, kalın ve ark şeklinde kaşlar, ince üst dudak, silik filtrum, hipertrikozis	Sinofris, uzun kirpikler ve kalkık kulak lobülleri	Dik Saçlar, seyrek kaşlar, upslanting palpebral fissürler	Upslanting palpebral fissürler	Geniş kulak lobülleri	Seyrek kaşlar, dar palpebral aralık, küçük ağız, kalkık kulak lobülleri	Seyrek ve sarı renkli saçlar, upslanting palpebral fissürler, küçük ağız	Hirsutizm, yüksek burun köprüsü, arkaya düşük kulaklar
EKO	ASD, PFO	-	-	-	-	-	Sekundum ASD	Normal	Sekundum ASD	Sekundum ASD, PFO
Abdomen USG	Normal	Normal	Normal	-	-	-	Normal	Normal	-	Normal
Vertebra grafisi	T10-11 düzeyinde spinal kordda genişleme	Normal	Normal	Distal sakral agenezi, koksigeal agenezi ve siringohidromiyeli	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Genitouriner anomali	Yok	Yok	Hipospadias	Yok	Fimozis	VUR	İnguinal herni	İnmemiş testis	Yok	Yok
Diğer	-	-	-	-	Atopik dermatit	-	Ambliyopi	Sık akciğer enfeksiyonu öyküsü	-	Kas güçsüzlüğü, yüksek kas ve karaciğer enzimleri
Kromozom analizi	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY	46, XY	46, XX	46, XX

E: erkek, K: kız, NSVY: normal spontan vajinal yolla, C/S: sezeryan ile, EKO: ekokardiografi, ASD: atrial septal defekt, PFO: patent

foramen ovale, USG: ultrasonograf

5. BULGULAR

Kromozom analizi normal bulunan ve moleküler karyotipleme yapılmış olan ARM'li 10 olgunun dördünde değerlendirme kriterlerine uygun kopya sayısı değişikliği saptanmamıştır. Olguların ikisinde olası benign, ikisinde ise klinik önemi bilinmeyen değişiklik saptanmıştır. İki olgunun (Olgu 1 ve Olgu 8) moleküler karyotipleme sonucunda, ARM etiyojisi ile ilişkilendirilebilecek değişiklikler saptanmıştır. Olgu 1'in moleküler karyotipleme sonucunda 22q11 bölgesinde belirlenen 89 Kb büyüklüğündeki delesyon, qPCR tekniği kullanılarak doğrulanmış ve olası patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Belirlenen bu CNV'nin ARM'ye yol açabileceği düşünülmüştür. Olgu 8'de 22q11 bölgesinde tespit edilen 2.7 Mb büyüklüğündeki delesyon patojenik olarak sınıflandırılmış olup, hastaya 22q11 delesyon sendromu tanısı konulmuş ve sonuçlar FISH tekniği ile doğrulanmıştır. Değerlendirmeye alınan CNV'ler Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10; Olguların moleküler karyotipleme sonuçları

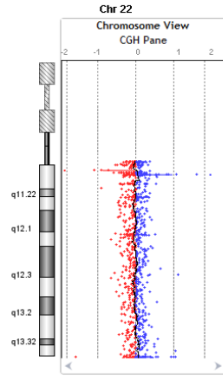
Hasta no	Kromozom	Kayıp/kazanç	Genomik lokalizasyon (Grch37/hg19)	Boyut	Prob sayısı	CNV durumu	Genler
1	22q11.21	Kayıp	18894835-18984519	89 kb	3	Olası patojenik	<i>DGCR6, DGCR5, PRODH</i>
1	2q13	Kayıp	110862477-110964737	102 kb	35	Klinik önemi bilinmeyen	<i>MALL, NPHP1</i>
2	1q31.1	Kazanç	186762066-187472702	710 kb	14	Klinik önemi bilinmeyen	<i>PLA2G4A</i>
7	10q26.3	Kazanç	135243049-135404523	161 kb	30	Olası benign	<i>LOC619207, SCART1, CYP2E1, SYCE1, SPRNP1</i>
8	22q11.21	Kayıp	18628019-21505417	2,877 kb	146	Patojenik	<i>LOC105372871, CA15P2, PPP1R26P2, LOC642643, LOC105372867, LOC105377182, GGT3P, LOC102724123, E2F6P1, LOC101929738, LOC102725072, BCRP7, LOC100287541, LOC100996432, DGCR6, PRODH, DGCR5, LOC105372855, DGCR9, DGCR10, DGCR2, DGCR11, LOC100129262, TSSK1A, DGCR14, TSSK2, LOC105377184, GSC2, LINC01311, SLC25A1, CLTCL1, RPL34P35, DVL1P1, KRT18P62, LOC105372859, HIRA, MRPL40, C22orf39, LOC105372860, UFD1L, CDC45, CLDN5, LINC00895, LOC100129254, LOC100420103, SEPT5,</i>

							<p><i>SEPT5-GP1BB, GP1BB, LOC105372861, TBX1, GNB1L, RPL7AP70, C22orf29, TXNRD2, RPL8P5, LOC105377185, COMT, MIR4761, ARVCF, TANGO2, MIR185, DGCR8, MIR3618, MIR1306, TRMT2A, MIR6816, RANBP1, ZDHHC8, CCDC188, LOC284865, LOC105372862, LINC00896, LOC105372863, RTN4R, LOC105372864, MIR1286, LOC440792, DGCR6L, LOC101927859, LOC105372866, LOC105377189, USP41, ZNF74, SCARF2, KLHL22, LOC100420177, LOC105372940, RNY1P9, LOC105372939, KRT18P5, LOC101928824, MED15, LOC105372938, CCDC74BP1, SMPD4P1, IGLL4P, LOC100421121, SLC9A3P2, ABHD17AP4, POM121L4P, BCRP5, TMEM191A, PI4KA, SERPINDI, SNAP29, CRKL, LOC101928891, AIFM3, LZTR1, THAP7, THAP7-AS1, TUBA3FP, P2RX6, SLC7A4, MIR649, P2RX6P, LRRC74B, TUBA3GP, BCRP2, POM121L7, E2F6P2, FAM230B, LOC105372935, GGT2, E2F6P3, POM121L8P, BCRP6, LOC105369215, PPP1R26P5, LOC100996335, LOC105372944, LOC105377190, SUSD2P1, RIMBP3B, HIC2, LOC105377191, TMEM191C, PI4KAP2, LOC105372946</i></p>
9	5p15.33	Kazanç	648152-759228	111 kb	3	Olası benign	<i>CEP72, TPPP</i>
10	17p13.3	Kazanç	810138-1022950	212 kb	26	Klinik önemi bilinmeyen	<i>NXN*, TIMM22, ABR</i>

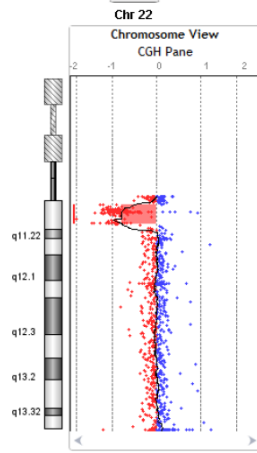
*NXN geninin ilk ekzonu ve ilk intronu duplikasyon bölgesinde yer almaktadır.

-Kalın harflerle gösterilen genler 22q11 delesyonunda fenotip ile ilişkilendirilmiş genlerdir.

Patojenik CNV saptanan Olgu 1 ve Olgu 8'in moleküler karyotipleme ideogramları sırasıyla Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 2; Olgu 1'in 22. kromozoma ait moleküler karyotipleme ideogramı



Şekil 3; Olgu 8'in moleküler karyotipleme ideogramı

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, daha önce GTG bantlama yöntemi ile yapılan kromozom analizi normal bulunmuş, 10 ARM'li olguya Array CGH (8x60K ISCA, Agilent®) kullanılarak yapılan moleküler karyotiplemenin sonuçları analiz edilmiştir. Hastaların kayıp ve kazanç bölgeleri literatür ile karşılaştırılarak, ARM'ye sebep olabilecek genetik nedenler araştırılmıştır. Her bir olgunun kayıp ya da kazanç bölgesi farklı olduğu için, olgular tek tek ele alınmış ve ayrı ayrı tartışılmıştır. Toplamda incelenen 10 olgunun 6'sında anlamlı CNV saptanmamış, iki olguda değerlendirilen CNV'ler hastaların kliniği ile ilişkilendirilememiştir. Olgu 1 ve Olgu 8'de ise; 22q11.22 bölgesinde farklı büyüklüklerde delesyon saptanmış ve bu CNV'ler hastaların klinik bulgularını açıklamakta ve 22q11 delesyon sendromu kritik bölgesi ile örtüşmekte olduğundan patojenik olarak kabul edilmiştir (33).

Anal stenozu, minor kardiak anomalisi (sekundum ASD ve PFO) ve spinal kord'da 10. torakal vertebra düzeyinde hafif spinal genişlemesi bulunan Olgu 1'in moleküler karyotipleme sonucunda 2q13 kromozomal bölgesinde 102 kb büyüklüğünde delesyonu mevcuttur. DGV veri tabanına göre polimorfik olmayan ve 35 proba temsil edilen delesyon bölgesinde; *NPHP1* ve *MALL* genleri bulunmaktadır. Decipher veri tabanında benzer bölgenin delesyonuna sahip hastalar içerisinde ARM kliniği gösteren hasta bildirilmemiştir. *NPHP1* geni çoğunlukla böbrek, göz, testis ve overde eksprese olan hücre bölünmesinde görev alan bir protein kodlamaktadır. Bu genin mutasyonlarında serebellar ataksi ve psikomotor gelişme geriliği klinik bulguları ile seyreden Joubert sendromu tip 4

(JBTS4, MIM:604583), göz bulguları ile birlikte nefronofitizis bulguları görülen Senior Loken sendromu (SLSL1, MIM:266900) ve otozomal resesif geçişli izole nefronofitizis ortaya çıkmaktadır (37). Bu fenotipik özellikler Olgu 1’de bulunmadığından, tespit edilen delesyon klinikle ilişkilendirilememiştir.

Olgu 1’de belirlenen diğer CNV; 22q11.21 bölgesinde yer alan 89 kb büyüklüğünde delesyondur. Üç proba temsil edilen ve *DGCR6*, *DGCR5* ve *PRODH* genlerini içeren bu delesyon, 100 kb’den küçük olmasına rağmen 22q11 delesyon sendromu kritik bölge genlerini içerdiğinden ve ARM fenotipi ile ilişkili olabileceğinden, qPCR yöntemi ile doğrulanarak değerlendirmeye dahil edilmiştir.

Protein kodlayan *DGCR6* geni Di George sendromu fenotipine yol açtığı düşünülen aday genlerden biridir (38). Memeli hücrelerinde *DGCR6* protein ekspresyon düzeyi yüksek dokular kalp, karaciğer ve iskelet kasıdır (39). Oldukça korunmuş ekzon ve intron yapısına sahip olan *DGCR6* geni, 22q11 delesyon sendromu kritik bölgesinde bulunan üç genin ifadenmesini değiştirmektedir. *DGCR6* geni; *TBX1* ve *UFDIL* genlerinin ekspresyonunu artırırken, *HIRA1* geninin ekspresyonunu azaltmaktadır (40). Nöral krest hücre ablasyonlu tavuk modellerinde sefalik ve kardiyak nöral krest hücrelerinin dağılımının bozulduğu gösterilmiş olan *DGCR6* geninin (41), yine nöral krest hücrelerinin anormal göçü nedeniyle ortaya çıktığı düşünülen anorektal malformasyonlara yol açma olasılığı, Olgu 1’de delesyonu tespit edilen diğer iki genden daha kuvvetlidir.

DGCR5 geni ise protein kodlamayan ancak önemli düzenleyici görevleri bulunan çeşitli RNA'lar kodlayan bir gen dir. *PRODH* geninin biallelik delesyonları ve mutasyonları otozomal resesif kalıtılan hiperprolinemi tip 1 hastalığına neden olmaktadır. Tek alleldeki delesyonları ise 22q11 delesyon sendromunda görülen şizofreni ile ilişkilendirilmiştir (42).

Olgu 1'de gözlenen fenotipik bulgulardan; anal stenoz ve minor kardiyak anomaliler 22q11 delesyon sendromunda da tanımlanmıştır. Ancak tipik 22q11 delesyon bölgesinde yer alan genlerden hangisinin ARM'ye neden olduğu belirlenmemiştir. Olgu 1'in moleküler karyotipleme sonucunda delesyonu belirlenen bu genlerin biri veya birkaçının 22q11 delesyon sendromunda görülen anorektal malformasyonlara sebep olabileceği düşünülmektedir. Olgu 1'in sonuçlarının detayları, benzer bölgede daha büyük bir delesyona sahip olması nedeniyle Olgu 8 içinde tartışılmıştır.

Moleküler karyotipleme sonucunda 1. kromozomun q31.1 bölgesinde 710 kb büyüklüğünde duplikasyon tespit edilen Olgu 2'nin duplikasyon bölgesinde *PLA2G4A* (Phospholipase A2, group 4A, #600522) geni yer almaktadır. Bu gen; sitozolik Fosfolipaz A2 enzim ailesinin üyesi olan bir proteini kodlamaktadır. Fosfolipaz enzimleri, membran fosfolipidlerinin parçalanmasını ve araşidonik asit salınımını katalizleyen enzimlerdir. Araşidonik asit; inflamatuvar yanıtta ve hücre içi yollarda önemli rol oynayan eikozanoidlerin öncülüdür (31). Söz konusu duplikasyon bölgesi DGV veri tabanına göre polimorfik değildir. Ancak UCSC veri tabanına göre bu bölgenin duplikasyonu klinik önemi bilinmeyen kopya

sayısı değişikliği olarak sınıflandırılmıştır. Decipher'da ise aynı bölgenin duplikasyonuna sahip anorektal malformasyonlu hasta bulunmamaktadır.

Literatürde, *PLA2G4A* geninin de yer aldığı 1q31.1 bölgesinde 1.38 Mb duplikasyonu olan bir olguda kraniofasyal anomaliler (mikroftalmi, hemifasyal mikrozomi, anoti, yarık damak-dudak) ve gelişme geriliği olan bir olgu tanımlanmıştır. Bildirilen bu olguda anorektal malformasyondan söz edilmemiştir (43).

Olgu 2'nin duplikasyon bölgesini de içine alan oldukça büyük bir bölgenin (1q21-qter) duplikasyonuna sahip, imperfore anüsü ve sakrokoksigeal teratomu olan bir olgu Wax ve arkadaşları (2000) tarafından bildirilmiştir (44). Bildirilen olgunun karyotipi; 46,XX,der(15)t(1;15)(q21;p11)[24]/46,XX[4] şeklinde raporlanmış olup; hastanın 1. kromozomdaki kazanç bölgesinin yanı sıra, 15. kromozom kısa kolunda klinik bulgularla ilişkilendirilemeyen küçük bir delesyonu olduğu sitogenetik yöntemlerle tespit edilmiştir (44). Ancak birden fazla yapısal düzensizliğin bulunduğu bu olguda söz konusu bulguların hangisinden kaynaklandığını net olarak değerlendirmek olası değildir. Kromozom 1q21-qter bölgesinde *PLA2G4A* geni de dahil olmak üzere bir çok gen bulunmaktadır, ancak bunların içinde literatürde ARM ile ilişkisi bildirilen herhangi bir gen bulunmamaktadır. Olgu 2 ile Wax ve ark. tarafından bildirilen olgunun ortak bulguları olan, anal atrezi ve *PLA2G4A* gen duplikasyonu göz önüne alındığında, *PLA2G4A* geninin ARM ile ilişkisinin aydınlatılması için daha fazla çalışma yapılması gerektiği görölmektedir.

Olgu 3, Olgu 4, Olgu 5 ve Olgu 6'nın moleküler karyotipleme sonuçlarında yer alan bütün delesyon ve duplikasyonlar, inhouse veritabanımızda daha önce farklı klinik bulguları olan hastalarda da belirlendiğinden değerlendirmeye alınmamıştır. Bu olgularda array CGH uygulanmış ancak uygulanan yöntem, klinik bulguları açıklamamıştır. Bunun için daha ileri moleküler tetkiklerin uygulanmasının yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

Olgu 7'nin array CGH çalışması ile kromozom 10q26.3 bölgesinde saptanan 160 kb büyüklüğündeki duplikasyon, DGV veri tabanına göre polimorfik değildir, ancak Decipher veri tabanında 285904, 286222, 294706 numaralı olgularda benzer büyüklükteki CNV'ler benign olarak bildirilmiştir. Olgu 7'de saptanan ve ARM ile ilişkilendirilemeyen bu CNV olası benign olarak sınıflandırılmıştır.

Olgu 8' de kromozom 22q11.21'de 2.8 Mb büyüklüğünde delesyon saptanmış ve FISH tekniği (TUPLE probe) kullanılarak doğrulanmıştır. Bu bölge iyi bilinen bir mikrodelesyon sendromu olan "22q11 delesyon sendromu" kritik bölgesini kapsamaktadır.

Hastaların %90'ında yaklaşık 3 Mb büyüklüğünde ve ortalama 30 gen içeren bir delesyon görülürken; %8'inde 1,5 Mb büyüklüğünde, ortalama 25 gen içeren delesyon tespit edilebilmektedir. Oldukça az sayıda hastada ise daha küçük atipik delesyonlarla karşılaşmaktadır. Şaşırtıcı şekilde ister 3 Mb, ister 1,5 Mb büyüklüğünde olsun tüm delesyonların proksimal kırık bölgesi birbirine çok

yakındır. Distal kırık bölgeleri ise değişkendir. Delesyonların büyüklüğü ile fenotip arasında ilişki kurulamamıştır (45).

Delesyon 22q11 sendromunda olguların %90'ı de novo iken, küçük bir kısmı bir ebeveynden kalıtılmaktadır (24). Bu nedenle Olgu 8'in ebeveynlerine de FISH tekniği ile delesyon analizi yapılmış ve delesyonu taşımadıkları belirlenmiştir. Kalıtım modeli; otozomal dominant kalıtıma uygundur, değişken ifadelenme ve eksik penetrans gözlenebilmektedir. Kalp anomalisi, velofaringeal yetmezlik veya dismorfik yüz özellikleri gibi karakteristik bulguların varlığında; FISH, MLPA veya kromozomal mikroarray yöntemlerinden biri ile tanı kesinleştirilebilmektedir. Klasik moleküler tanı için en sık kullanılan yöntem metafaz kromozomları üzerinde, FISH tekniği ile (N25 veya TUPLE lokus spesifik problar kullanılarak) delesyonun gösterilmesidir. FISH tekniği ile delesyonların %95'i gösterilebilirken, özellikle N25 bölgesini içermeyen daha küçük distal delesyonlar tespit edilemeyebilir. Bu nedenle klinik şüphe kuvvetli ise kromozomal mikroarray yönteminin uygulanması önerilmektedir (22).

22q11 delesyon sendromu ile ilgili genotip-fenotip ilişkisi değişken ifadelenme nedeniyle güçlükle kurulabilmiştir. Fenotiple en çok ilişkilendirilen genler *TBX1*, *CTLD* ve *COMT* genleridir. Kalp hastalıkları ve büyük damar anomalilerinden *TBX1* geni sorumlu tutulmuştur (46). Daha sonra yapılan hayvan çalışmaları *TBX1* geninin konoturunkal kalp anomalileri ile ilişkisini doğrulamıştır (46). *CTLD* geni, özellikle iskelet kasında eksprese olan bir gen dir ve VCFS sendromunda karşılaşılan hipotoniden sorumlu olduğu düşünülmektedir (47). *COMT* geni ise şizofreni gibi psikiyatrik problemlerle ilişkilendirilmiştir.

COMT geninin delesyonunda dopamin yıkımı azalmakta ve serum dopamin düzeyi yükselmektedir. Yüksek doz dopamin 22q11 delesyon sendromunda sık karşılaşılan; davranışsal problemler, obsesif-kompulsif bozukluk, dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu ve psikozdan sorumlu tutulmaktadır (48).

Sık enfeksiyon, anal atrezi ve inmemiş testis öyküsü dışında şikayeti olmayan Olgu 8'de sendromun temel bulguları (kalp anomalisi gibi) mevcut değildir. İnmemiş testis 22q11 delesyonlu hastaların yaklaşık %6'sında sendromun bir bulgusu olarak ortaya çıkmaktadır (23). İmmün yetmezlik ise, 22q11 delesyon sendromu hastalarının %70'inde tanımlanmıştır. Özellikle yeni doğan döneminde pnömoni, hastanede yatışın önemli bir sebebidir. Geç çocukluk dönemine kadar devam eden enfeksiyonların sıklığı yaşla birlikte azalmaktadır (49).

Anorektal malformasyonlar 22q11 delesyon sendromunun yaygın görülmeyen bir bulgusudur. İlk kez 1979 yılında DGS tanısı konulan bir hastada VSD, yarı damak-dudak, hipokalsemi ile birlikte anal atrezi bildirilmiştir (50). Wilson ve arkadaşları ise; 22q11 delesyonlu 44 olgudan birinde önde yerleşimli anüs tanımlamışlardır (51). Daha sonra 55 hastalık bir başka seride iki hastada da önde yerleşimli anüs bildirilmiştir (52). Kardiyak anomalilerin eşlik etmediği anorektal malformasyonlu 3 olgu 1997 yılında Wortington tarafından bildirilmiştir. Bildirilen olguların üçünde de hipernasal konuşma, uvula anomalisi, konuşma gecikmesi ve gelişme geriliği mevcuttur. Wortington ve arkadaşları, VCFS ve ARM'nin patogenezinde ortak bir mekanizma olduğunu ileri sürmüş ve her ikisinin de mezenşim hücrelerinin anormal göçü nedeniyle meydana geldiği

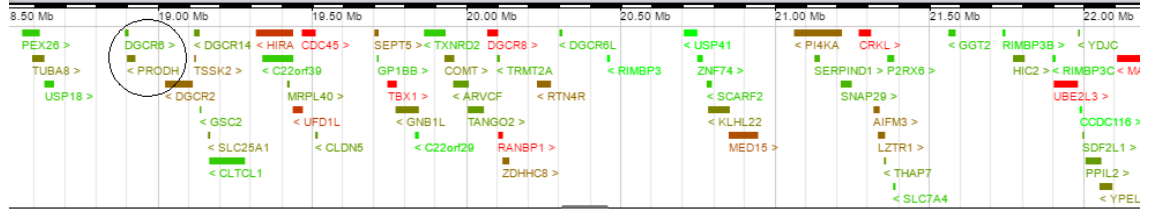
hipotezini sunmuştur (53). Bugün bu hipotezi destekleyecek şekilde; ARM hastalarında etiyojolojiyi belirlemeye yönelik yapılan incelemelerde, 22q11 delesyonu ile sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bunun yanında 22q bölgesinin aşırı ekspresyonu ile meydana gelen Cat-eye sendromunda ARM önemli bir bulgudur. Bütün bu birliktelikler ARM ile ilgili genetik çalışmaların 22. kromozomun uzun kolunda yoğunlaşmasına yol açmıştır. Genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında da hala en çok öne çıkan bölge 22q11 bölgesidir (54).

Decipher veri tabanında benzer bölgenin delesyonuna sahip olgular içinde anorektal malformasyon bildirilen üç olgunun (D275001, D287304, D2366); Olgu 1 ve Olgu 8 ile karşılaştırılması Tablo 11’de özetlenmiş, delesyonların şematik çizimi ise Şekil 4’te gösterilmiştir. D275001 ve D287304 numaralı decipher hastalarının delesyonlarının başlangıç koordinatları aynı olup, *PRODH* ve *DGCR6* genlerini 2. ekzondan bölmektedir (Şekil 5). Bu genler Olgu 8 ve Olgu 1’in delesyon bölgesinde yer almakta ancak D2366 numaralı hastanın delesyon bölgesinde bulunmamaktadır.

Tablo 11; Anorektal malformasyonlu ve kromozom 22q11 delesyonlu Olgu 8, Olgu 1, D2366, D275001 ve D287304 numaralı hastaların özelliklerinin karşılaştırılması

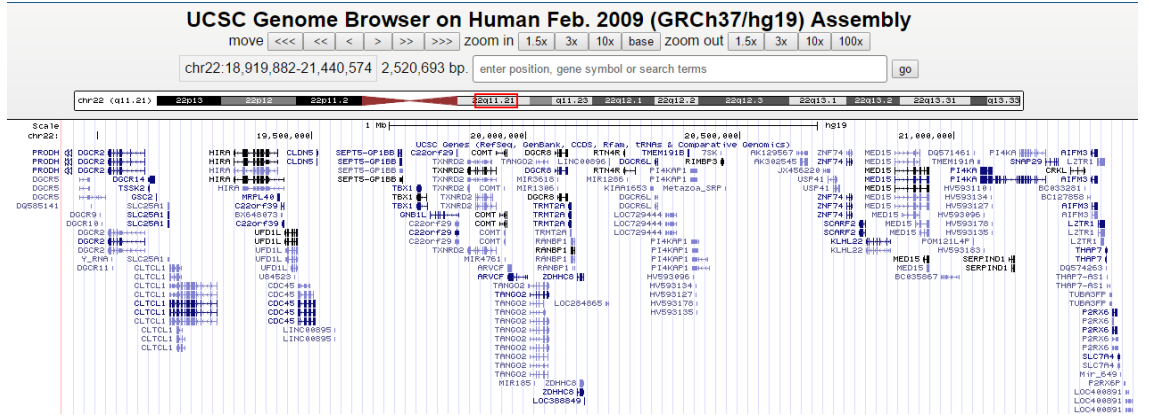
Bulgular	Olgu 8	Olgu 1	D275001	D287304	D2366
Delesyon büyüklüğü	2.87 Mb	89 Kb	2.52 Mb	2.88 Mb	1.39 Mb
Genomik koordinatlar*	18.628.019- 21.055.417	18.894.835- 18.984.519	18.919.882- 21.440.574	18.919.942- 21.801.661	21.075.575- 22.467.350
Büyüme geriliği	—	—	—	+	+
Kalp anomalisi	—	ASD, PFO	Hipertrofik kardiomyopati	Konoturunkal defekt	ASD, VSD
ARM	Anal atrezi	Anal stenoz	Anal atrezi	Anal atrezi	Anal atrezi
Ürogenital	İnmemiş testis	—	—	—	—
Vertebra	—	T10-11 düzeyinde spinal kordda genişleme	—	—	Hemivertebra
Diğer	Sık enfeksiyon öyküsü	—	—	Timus hipoplazisi	Mikrosefali

*Genomik koordinatlar hg19/GRCh37'e göre verilmiştir.



Şekil 4; Hastaların delesyon bölgesinin şematik çizimi; Olgu 8 (gri), Olgu 1 (kırmızı), D2366 (yeşil), D275001 (turuncu) ve D287304 (mavi)

Olgu 1’de ve Olgu 8’de delesyonu belirlenen *DGCR6*, *DGCR5* ve *PRODH* genleri, Decipher veritabanında daha önce bildirilmiş olan iki anal atrezili hastada da (275001 ve 287304) kesintiye uğramış ve genlerin ilk ekzonları delesyona uğramıştır. Bu genlerden *DGCR6*’nın, nöral hücre göçünü durdurması, iskelet kasında ifadelenmesinin artmış olması ve diğer genlerin ekspresyonlarını değiştirmesi nedeniyle ARM etiopatogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Sonuçta; 22q11 delesyon sendromu için kritik bölge genleri içinde yer alan *DGCR6* geninin, bu sendromun bir özelliği olan anal atreziden sorumlu olabileceği ve bu gen ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği görülmektedir.



Şekil 5; Decipher veritabanında 275001ve 287304 numaralı hastaların delesyon bölgesinin UCSC veri tabanındaki görüntüsü; her iki hastanın delesyonun başlangıç noktası aynı olup *PRODH* ve *DGCR5* genlerini bölmektedir.

Moleküler karyotipleme sonucunda 5. Kromozom kısa kolunda 111 Kb büyüklüğünde ve 3 proba temsil edilen duplikasyon saptanan Olgu 9'un kopya sayısı değişimi DGV veri tabanına göre polimorfiktir. Decipher veri tabanında benzer bölge duplikasyonları benign olarak bildirilmiştir. Bu nedenle; Olgu 9'un kliniği ile de ilişkilendirilemeyen bu CNV benign olarak değerlendirilmiştir.

Olgu 10'un takibinde rektovajinal fistülün yanı sıra tüm vücutta yaygın kas güçsüzlüğü şikayeti de ortaya çıkmıştır. Kas güçsüzlüğü nedeniyle pediatrik nöroloji takibinde olan Olgu 10'un kas biopsisi myopatik/hafif distrofik değişiklikler göstermektedir. Moleküler karyotipleme sonucunda 17. Kromozom kısa kolunda yaklaşık 212 kb'lik duplikasyon saptanmış olup, 26 proba temsil edilen duplikasyon bölgesi DGV veri tabanına göre polimorfik değildir. Duplikasyon bölgesinde; *ABR*, *TIMM22* genlerinin tamamı ile *NXN* geninin ilk

ekzonu yer almaktadır. Nucleoredoxin (*NXN*) geni, WNT sinyal yolağının negatif regülatörü olan ve protein kodlayan bir gen dir, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol almaktadır. Bu gen daha önce ARM veya kas güçsüzlüğü ile ilişkilendirilmemiştir (31). Ancak Decipher veri tabanında, entelektüel yetersizliğin yanı sıra distal kas güçsüzlüğü bulunan 254240 numaralı hastada başlangıç noktası *NXN* genini kesen 2,5 Mb büyüklüğünde bir duplikasyon bulunmaktadır. Yine Decipher veri tabanında, entelektüel yetersizlik ve yaygın kas güçsüzlüğü bulunan 290914 numaralı hastanın, başlangıç noktası *NXN* genini bölen, 1,9 Mb büyüklüğünde duplikasyonu mevcuttur. Duplikasyon bölgeleri Olgu 10'a göre büyük olsa da Decipher veri tabanında bildirilen her iki hastada da *NXN* genini kesintiye uğratmaktadır. Üç hastada ortak olarak gözlenen kas güçsüzlüğü şikayetin in nedeninin *NXN* geninin kesintiye uğraması olabileceği düşünülmektedir. Mouse Genomic Database (MGI) veri tabanında kas dokusunda orta düzeyde eksprese olduğu bildirilmekte olan bu gen ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Olgu 10'da entelektüel yetersizlik bulunmadığından, bu bulgudan sorumlu genlerin hastamızda duplike olmayan, ancak Decipher'da bildirilen hastalarda duplikasyonu bulunan başka genlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Decipher veri tabanında, Olgu 10'un duplikasyon bölgesini kapsayan ve ARM'ye sahip bir hasta bulunmamaktadır. Bu nedenle bu CNV ARM ile ilişkilendirilememiş olup, Olgu 10'da belirlenen kas güçsüzlüğü ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

7.SONUÇ

Anorektal malformasyonların tanısında kromozom analizi normal bulunan olgularda array tabanlı sistemlerin kullanımı, submikroskopik delesyon ve duplikasyonların tanısını kolaylaştırmaktadır. Array CGH yöntemi; tüm genomu aynı anda analiz etmeye olanak sağlaması ve CNV'lerin kırık bölgesinde kesintiye uğrayan genlerin belirlenebilmesi nedeniyle delesyon/duplikasyon analizinde kullanılan FISH, MLPA gibi tekniklerden daha avantajlıdır.

Bu çalışmada Array CGH sonuçları analiz edilen ARM'li 10 olgunun dördünde değerlendirme kriterlerine uygun kopya sayısı değişikliği saptanmamış, 2 olguda olası benign, ikisinde ise klinik önemi bilinmeyen değişiklik saptanmıştır. Olgu 1 ve Olgu 8'in moleküler karyotipleme sonucunda, 22q11.2 bölgesinde, ARM etiyolojisi ile ilişkilendirilebilecek ve veri tabanlarında hastalığa yol açtığı bildirilmiş değişiklikler saptanmış ve patojenik olarak sınıflandırılan bu değişiklikler ikinci bir yöntemle (Olgu 1'de qPCR, Olgu 8'de FISH tekniği ile) doğrulanmıştır. Olgu 1'in moleküler karyotipleme sonucunda 22q11 bölgesinde belirlenen 89 Kb büyüklüğündeki delesyon olası patojenik olarak sınıflandırılmış ve belirlenen CNV'nin ARM'ye yol açabileceği düşünülmüştür. Olgu 8'de 22q11 bölgesinde 2.7 Mb büyüklüğünde delesyon saptanmış ve hastaya 22q11 delesyon sendromu tanısı konulmuştur.

Olgu 1 ve Olgu 8'de delesyonu belirlenen *DGCR6*, *DGCR5* ve *PRODH* genleri, Decipher veritabanında anal atrezi ve 22q11 delesyonu bulunan iki olguda kırık bölgesinde yer almakta ve kesintiye uğramaktadır.

Sonuçta; 22q11 delesyon sendromu için kritik bölge genleri içinde yer alan ve nöral krest hücrelerinin göçünü etkileyen *DGCR6* geninin, bu sendromun bir özelliği olan anal atreziden sorumlu olabileceği ve bu gen ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Schramm C, Draaken M, Tewes G, Bartels E, Schmiedeke E, Marzheuser S, et al. Autosomal-dominant non-syndromic anal atresia: sequencing of candidate genes, array-based molecular karyotyping, and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2011;170(6):741-6.
2. Moore SW. Associations of anorectal malformations and related syndromes. *Pediatr Surg Int.* 2013;29(7):665-76.
3. Cho S, Moore SP, Fangman T. One hundred three consecutive patients with anorectal malformations and their associated anomalies. *Archives of pediatrics & adolescent medicine.* 2001;155(5):587-91.
4. Cuschieri A. Anorectal anomalies associated with or as part of other anomalies. *American journal of medical genetics.* 2002;110(2):122-30.
5. Spouge D, Baird P, Opitz JM, Reynolds JF. Imperforate anus in 700,000 consecutive liveborn infants. *American journal of medical genetics.* 1986;25(S2):151-61.
6. Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine: Elsevier Health Sciences;* 2015.
7. Mutchinick OM, Luna-Muñoz L, Amar E, Bakker MK, Clementi M, Cocchi G, et al., editors. *Conjoined twins: a worldwide collaborative epidemiological study of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics;* 2011: Wiley Online Library.
8. Holschneider AM, Hutson JM. *Anorectal malformations in children: embryology, diagnosis, surgical treatment, follow-up: Springer Science & Business Media;* 2006.
9. van Rooij IA, Wijers CH, Rieu PN, Hendriks HS, Brouwers MM, Knoers NV, et al. Maternal and paternal risk factors for anorectal malformations: a Dutch case-control study. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology.* 2010;88(3):152-8.
10. Lerone M, Bolino A, Martucciello G, editors. *The genetics of anorectal malformations: a complex matter. Seminars in pediatric surgery;* 1997.
11. Kluth D, editor *Embryology of anorectal malformations. Seminars in pediatric surgery;* 2010: Elsevier.
12. Wijers CH, van Rooij IA, Marcelis CL, Brunner HG, de Blaauw I, Roeleveld N. Genetic and nongenetic etiology of nonsyndromic anorectal malformations: a systematic review. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(4):382-400.

13. Levitt MA, Peña A. Anorectal malformations. *Orphanet Journal of rare diseases*. 2007;2(1):1.
14. Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth M. Associated malformations in patients with anorectal anomalies. *European journal of medical genetics*. 2007;50(4):281-90.
15. Landau D, Mordechai J, Karplus M, Carmi R. Inheritance of familial congenital isolated anorectal malformations: case report and review. *American journal of medical genetics*. 1997;71(3):280-2.
16. Ratan SK, Rattan KN, Pandey RM, Mittal A, Magu S, Sodhi PK. Associated congenital anomalies in patients with anorectal malformations—a need for developing a uniform practical approach. *Journal of pediatric surgery*. 2004;39(11):1706-11.
17. Hassink E, Rieu P, Hamel B, Severijnen R, Vd Staak F, Festen C. Additional congenital defects in anorectal malformations. *European journal of pediatrics*. 1996;155(6):477-82.
18. Marcelis C, de Blaauw I, Brunner H. Chromosomal anomalies in the etiology of anorectal malformations: a review. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011;155(11):2692-704.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> [Internet].
20. Endo M, Hayashi A, Ishihara M, Maie M, Nagasaki A, Nishi T, et al. Analysis of 1,992 patients with anorectal malformations over the past two decades in Japan. *Journal of pediatric surgery*. 1999;34(3):435-41.
21. Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, et al. 22q11. 2 Deletion Syndrome. 2013.
22. McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11. 2 Deletion Syndrome. 2013.
23. Wu H-Y, Rusnack SL, Bellah RD, Plachter N, McDONALD-McGINN DM, Zackai EH, et al. Genitourinary malformations in chromosome 22q11. 2 deletion. *The Journal of urology*. 2002;168(6):2564-5.
24. Kates WR, Burnette CP, Bessette BA, Folley BS, Strunge L, Jabs EW, et al. Frontal and caudate alterations in velocardiofacial syndrome (deletion at chromosome 22q11. 2). *Journal of child neurology*. 2004;19(5):337-42.
25. Jones KL, Jones MC, Del Campo M. *Smith's recognizable patterns of human malformation*: Elsevier Health Sciences; 2013.
26. Schinzel A, Schmid W, der Maur PA, Moser H, Degenhardt K, Geisler M, et al. Incomplete trisomy 22. *Human genetics*. 1981;56(3):249-62.
27. Liehr T, Pfeiffer R, Trautmann U. Typical and partial cat eye syndrome: identification of the marker chromosome by FISH. *Clinical genetics*. 1992;42(2):91-6.
28. KOHLHASE J, ENGEL W. 21 | SALL1 and the Townes-Brocks Syndrome. *Inborn Errors of Development: The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis*. 2004(49):265.
29. Piluso G, D'Amico F, Saccone V, Bismuto E, Rotundo IL, Di Domenico M, et al. A Missense Mutation in CASK Causes FG Syndrome in an Italian Family. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(2):162-77.
30. Zwink N, Jenetzky E, Schmiedeke E, Schmidt D, Märzheuser S, Grasshoff-Derr S, et al. Assisted reproductive techniques and the risk of anorectal malformations: a German case-control study. *Orphanet journal of rare diseases*. 2012;7(1):1.
31. <http://www.genecards.org/> [Internet].

32. Boone PM, Bacino CA, Shaw CA, Eng PA, Hixson PM, Pursley AN, et al. Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH. *Human mutation*. 2010;31(12):1326-42.
33. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(5):749-64.
34. Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(5):363-76.
35. Shaffer L, Bejjani B. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenetic and genome research*. 2006;115(3-4):303-9.
36. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(3):172-83.
37. Baris H, Bejjani BA, Tan WH, Coulter DL, Martin JA, Storm AL, et al. Identification of a novel polymorphism—the duplication of the NPHP1 (nephronophthisis 1) gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140(17):1876-9.
38. Demczuk S, Thomas G, Aurias A. Isolation of a novel gene from the DiGeorge syndrome critical region with homology to *Drosophila gdl* and to human LAMC1 genes. *Human molecular genetics*. 1996;5(5):633-8.
39. Pfuhl T, Dürr M, Spurk A, Schwalbert B, Nord R, Mysliwicz J, et al. Biochemical characterisation of the proteins encoded by the DiGeorge critical region 6 (DGCR6) genes. *Human genetics*. 2005;117(1):70-80.
40. Hierck BP, Molin DG, Boot MJ, Poelmann RE, Gittenberger-De Groot AC. A chicken model for DGCR6 as a modifier gene in the DiGeorge critical region. *Pediatric research*. 2004;56(3):440-8.
41. Kirby ML. Cellular and molecular contributions of the cardiac neural crest to cardiovascular development. *Trends in cardiovascular medicine*. 1993;3(1):18-23.
42. Pulver AE, Nestadt G, Goldberg R, Shprintzen RJ, Lamacz M, Wolyniec PS, et al. Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. *The Journal of nervous and mental disease*. 1994;182(8):476-7.
43. Huang X-s, Zhu B, Jiang H-o, Wu S-f, Zhang Z-q, Xiao L, et al. A de novo 1.38 Mb duplication of 1q31. 1 in a boy with hemifacial microsomia, anophthalmia, anotia, macrostomia, and cleft lip and palate. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2013;77(4):560-4.
44. Wax JR, Benn P, Steinfeld JD, Ingardia CJ. Prenatally diagnosed sacrococcygeal teratoma: a unique expression of trisomy 1q. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2000;117(1):84-6.
45. Morrow B, Goldberg R, Carlson C, Gupta RD, Sirotkin H, Collins J, et al. Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *American journal of human genetics*. 1995;56(6):1391.
46. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*. 2001;104(4):619-29.
47. Zim S, Schelper R, Kellman R, Tatum S, Ploutz-Snyder R, Shprintzen R. Thickness and histologic and histochemical properties of the superior pharyngeal constrictor muscle in velocardiofacial syndrome. *Archives of facial plastic surgery*. 2003;5(6):503-10.

48. Lachman HM, Morrow B, Shprintzen R, Veit S, Parsia SS, Faedda G, et al. Association of codon 108/158 catechol-O-methyltransferase gene polymorphism with the psychiatric manifestations of velo-cardio-facial syndrome. *American journal of medical genetics*. 1996;67(5):468-72.
49. Cassidy SB, Allanson JE. *Management of genetic syndromes*: John Wiley & Sons; 2010.
50. Conley M, Beckwith J, Mancor J, Tenckhoff L. The spectrum of the DiGeorge syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1979;94(6):883-90.
51. Wilson D, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *Journal of Medical Genetics*. 1993;30(10):852-6.
52. McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Bason L, Christensen K, Lynch D, Sullivan K, et al. Autosomal dominant "Opitz" GBBB syndrome due to a 22q11. 2 deletion. *American journal of medical genetics*. 1995;59(1):103-13.
53. Worthington S, Colley A, Fagan K, Dai K, Lipson A. Anal anomalies: an uncommon feature of velocardiofacial (Shprintzen) syndrome? *Journal of medical genetics*. 1997;34(1):79-82.
54. Wong EH, Cui L, Ng C-L, Tang CS, Liu X-L, So M-T, et al. Genome-wide copy number variation study in anorectal malformations. *Human molecular genetics*. 2013;22(3):621-31.

8.ÖZET

Anorektal malformasyonlar (ARM) cerrahi yöntemlerle tedavi edilen en yaygın doğumsal defektler (2-6/1000 canlı doğum) arasında yer almaktadır. Etiyolojisinde genetik nedenlerin ve çevresel etkenlerin birlikte rol alması nedeniyle multifaktöriyel hastalıklar grubunda sınıflandırılmaktadır. Anorektal malformasyonlar tek başına görülebileceği gibi, diğer sistemlere ait anomaliler de ARM'ye eşlik edebilmektedir. Anorektal malformasyonların iyi bilinen sebepleri arasında; kromozomal hastalıklar (Down sendromu, 22q11 delesyon sendromu gibi), tek gen hastalıkları (Currarino Sendromu, FG sendromu gibi) ve çevresel etkenler (gebelikte ilaç kullanımı, maternal diabetes mellitus gibi) sayılmaktadır.

Bu çalışmada, anorektal anomalisi mevcut olmakla birlikte herhangi bir genetik sendromla ilişkilendirilmemiş olan ve sitogenetik analiz sonuçları normal bulunan 10 hastaya; anabilim dalımız bünyesinde Array CGH (8x60K ISCA) yöntemi ile yapılan moleküler karyotipleme sonuçları analiz edilerek, ortak bir etiyolojik neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada array CGH sonuçları analiz edilen ARM'li 10 olgunun dördünde değerlendirme kriterlerine uygun kopya sayısı değişikliği saptanmamış, 2 olguda olası benign, ikisinde ise klinik önemi bilinmeyen değişiklik saptanmıştır. Olgu 1 ve Olgu 8'in moleküler karyotipleme sonucunda, 22q11.2 bölgesinde, ARM etiyojisi ile ilişkilendirilebilecek ve veritabanlarında hastalığa yol açtığı bildirilmiş değişiklikler saptanmıştır. Olgu 1 ve Olgu 8'de delesyonu belirlenen *DGCR6*, *DGCR5* ve *PRODH* genleri, Decipher veritabanında anal

atrezi ve 22q11 delesyonu bulunan iki olguda kırık bölgesinde yer almakta ve kesintiye uğramaktadır.

Sonuçta; 22q11 delesyon sendromu için kritik bölge genleri içinde yer alan ve nöral krest hücrelerinin göçünü etkileyen *DGCR6* geninin, bu sendromun bir özelliği olan anal atreziden sorumlu olabileceği ve bu gen ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Anorektal malformasyon, Mikroarray, 22q11 Delesyon Sendromu

9. SUMMARY

Anorectal malformations are the most common congenital anomalies (2-6/1000) treated with surgical procedures. These malformations are classified in the group of multifactorial diseases because both genetical causes and environmental factors play a role in the etiology.

In the present study, we aimed to investigate common etiologic factors of anorectal malformations in ten patients which are not associated with any genetic syndrome and abnormal cytogenetic analysis.

In this study, after analyzing the results of array CGH of ten patients with ARM, benign CNV is determined in 2 patients and unknown clinical significance CNV is determined in 2 patients. Deletion of DGCR6, DGCR5 and PRODH genes which are determined in two cases with anal atresia and 22q11 deletion, are showed in case 1 and 8.

In conclusion; DGRC6 gene which is a crucial gene for neural crest cell migration and plays a critical role in syndrome of 22q11 deletion, could be responsible of anal atresia. Further studies should be done on this gene.

Keywords: Anorectal Malformation, Microarray, 22q11 Deletion Syndrome

10.ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : Pelin

Soyadı : ÖZYAVUZ ÇUBUK

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.01.1988, Şanlıurfa

Eğitimi:2012-2016 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD Arş.Gör.Dr.

2005-20011 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

2001-2005 Şanlıurfa Anadolu Lisesi

1999-2001 Şanlıurfa Merkez İlköğretim Okulu

1995-2001 Vatan İlköğretim Okulu

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel kuruluşlar : Tıbbi Genetik Derneği

Ulusal bilimsel toplantılarda bildiri kitaplarında basılan sözlü sunumlar:

- 1) Özyavuz P., Ergün M.A., Perçin E.F. : Kabuki sendromu fenotipinin eşlik ettiği X izokromozomu mozaizmi saptanan bir olgu. 2. Nörometabolik Dismorfoloji Sempozyumu, S-55, 08-09 Mart 2013, İstanbul.
- 2) Kayhan G., Özyavuz P., Perçin E. F.: A case with Sclerosteosis. 6. İstanbul Dismorfoloji Günleri. S-58, 3-4 Mayıs 2013, Salt Galata İstanbul.
- 3) Özyavuz Çubuk P., Yirmibeş Karaoğuz M., Perçin F.: A case with 22q11 deletion syndrome and anal anomalies. (OP42). Erciyes Medical Journal,

March 2016 Vol 38(1), 2016. Medical genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri, Turkey.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

- 1) Özyavuz Çubuk P., Ho L, Reversade B., Perçin E.F.: Additional findings in the Matthew-Wood syndrome. (P11.096 page 340). European Human Genetics Conference –ESHG 2016 May 20 – 24, Barcelona, Spain.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1) Pelin Özyavuz Çubuk, Meral Yirmibeş Karaoğuz, Mehmet Ali Ergün, İsmail Güler. 11p inverted duplikasyonlu olguda moleküler karyotipleme. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, İstanbul 2014
- 2) Tuğ E., Özyavuz Çubuk P.: A case with Cri Du Chat syndrome: Clinical and cytogenetic variability. (OP42). Erciyes Medical Journal, March 2016 Vol 38(1), 2016. Medical genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri, Turkey.

Katıldığı Kurslar:

- 1)Yeni Nesil Dizilemede Veri Tabanları ve in sliko Araçlar Uygulamalı Kursu, İstanbul 12 Mayıs 2015.

11.EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sendromik Olmayan Anorektal Malformasyonlu Olgularda Array CGH Sonuçlarının Analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2012-KAEK-15
	AÇIK ADRESİ:	Pınarbaşı Mah. Sanatoryum Cad. Ardahan Sok. No.25 06380 Keçiören / Ankara
	TELEFON	0312 356 90 00-1117
	FAKS	
	E-POSTA	etikkurulkenh@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. E. Ferda PERÇİN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİL CİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözetimsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro sbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>	Uzmanlık Tezi			
Diger ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ	<input type="checkbox"/>	
	ULUSAL	<input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI	<input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Op.Dr. Ömür ERGİL AYMER
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sendromik Olmayan Anorektal Malformasyonlu Olgularda Array CGH Sonuçlarının Analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

BİLGİLENDİRİLEN BİLGİLER	Belge Adı	Tarihi	Yerleşim Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ULU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROSÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLEN BİLGİLER	Belge Adı		Açıklama	
	ŞİGHÖLA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	B VAKUUM MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	ELAN	<input type="checkbox"/>		
	YELİK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	OLUŞTULAN BELGİLERİN	<input type="checkbox"/>		
	TEKNE	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:1655	Tarih: 13.11.2016		
	Yukarıdaki bilgiler verilen hastaya deneyin için ilgili belgelerin sunulmasıyla birlikte gerekli, etkin, güvenilir ve objektif olarak alınarak (tedavisi) ve uygun bulduğunuz ekibinizle çalışılmaması kaynağına danışarak tedavisi hakkında karar verilecektir. Bu kararın uygulanması için gerekli olan tüm belgeleri ve bilgileri bu kararın kabul edilmesinden önceki tarihte teslim etmişlerdir. Bu kararın uygulanması için gerekli olan tüm belgeleri ve bilgileri bu kararın kabul edilmesinden önceki tarihte teslim etmişlerdir. Bu kararın uygulanması için gerekli olan tüm belgeleri ve bilgileri bu kararın kabul edilmesinden önceki tarihte teslim etmişlerdir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BASKANIN UNVANI/ADI/SOYADI:	Op.Dr. Ömer Faruk TANER

Unvanı/Adı/Soyadı	Unvanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili	Katılım	İmza
Op.Dr.Ömer Faruk TANER baş.	Plastik Ve Rekonstrüktif Cerrahi	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Buran ACAR Bşk.Yardımcısı	Kulak Burun Boğaz Hastalıkları	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Deniz TANER ERUĞRUL Bilişkiniminde görevli üye	Endokrinoloji	Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet ERGÜN	Fizyoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Op.Dr.Ömer Faruk TANER
İmza:

Not: Etik Kurul Başkanı, imzalamaya yetkili olduğu her belgeyi incelemiştir.