

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**KISA BOYLULUĞU ETKİLEYEN GENETİK FAKTÖRLERİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMRA KALKAN

ELAZIĞ-2005

TEŞEKKÜR

‘Kısa boyluluğu etkileyen genetik faktörlerin incelenmesi’ adlı yüksek lisans tezimin hazırlanmasında danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE ve Yrd.Doç.Dr Haluk AKIN’a, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Halit ELYAS’a, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Arş. Gör. Ebru ETEM’e, destekleri için arkadaşlarım Arş. Gör. Deniz EROL, Arş. Gör. İbrahim TEKEDERELİ, Arş. Gör. Gülay CEYLAN ve Ülkü ÖZBEY’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisansım başladığı günden itibaren maddi ve manevi yanımda olan Tayfun ŞENEL ile aileme ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmama, FÜBAP-1102 numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne de teşekkür ederim.

Semra KALKAN

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	3
3.GİRİŞ.....	5
3.1 Boy Fizyolojisi.....	5
3.2 İnsan Boyunu Etkileyen Faktörler.....	6
3.2.1 Maternal ve intrauterin çevre.....	6
3.2.2 Beslenme.....	7
3.2.3 Endokrinolojik özellikler.....	7
3.2.4 Hastalıklar ve sosyo-ekonomik durum.....	8
3.2.5 Psikolojik durum.....	10
3.2.6 Genetik faktörler.....	10
3.3 Boy Kısılıkları.....	11
3.3.1 Patolojik Olmayan Boy Kısılıkları.....	13
3.3.1.1 Genetik boy kısılığı.....	13
3.3.1.2 Konstitüsyonel büyüme gecikmesi.....	13
3.3.1.3 İdiopatik boy kısılığı.....	13
3.3.2 Patolojik boy kısılıkları.....	14
3.3.2.1 Akondroplazi.....	14
3.3.2.2 Hipokondroplazi.....	15
3.3.2.3 Metafizler ve epifizler dizostozlar.....	15
3.3.2.4 Radyasyon.....	15
3.3.2.5 Rahitis.....	15
3.3.2.6 İntrauterin Büyüme Geriliği.....	15

3.3.2.7 Kromozom anomalileri.....	16
3.3.2.7.1 Down sendromu.....	16
3.3.2.7.2 Turner sendromu.....	16
3.3.2.8 Boy kısalığı ile birlikte olan sendromlar.....	16
3.3.2.9 Endokrin bozukluklar.....	17
3.3.2.10 Psikososyal boy kısalığı.....	17
3.3.2.11 Beslenme bozukluğu.....	17
3.3.2.12 Kronik hastalıklar.....	18
3.3.2.12.1 Gastrointestinal sistem hastalıkları.....	18
3.3.2.12.2 Böbrek hastalıkları.....	18
3.3.2.12.3 Kalp hastalıkları.....	18
3.3.2.12.4 Solunum hastalıkları.....	18
3.3.2.12.5 Kan hastalıkları.....	18
3.4 Boy ve İnsan Hastalıkları.....	18
3.4.1 Kardiyovasküler Hastalıklar (CVD), İnme ve Boy.....	18
3.4.2. Kanser ve Boy.....	20
3.5 Multifaktöriyel Kalıtım.....	21
3.5.1 Multifaktöriyel Kalıtımın Özellikleri.....	23
3.6 Genetik Mutasyon ve Genetik Polimorfizm.....	23
3.6.1 Polimorfizmlerin Kullanıldığı Yerler.....	24
3.6.2 Polimorfizmlerin ortaya çıkma şekilleri.....	24
3.6.2.1 Kurucu Etki.....	24
3.6.2.2 Genetik Drift.....	24
3.7 SHOX Geni (Short Stature Homeobox Containing Gene).....	25

3.7.1 SHOX Geninin Yapısı.....	26
3.7.2 SHOX Geninin Ekspresyonu.....	27
3.7.3 SHOX Geninin Regülasyonu.....	28
3.7.4 SHOX Geni ve İnsan Büyüme Hastalıkları.....	29
3.7.5 SHOX Geni ve Genetik Heterojenite.....	30
4.GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
4.1 Sitogenetik ve FISH Preparatlarının Hazırlanması.....	34
4.1.1. Kullanılan solüsyonlar, araç ve gereçler.....	34
4.1.2. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	34
4.1.3. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması	35
4.1.4. Preparasyon İşlemleri.....	35
4.2 Periferik Kan (PK)'dan İnterfaz Preparatı Hazırlanması.....	36
4.3 FISH (Fluoresans <i>İn-Situ</i> Hibridizasyon) Tekniği.....	36
4.3.1 Kullanılan solüsyonlar.....	37
4.3.2. Kullanılan Gereçler.....	37
4.3.3. Prob.....	38
4.3.4. Hedef Örneklerin Hazırlanması.....	38
4.3.4.1 Preparatların Hazırlanması.....	38
4.3.4.2 Probun Hazırlanması.....	38
4.3.4.3 Denatürasyon.....	38
4.3.4.4 Hibridizasyon.....	38
4.3.4.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkama.....	39
4.4 DNA İzolasyonu.....	39
4.4.1 Kullanılan solüsyon ve gereçler.....	39

4.4.2 İzolasyon İşlemi.....	39
4.5 PZR Protokolü.....	41
4.5.1 Kullanılan Solüsyon ve Gereçler.....	41
4.5.2 PZR Kurulması İşlemi.....	41
4.5.3 Agaroz Jel Elektorforezi.....	42
4.5.4 PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi.....	42
4.5.5 Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	42
5. BULGULAR.....	43
5.1 Sitogenetik Bulgular.....	43
5.2 FISH Çalışması Bulguları.....	45
5.3 Moleküler Çalışma Bulguları.....	45
6. TARTIŞMA.....	47
7. KAYNAKLAR.....	53
8. ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: SHOX geninin kromozomal lokalizasyonu, genomik yapısı, cDNA formları ve SHOX mutasyonlarının fenotipik sonuçları.....	26
Şekil 2: SHOX geni regülasyonunun birleşik modeli.....	28
Şekil 3: Distal ulnanın dorsal subluksasyonu ve radiusun kavis yapması ile oluşan Madelung deformitesinin radyografik görünümü.....	30
Şekil 4: 46,XX karyotipine sahip bireyin metafaz plağı.....	43
Şekil 5: 46,XY karyotipine sahip bireyin metafaz plağı.....	44
Şekil 6: SHOX genine spesifik olan DXYS129 probu kullanılarak yapılan FISH çalışması sonucunda elde edilen 2 yeşil sinyale sahip bir interfaz hücresi.....	44
Şekil 7: A-337G mutasyonu için Alu I restriksiyon enzim kesim sonrası agoroz jele yüklenen ürünlerin görüntüsü.....	46
Şekil 8: Y35X mutasyonu için Rsa I restriksiyon enzim kesim sonrası agoroz jele yüklenen ürünlerin görüntüsü.....	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Boy kısalıklarının etiyolojik sınıflaması.....12

Tablo 2: İdiopatik boy kısalığı tanısında kullanılan ölçütler.....14

KISALTMALAR LİSTESİ

YE: Yüksek Enerji

DE: Düşük Enerji

GH: Büyüme Hormonu

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

RFLP: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

İUBG: İntrauterin Büyüme Geriliği

SD: Standart Sapma

CVD: Kardiyovasküler Hastalıklar

CHD: Koroner Kalp Hastalıkları

SHOX: Short Stature Homeobox Containing Gene

PAR: Psödootozomal Bölge

PHOG: Pseudoautosomal Homeoboxcontaining Osteogenic Gene

UTR: Transle Edilmeyen Bölge

TS: Turner Sendromu

ISS: İdiopatik Kısa Boy

LWD: Leri-Weill Diskondrosteozu

FISH: Floresans *in situ* Hibridizasyon

PZR: Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu

LMD: Langer Mezomelik Displazi

HCH: Hipokondroplazi

FSS: Familial Kısa Boy

1. ÖZET

Kısa boy, genetik ve çevre faktörlerinin kontrolü altında olup genel popülasyonun % 2-3'ünü etkilemektedir. Short Stature Homeobox Gene (SHOX), X ve Y kromozomlarının kısa kollarının psödootozomal bölgelerinde yer almakta ve X inaktivasyonuna maruz kalmamaktadır. Gendeki delesyonlar veya mutasyonların, insanlarda görülen Turner Sendromu (TS), İdiopatik Boy Kısaldığı (İKB) ve Leri-Weill Diskondrosteozu (LWD)'na neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmada İKB'li bireylerde, SHOX geninin tam delesyonlarının FISH yöntemi ve ekzon 2'de yer alan LWD hastalarında tespit edilmiş Y35X ve İKB'de tespit edilmiş A-337G mutasyonlarının ise moleküler genetik yöntemle taranması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, İdiopatik Kısa Boy (İKB)'a sahip olduğu belirlenen 61 birey incelendi. Standart sitogenetik tekniklerle vakaların normal karyotipe sahip oldukları gösterildi. Vaka grubundan en kısa boya sahip olan 8 birey seçilerek FISH tekniği ile SHOX genleri kontrol edildi. Vakaların tümü için ekzon 2, PCR metoduyla çoğaltıldı ve Y35X ile A-337G mutasyonlarını tespit etmek için Rsa I ve Alu I enzimleri kullanıldı.

İdiopatik kısa boylu 61 bireyde, konvansiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler sonucunda herhangi bir anormalliğe rastlanmadı.

İdiopatik kısa boylu bireylerde, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik tekniklerin yanısıra moleküler genetik tekniklerin de kapsamlı bir biçimde çalışılması oldukça önemlidir. Çalışma, SHOX geninde yapılacak mutasyon taramalarında özellikle SSCP veya DNA dizileme gibi gendeki tüm

mutasyonları ortaya koyacak yöntemlerin kullanılmasının daha uygun olacağını göstermektedir. Kısa boy ile birliktelik gösteren veya birliktelik gösterdiği düşünülen hastalıklara karşın alınacak tedbirlerde ve kısa boylu bireylerin yaşam kalitesinin artırılmasında, SHOX geni ve büyüme ile ilgili diğer genlerin araştırılması yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: İdiopatik kısa boy, SHOX, interfaz-FISH, Y35X, A-337G

2. ABSTRACT

Short stature is under genetic and environmental factors and affects 2-3 % of general population. SHOX gene is localised in the pseudoautosomal regions of the short arms of X and Y chromosomes and escapes X inactivation. It has shown that the deletions or mutations of the gene causes Turner Syndrome (TS), Idiopathic Short Stature (ISS) and Leri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) seen in human. In this study, it is aimed to scan the complete deletions of SHOX gene in individuals with ISS by FISH method, Y35X mutations detected in LWD patients localised in exon 2 and A-337G mutations detected in ISS patients with molecular methods.

In this study, 61 individuals with ISS were detected. It has shown with standard cytogenetics techniques that cases have normal karyotypes. 8 individuals with the shortest stature were chosen from case group and their SHOX genes were controlled by FISH technique. For all cases, exon 2 was amplified by PCR and to determine Y35X and A-337G mutations, Rsa I and Alu I enzymes were used.

In 61 individuals with ISS, conventional cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular genetics studies didn't show any abnormalities.

It is important to study molecular genetics techniques with conventional cytogenetics and molecular cytogenetics techniques in individuals with ISS in an extensive way. This study shows that to scan the mutations within the SHOX gene, it is more appropriate to use the techniques especially like SSCP or DNA sequencing which determine all mutations in this gene.

For taking preventive measures against diseases associated with or think to be associated with short stature and increasing the quality of life of the individuals

with short stature, to research SHOX gene and other genes related to growth will be guide.

Key words: Idiopathic short stature, SHOX, interphase-FISH, Y35X, A-337G

3. GİRİŞ

Boy (stature), bir insan veya hayvanın dikey doğrultudaki doğal uzunluğudur (10). İnsan boyu, hem genetik hem de çevre faktörlerinin kontrolü altındaki kompleks bir özelliktir. Genetik faktörler, maternal ve intrauterin çevre, beslenme, endokrin durumu, hastalıklar, sosyo-ekonomik durum ve hatta psikolojik mutluluk gibi bir çok faktör, bir bireyin erişebileceği son boyu etkilemek ve ortaya çıkarmakta etkileşim halindedirler. Genel olarak boyun kalıtılabilirliği % 50'nin üstündedir ve çalışılmış kompleks insan özellikleri arasında kalıtılabilirlik oranı en yüksek olanıdır (20).

3.1 Boy Fizyolojisi

İskelet, yetişkin bir insanın toplam boyuna % 97-98 oranında katkıda bulunmaktadır. Fetal yaşamın ilk ayının sonunda iskeletin oluşacağı bölgedeki embriyonik konnektif doku, farklılaşma belirtileri göstermektedir. Gelişmekte olan kıkırdak çevreleyen hücreler iki tabaka oluşturmaya başlamaktadırlar. Dış tabakadaki hücreler fibroblastlara farklılaşırken, iç tabakadaki hücreler az çok farklılaşmamış kalmakta ve kıkırdak hücrelerini oluşturmak için bölünme yeteneğine sahip olmaktadır. Bu iki tabaka birlikte “perikondrium” olarak adlandırılmaktadır. Fetal yaşamın ikinci ayında kemik oluşumu başlamaktadır. Kemik oluşumunun başladığı noktalar osifikasyonun birincil merkezleri olarak bilinmektedir ve bu merkezler farklı kemiklerde farklı zamanlarda oluşmaktadır. Uzun kemiklerde perikondriumdaki osteoblastların görünmeye başlaması ile kemik, kemik diafizinin yüzeyinde oluşmaya başlamaktadır. Böylece periosteum haline gelmektedir. Periosteumun alt tabakasındaki aktif hücreler kemik diafizinin kalınlığının artmasına sebep olmaktadır. Zaman ilerledikçe, oluşacak kemiğin uç

kısımlarındaki kıkırdak kütlelerinde osifikasyonun ikincil merkezleri olan ve çoğunluğu puberteye dek faaliyete geçmeyen epifiz ortaya çıkar. Kıkırdak ile kemik diafizi arasında yer alan yarısaydam yoğun bölge epifizyal tabaka olarak adlandırılır ve kemiğin uzunluğuna büyümesinde hayati bir önem taşımaktadır (64).

Epifizin kapanması kemiğin boyunda gerçekleşen büyümeyi sonlandırır. Bu kapanma kızlarda 16-18 yaşları civarında, erkeklerde ise 18-21 yaşları civarında görülür (64).

3.2 İnsan Boyunu Etkileyen Faktörler

İnsan boyu, maternal ve intrauterin çevre, beslenme, endokrin özellikler, hastalıklar, sosyo-ekonomik durum, psikolojik durum ve genetik faktörler tarafından etkilenmektedir (20).

3.2.1 Maternal ve intrauterin çevre: Rantakallio'nun yaptığı çalışmada tümü kuzey Finlandiya'da 1966 yılında doğan ve gebeliği süresince sigara içen annelerin çocukları 14 yaşlarına kadar takip edilmiştir. Araştırmacı, sigara içen annelerin çocuklarının respiratuar hastalıklara diğerlerinden daha eğilimli, daha kısa boylu olduğunu ve kontrollerle kıyaslandığında okuldaki ortalama başarılarının daha düşük olduğunu gözlemlemiştir. Bununla beraber annenin sigara içmesinin diğer birçok sosyo-biyolojik faktörden daha az önemli ve babanın sigara içmesinden daha fazla önemli olmadığı da belirtilmektedir (52). Kusin ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise, hamile bayanlara hamileliklerinin son üç ayında yüksek enerji (YE) olarak adlandırılan 1950 kJ (465 kcal) veya düşük enerji (DE) olarak adlandırılan 218 kJ (52 kcal) enerji desteği verilmiştir. Bu desteğin çocukların büyümesi üzerindeki etkisi

yaşamlarının ilk 5 yılı için değerlendirilmiştir. İnfantlar çalışmaya doğumlarından itibaren alınmış ve 12 aylık olana dek dörder haftalık aralıklarla, daha sonra her 3 ayda bir ölçülmüştür. 24 aylık olduklarında YE verilen çocukların DE verilenlere göre daha ağır oldukları bulunmuştur. YE verilen çocukların ayrıca ilk 5 yıl boyunca daha uzun boylu oldukları gözlenmiştir (34).

Epidemiyolojik çalışmalar çocuklar, gençler ve yetişkinlerde doğum kilosu ve boyu ile ulaşılan boy arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ijzerman ve arkadaşlarının yaptıkları bir ikiz çalışmasında bu birlikteliğin genetik faktörlerden mi yoksa genetik olmayan intrauterin faktörlerden mi kaynaklandığını araştırmışlardır. Sonuçta, doğum kilosu ve boyu ile yaşamın sonraki döneminde ulaşılan boy arasındaki ilişkinin hem genetik olmayan intrauterin faktörlerden hem de genetik faktörlerden etkilendiğini bulmuşlardır (29).

3.2.2 Beslenme: Yeterli besin normal büyüme için gereklidir. İnsanın yetersiz beslenmesi sadece kalori eksikliğini değil spesifik besin maddelerinin eksikliğini de ifade etmektedir. İnsanlar gelişimin farklı evrelerinde değişkenlik gösteren kalori miktarlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Yaşamının ilk yılında bir bebek, ağır işlerde çalışan yetişkin bir erkeğin yaklaşık 2 katı kadar kaloriye ve adolesan döneme girmek üzere olan okula giden bir çocuk günde yaklaşık 3000 kilokaloriye ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca böyle bir çocuk erişkin dönem başlamadan ihtiyaç duyduğu kalsiyum, nitrojen ve D vitamininin yaklaşık % 50 kadar fazlasına ihtiyaç duymaktadır (64).

3.2.3 Endokrinolojik özellikler: Vücudun gelişmesi büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) tarafından düzenlenmektedir.

Son 10 yılda GH eksikliği olan insan ve hayvanlara IGF-1 uygulanmasının kemiklerin uzamasını da içeren doku gelişimini stimule ettiğini kanıtlamıştır. Hem IGF-1 hem de GH'ın in vivo olarak kemik uzamasını uyarma kapasitesine sahip olduğu ileri sürülmektedir. IGF-1'i eksik olan farelerin, gözle görülebilir hale geldikleri embriyonik yaşamlarının 12. gününde boylarının ciddi şekilde geri kalmış olduğu ve postnatal büyümelerinin de şiddetli olarak geri kaldığı görülmüştür. Ayrıca, IGF-1 geninde delesyon taşıyan bir hastanın intrauterin gelişim geriliği ve postnatal büyüme başarısızlığı gösterdiği belirtilmiştir (42). Bunlara ek olarak parathormon, kemikler üzerine etki ederek kandaki düşük kalsiyum düzeyini normale yükseltmektedir. Bir başka görevi ise, böbreği uyarak, kemik rezorpsiyonu ile üretilmiş olan fosfat fazlalığının atılmasını sağlayıp, kemik varlığının devamını temin etmektir. Kalsitonin, kanda yükselmiş olan kalsiyum düzeyini azaltarak normale düşürmektedir. Bu iki hormon dışında, somatotropin genel büyümeyi hızlandırdığı gibi, özellikle epifiz kıkırdağı ve kemik üzerinde de etki yapmaktadır. Bu hormonun, gelişme döneminde normalden fazla miktarda salgılanması, kemiklerin uzunluğunda anormal artışlarla kendini gösteren gigantizme sebep olurken, bunun tersi, yokluğu ya da normalden az salgılanması uzun kemiklerde büyümenin durmasına neden olmaktadır. Gelişme döneminde tiroid hormonunun yokluğu ya da önemli ölçüde azlığı da kemik büyümesinin durmasına yol açmaktadır (58).

3.2.4 Hastalıklar ve sosyo-ekonomik durum: Sosyo-ekonomik farklılıklar basit bir besin alımı farklılığı anlamına gelmemektedir. Yemeklerin düzenli, yeterli ve dengeli olduğu ayrıca uykuya yeterince önem verilip eksersizin ihmal edilmediği bir ortamda ekonomik faktörler daha az önemlidir.

Büyük ailelerdeki çocukların daha kısa ve hafif olmaları aile büyüklüğünün önemli olduğunu düşündürmektedir. Bunun muhtemel sebebi; büyük ailelerde çocukların daha az bakım ve dikkat görmesidir. Örneğin; Britanya’da yüksek sosyo-ekonomik gruba mensup ailelerin çocukları 3 yaşlarına geldiklerinde diğerlerine kıyasla yaklaşık 2.5 cm, adolesan dönemde ise yaklaşık 4.5 cm daha uzundurlar (64).

Maria Nyström Peck ile Olle Lundberg’in İsveç’te yaptıkları bir çalışmada, çocukluk çağı süresince ekonomik ve psiko-sosyal durumu ortaya koyan 4 göstergenin yetişkin boyundaki varyasyonla ilişkili olup olmadığını ve bu faktörlerin çocukluk çağını farklı sınıflara mensup olarak geçirmiş kadın ve erkekler arasındaki boy varyasyonunu açıklayıp açıklayamayacağını araştırmışlardır. Çocukluk çağındaki sosyo-ekonomik grubu belirleyen bir faktör olarak baba mesleği dışında, ekonomik ve psiko-sosyal durumu gösteren 4 farklı gösterge kullanmışlardır. Bunlar; ekonomik sıkıntı, geniş aile, ailedeki anlaşmazlık ve çocukluk çağında ayrılmış ailelerdi. Kısa boy prevalansı bu 4 göstergenin 3 tanesinde önemli derecede farklılık göstermiştir. Kişinin ayrılmış bir ailede büyümüş olmasının oldukça yaygın olduğu ancak bu etkinin önemli olmadığı söylenmektedir. Kısa bireylerin oranının çocukluk çağında mensup olunan sosyo-ekonomik grup ile önemli derecede değiştiği belirtilmektedir. Sonuç olarak yetişkin dönemdeki kısa boyun, sadece beslenme ve diğer spesifik durumlardan kaynaklanmadığını, bu durumun çocukluk çağındaki olumsuz durumları yansıtan bir sonuç olmayıp, hem ekonomik hem de psiko-sosyal durumu ve bunların toplamını gösteren bir çocukluk çağı dönemini yansıtabileceğini söylemektedirler (46).

Silventoinen ve arkadaşları ise, Finli yetişkinlerin boyları ile sosyo-ekonomik durum ve sağlık ilişkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda boyun, uzun süreli hastalıklarla ve iyi olarak nitelendirilemeyecek bir sağlık durumuyla ilişkisi olduğunu bulmuşlardır. Araştırmaya göre kısa boylu erkeklerin daha sağlıklı, uzun boylu erkeklerin ise daha sağlıklı oldukları görülmüştür. Kadınlar arasında ise boy-sağlık ilişkisinin erkeklerinkinden daha farklı olduğu belirtilmiştir. Uzun ve kısa boylu kadınların uzun süreli hastalıklara daha yüksek düzeyde maruz kaldıkları, bu hastalıkların özellikle de muskulo-skeletal hastalıklar olduğu görülmüştür. Sosyal altyapı faktörlerinin ise boy-sağlık arasındaki ilişkinin sadece küçük bir kısmını açıkladığını ileri sürmektedirler (70).

3.2.5 Psikolojik durum: Duygusal bozukluklara sahip olan yetişkinler GH sekresyonunda anormallikler göstermektedirler. Eğer bu anormallikler çocukluk döneminde ortaya çıkarsa, büyümeyi etkileyebilmektedir. Gençlikteki duygusal bozukluklar ile erken yetişkinlikteki boy arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan bir çalışmada, çocukluk döneminde anksiyete bozukluğu olan kadınların, erken yetişkinlik döneminde nispeten kısa boya sahip oldukları ve bu durumun yetişkin boyundaki varyansın % 5'inden fazlasını açıkladığı, bununla beraber bu ilişkinin erkekler arasında bulunmadığı da belirtilmektedir (49).

3.2.6 Genetik faktörler: Boy uzaması diğer tüm insan ölçüleri gibi yaşam boyunca aynı değildir. En yüksek oran doğumdan önce fetal yaşamın dördüncü ayında görülmektedir. Fetüs günde yaklaşık 1,5 mm uzamaktadır. Doğumdan sonraki ilk yıl içinde boy uzunluğu yaklaşık % 50 oranında artmaktadır. Dişilerde ergenlik daha erken başladığından aynı yaştaki erkeklerden daha uzun olmaktadır. Boyun uzaması kızlarda 18 yaş civarında, erkeklerde ise 21 yaş

civarında durmaktadır (64).

Boyun kalıtılabilirliği kadınlar arasında erkeklerden daha düşüktür. Bu durum muhtemelen sadece kadınlara özel olan ve zaman içerisinde ve popülasyonlar arasında değişebilen tanımlanmamış çevresel faktörlere bağlıdır (71).

Cinsiyete özgü genetik etkiler boya çok az katkıda bulunmaktadır. Son zamanlardaki sonuçlar cinsiyete özgü etkilerin boydaki genetik çeşitlilikte sadece küçük bir rolü olduğunu ve Y kromozomundaki genlerin temel olarak ortalama boya etkilediğini ileri sürmektedirler. Yq'nun rekombine olmayan bölgesinde yer alan bir RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)'nin erkek boya ile ilgili olduğu öne sürülmüştür; ayrıca, bu bölgenin delesyonu sendromik büyüme hastalığına da sebep olmaktadır (71).

3.3 Boy Kısallıkları

Boy kısallıkları etyolojik olarak, patolojik olmayan boy kısallıkları ve patolojik boy kısallıkları olmak üzere iki ana grupta değerlendirilebilmektedir. Normalin varyantı olarak da isimlendirilen patolojik olmayan boy kısallıkları kendi içinde genetik boy kısallığı, konstitüsyonel gelişme geriliği ve idiopatik boy kısallığı olarak ayrılırken, patolojik boy kısallıkları ilk olarak vücut oranlarını bozanlar ve bozmayanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Vücut oranlarını bozan gruba iskelet displazileri, radyasyon etkisi ve raşitis dahildir. Vücut oranlarını bozmayanlar prenatal ve postnatal olarak ayrılmaktadır. Prenatal grup intrauterin büyüme geriliği tip 1, kromozom anomalileri ve boy kısallığı ile giden bazı sendromları içine almakta iken, postnatal grup endokrin bozukluklar, psikososyal nedenler, malnütrisyon ve kronik hastalıkları içermektedir (Tablo 1) .

Tablo 1: Boy kısalıklarının etyolojik sınıflaması (41)

Patolojik olmayan boy kısalıkları (normalin varyantı)

Genetik boy kısalığı

Konstitüsyonel büyüme ve gelişme gecikmesi

İdiopatik boy kısalığı

Patolojik boy kısalıkları

Vücut oranlarını bozanlar

İskelet displazileri

Radyasyon etkisi

Rahitis

Vücut oranlarını bozmayanlar

Prenatal

İntrauterin büyüme geriliği tip 1

Kromozom anomalileri

Boy kısalığı ile giden bazı sendromlar

Postnatal

Endokrin bozukluklar

Psikososyal nedenler

Malnütrisyon

Kronik hastalıklar

3.3.1 Patolojik Olmayan Boy Kısallıkları

3.3.1.1 Genetik boy kısallığı: Boy kısallıklarının sık rastlanan bir şeklidir.

Genetik boy kısallığı olan bir çocuğun doğum ağırlığı normal veya hafif düşük olabilir. Büyüme eğrisi ilk 2 yıldan sonra 3. persantilin altındadır ve bu eğriye paralel bir gidiş gösterir. Yıllık büyüme hızı çocuğun yaşına uygun alt normalindedir. Ergenliğin başlama yaşı gecikmez. Kemik yaşı, takvim yaşına eş ve bazen de takvim yaşından 1-2 yıl geri bulunabilir. Ancak ergenlik belirtilerinin başlaması ile kemik yaşı geriliği hızla düzelir. Genetik yapılarına göre normal olan bu kısa boylu çocuklarda uygulanabilecek bir tedavi yöntemi yoktur (41).

3.3.1.2 Konstitüsyonel büyüme gecikmesi: Boy kısallığı dışında fizik

muayene bulguları normal, ancak kemik yaşı geri olan çocukların büyük çoğunluğu bu gruba girer. Doğumda ağırlığın normal olması bu çocukların önemli bir özelliğidir. Büyüme temposu genellikle ilk aylarda bazen ilk yıl sonuna kadar normaldir, bundan sonra azalır. 3-5 yaşlar arasında büyüme yavaşlar, çocuğun vücut ağırlığı ve boyu 3. persantil eğrilerinin altına iner. Kemik yaşı da boy yaşına uygun şekilde geri kalır. Daha sonra büyüme tekrar ve yılda 5 cm ve biraz fazla uzarsa da çocuğun boyu kısadır. Ancak sağlığı yerindedir. Sonuçta geç olarak erişkin boyu normal değerlere erişir (41).

3.3.1.3 İdiopatik boy kısallığı: İdiopatik boy kısallığı tanısı için tablo.2’de

verilen ölçütlerin bulunması gerekmektedir. İdiopatik boy kısallığının etiyolojisi bugün için belirsizdir. Parsiyel büyüme hormonu direnci, büyüme hormonu salgı kusuru, nörosekretuvar disfonksiyon, minimal iskelet displazisi gibi olasılıklar üzerinde durulmaktadır. İdiopatik boy kısallığı tanısı konulabilmesi için patolojik nedenlerin dışlanmış olması gerekir. Temel yaklaşım boy uzamasına etki

edebilecek beslenme bozukluğu, enfeksiyon gibi olumsuz ek faktörlerin ortadan kaldırılmasıdır (Tablo 2) (41).

Tablo.2 İdiopatik boy kısalığı tanısında kullanılan ölçütler (41)

- Doğum ağırlığı gestasyona göre normal olmalı
 - Vücut oranları normal bulunmalı
 - Kronik hastalık bulgusu olmamalı
 - Psikiyatrik veya duygusal bozukluk bulunmamalı
 - Beslenme durumu normal olmalı
 - Endokrin bir sorun olmamalı
 - Büyüme hızı normal veya normalin alt sınırında olmalı
-

İdiopatik boy kısalığının etiyolojisi bugün için belirsizdir. Parsiyel büyüme hormonu direnci, büyüme hormonu salgı kusuru, nörosekretuvar disfonksiyon, minimal iskelet displazisi gibi olasılıklar üzerinde durulmaktadır. İdiopatik boy kısalığı tanısı konulabilmesi için patolojik nedenlerin dışlanmış olması gerekir. Temel yaklaşım boy uzamasına etki edebilecek beslenme bozukluğu, enfeksiyon bozukluğu gibi olumsuz ek faktörlerin ortadan kaldırılmasıdır (41).

3.3.2 Patolojik Boy Kısalıkları

3.3.2.1 Akondroplazi: En sık rastlanan osteokondrodistrofidir. Epifiz kıkırdaklarının gelişim kusuru sonucunda oluşan, özellikle üst kol ve uyluğun kısa olması ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır (41).

3.3.2.2 Hipokondroplazi: Hastalık akondroplazinin hafif formuna bir çok yönü ile benzer. Otozomal dominant olarak geçer. Akondroplaziden farklı olan en önemli özelliği baş ve yüz görünüşünün normal olmasıdır (41).

3.3.2.3 Metafizler ve epifizler dizostozları: Metafizde veya epifizde mineralizasyon kusuru ile karakterizedir. Boy kısalığının derecesi de hastalığın ağırlığına göre hafif bir kısalıktan ağır bir büyüme geriliğine kadar değişebilir (41).

3.3.2.4 Radyasyon: 1500 rad ve üzerindeki radyasyon dozları büyüme kıkırdağını geri dönüşümsüz olarak harap eder. Bu nedenle medulla spinalis ışınlanması yapılan büyüme çağındaki akut lenfoblastik lösemili çocuklarda daha sonra gövde büyümesinin durduğu gözlenmiştir. Ayrıca kranyal irradiasyon alan hastalarda hipotalamik nörosekretuar disfonksiyon gelişebilmektedir. Bu çocukların uzama hızı 4 cm/yıl'dan az, kemik yaşı geridir. Farmakolojik uyarılara büyüme hormonu yanıtı normal olmasına karşın, uykuda büyüme hormonu salınımı düşük, serum IGF düzeyi düşüktür (41).

3.3.2.5 Raşitis: Özellikle tedavi görmemiş D vitaminine dirençli rahitis vakalarında alt ekstremitelerde kısalığı görülebilir. Radyolojik incelemede epifizlerde mineralizasyon azalmıştır. Büyüme kıkırdağı genişlemiştir ve metafiz düzensiz bulunur. Biyokimyasal bozukluklar da vardır (41).

3.3.2.6 İntrauterin Büyüme Geriliği: İntrauterin büyüme geriliği (İUBG, SGA) vücut ağırlığı gestasyon yaşına göre – 2 SD'den düşük doğan çocuklar için kullanılan bir terimdir. Belirgin boy kısalığı ile birlikte olan İUBG, embriyonal veya erken fetal dönemde hücre üremesinde yetersizlik sonucu gelişir. Rubella, toksoplazmoz, alkol, kokain gibi toksik maddeler; hidantoin, warfarin gibi ilaçlar,

boy kısalığı ile birlikte olan İUBG'nin bilinen nedenleridir. Boy kısalığı hücre üremesinin embriyonal dönemdeki yetersizliğine bağlı olduğundan bu çocuklar açıklarını hiçbir zaman kapatamazlar ve hipoplazik erişkinler olurlar (41).

3.3.2.7 Kromozom anomalileri: Kromozom anomalileri arasında büyüme bozukluklarına yol açan ve klinikte en sık rastlananlar Down ve Turner Sendromları'dır (41).

3.3.2.7.1 Down sendromu: En sık olarak 21. kromozom çiftinin iki yerine üç kromozomdan oluşması, nadiren de translokasyon sonucu ortaya çıkar. Zeka geriliği, tipik yüz görünümü ve diğer stigmatların yanısıra boy kısalığı da hastalığın sık görülen bir özelliğidir. Down sendromu yaklaşık 800 canlı doğumda bir görülür, sıklık anne yaşı büyüdükçe artar. Boy kısalığı yaşam boyu devam eder (41).

3.3.2.7.2 Turner sendromu: Dişi cinsiyet kromozomlarından birinin bulunmaması ile belirlenen bu sendromda klasik kromozom yapısı 45,X'tir. Dış görünüş dişidir ancak, gonadlar hipoplazik, klasik vakalarda fibröz bant şeklindedir. Turner sendromu, büyüme geriliği nedenleri arasında önemli bir yer alır ve boy kısalığı saptanan her kız çocuğunda düşünülmelidir. Boy kısalığı genellikle 6-8 yaşlarında belirgin olur. Ergenlik gelişmesi olmaz, ergenlik sürecine eşlik eden boy uzaması da görülmez. Erişkin boy 135-145 cm arasındadır (41).

3.3.2.8 Boy kısalığı ile birlikte olan sendromlar: Bu gruba etiyolojisi bilinmeyen ve tipik fenotipleri ile tanınan bazı sendromlar girmektedir. Cornelia de Lange, Rubinstein-Taybi, Russell-Silver, Mulibrey, Dubowitz, Bloom, De Sanctis-Cacchione, Johanson-Blizzard, Seckel, Hallermen-Streiff, Smith-Lemli-

Opitz, Williams, Noonan, Aarskog, Rubinow, Opitz, Opitz-Frias, Progeria, Werner, Cockayne, Rothmund-Thomson, Prader-Labhardt-Willi sendromları bu gruba dahildir (41).

3.3.2.9 Endokrin bozukluklar: Endokrin bezlerin hemen hepsinin büyüme üzerine etkisi vardır. Bu etki hızlandırıcı ve baskılayıcı olabilir. Androjenlerin ve östrojenlerin etkisi büyümeyi hızlandırıcı yöndedir, ancak bu hormonların kemik olgunlaşmasına etkisi, kemik büyümesine olan etkisinden daha çok olduğu için büyüme kıkırdağının erken kapanmasına yol açarak erişkinde boy kısalığına neden olabilirler. Büyüme hormonu eksikliği, hipotiroidi, Cushing sendromu, psödohipoparatiroidi, diabetes mellitus, erken puberte, boy kısalığına yol açan endokrin bozukluklardır (41).

3.3.2.10 Psikososyal boy kısalığı: Çevresel psikolojik koşulların iyi olmadığı çocuklarda büyümenin durakladığı bilinir. Bunun en iyi örneği hastanede uzun süre yatırılan çocuklarda anneden ayrılmaya bağlı olarak görülen içe kapanma ve büyüme duraklamasıdır (hospitalismus). Evde anne ve babadan birinin gerçek anne ve baba olmaması veya ev içi ilişkilerin sağlıklı olmaması sonucu bir çocukta büyüme yavaşlaması görülebilir. Bu çocuklarda anne ve babanın çocuğa davranışı kusurludur. Baba alkolik, anne deprese olabilir. Çoğu hırpalanan, dövülen çocuklardır. Bu çocuklar, daha süt çocukluğu döneminde hırçın ve iştahsızdır. Kilo almaları yetersizdir. İki yaşından sonra boy duraklaması ön plana geçer (41).

3.3.2.11 Beslenme bozukluğu: Özellikle gelişmekte olan ülkelerin çocuk yaş gruplarını etkileyen yaygın ve önemli bir sağlık sorunudur. Özellikle klinik belirtilerinin belirgin olmadığı hafif malnütrisyon ve buna bağlı boy kısalığı

Türkiye’de sık karşılaştığımız büyüme geriliği tipidir. Boy kısalığının nedeni büyüme için gerekli elemanların, özellikle protein ve kalorinin yeterli alınamamasıdır. Bu hastalarda açlıkta büyüme hormonu düzeyi çoğu kez yüksektir. Buna karşın malnütrisyonunda somatomedin (IGF-1) yapımı bozulmuştur. Bu çocukların boyları ve kemik yaşları kronolojik yaşlarından geridir, ancak genellikle boy kısalığı kemik olgunlaşmasındaki gerilikten daha belirgindir (41).

3.3.2.12 Kronik hastalıklar:

3.3.2.12.1 Gastrointestinal sistem hastalıkları: Kistik fibroz, kronik gastroenterit, Çölyaki sendromu, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, ameliyat sonrası kısa barsak sendromu büyüme sürecini etkileyen kronik hastalıklardır (41).

3.3.2.12.2 Böbrek hastalıkları: Böbrek yetmezliği olan çocukların %50’sinde boy 3.persantilin altındadır (41).

3.3.2.12.3 Kalp hastalıkları: Doğumsal kalp hastalıkları prenatal ve postnatal büyüme geriliği nedeni olabilir. Hastaların yaklaşık 1/3’ünde büyüme geriliği bulunmuştur (41).

3.3.2.12.4 Solunum hastalıkları: Ağır astım ve hipoksiye yol açabilir. Solunum yolu hastalıkları büyüme geriliğine neden olabilir. Ağır astımda tedavi için yüksek dozlarda prednizolon kullanılması da büyümeyi olumsuz etkiler (41).

3.3.2.12.5 Kan hastalıkları: Ağır kronik hemolitik anemi (orak hücreli anemi veya talasemi gibi) hemen daima subnormal büyüme ve ergenlik gecikmesi ile birlikte (41).

3.4 Boy ve İnsan Hastalıkları

3.4.1 Kardiyovasküler Hastalıklar (KVH), İnme ve Boy: Bir çok araştırmacı, daha kısa boya sahip insanların daha yüksek oranda koroner kalp

hastalıkları (KKH) riskine sahip olduklarını ileri sürmektedirler (23). Uzun boylu insanlarda görülen düşük KVVH mortalitesi veya insidansının intrauterin ve çocukluk dönemindeki beslenme ve büyümenin çok iyi olmasına, daha yüksek sosyo-ekonomik duruma, daha az sigara içimine, nispeten daha düşük kiloya ve kan damarları çapının daha geniş olmasına bağlanmıştır (60).

Parker ve arkadaşları, güneydoğu New England'daki iki topluluktan olan 2826 erkek ve 3741 kadının tıbbi kayıtlarına dayalı olarak 11 yıllık bir KKH ve inme olayını incelemişlerdir. Boyları 177.1 cm'i geçen erkeklerin, boyu 165 cm'i geçmeyenlerle kıyaslanması sonucu % 83 daha düşük bir KKH riskine ve %67 daha düşük bir inme riskine sahip oldukları belirtilmiştir (45).

7735 olguda gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise, olgular Birleşik Krallık'ın 24 şehrinden alınmış ve çalışmanın başlangıcında 40 ile 59 yaş arasında olan insanlar seçilmiştir. 17 yıllık bir takip sonucunda boyları 167.7 cm'den kısa olan erkeklerin daha yüksek bir inme riskiyle karşı karşıya olduğu bulunmuştur (79).

Başka bir çalışmada da, 41 yıllık bir takibe dayalı olarak araştırmacılar boyun, koroner kalp hastalığı ve inme ile ters bir korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yazarlar boyun sosyo-ekonomik durumla pozitif bir korelasyon gösterdiğini ve psiko-sosyal ve çevresel faktörlerin kısa boylu insanları daha yüksek oranda görülen kardiyovasküler hastalıklara taşıyabileceği sonucuna varmışlardır (37).

Bu çalışmaların aksine, kadınlarda, Japonlarda, Çinlilerde ve en kısa insanlarda, batılı ülkelerdeki daha uzun boylu insanlardan daha az oranda KKH görüldüğünü ileri süren çalışmalar da mevcuttur. Hispanikler ve Kitavanlar gibi

bazı daha kısa gruplar hem daha düşük KKH'ye hem de inmeye sahiptirler. Ayrıca Avrupalılardan oldukça kısa olan Kitavanlar'da inne hiç görülmemiştir. Okinawanlar da yine kendilerinden daha uzun olan Japonlardan daha az inne göstermiştir (60).

Uzun boylu insanlardan daha az KKH'ye sahip olan kısa boylu insanlar, sosyo-ekonomik durum, iklim, yaşam tarzı, etnik farklar, soy ve coğrafya ile ilişkilendirilemez çünkü kısa Avrupalılar (Spaniardlar, Portekizliler ve Toulouse Fransızları) da kısa Kaliforniyalılar (Çinli ve Japonlar) gibi aynı düşük KKH mortalitesi göstermektedirler. Ek olarak, uzun Avrupalılar (İskandinavlılar) uzun Kaliforniyalılar gibi aynı yüksek KKH'ye sahiptirler (60). Aynı şekilde, 1900'den önce Avrupalılar ve Amerikalılar daha kısa olmalarına rağmen, KKH'nin oldukça nadir görüldüğü de bulgular arasındadır (21, 81). Çok kısa insanlardan oluşan bir çok toplulukta (Kitavanlar, Kongo Pigmeleri, Tarahumara Hintlileri ve Bushmenler) adeta hiç KKH görülmezken, uzun boylu toplumlarda KKH'nin hiç görülmediği bir durum ortaya konulamamıştır (60).

3.4.2. Kanser ve Boy: Çok sayıda çalışmada yetişkin boyunun kanser insidansı ile pozitif bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (4, 25 ,27 ,44). Üç yüzden fazla makaleden oluşan bir derlemede bu ilişkinin gerçek olduğu sonucuna varılmıştır. Uzun boylu insanların kısa boylu insanlara oranla % 20 ila % 60 daha fazla kanser olduğu bulunmuştur (25). Ayrıca henüz yayınlamamış olan 180 çalışmada da daha uzun boy ile en az bir kanser tipi arasında pozitif bir korelasyon olduğu söylenmektedir (59).

Bugüne kadar yapılmış olan en büyük göğüs kanseri çalışmasında 570 bin Norveçli kadın ele alınmış ve bunların boyu ile kanser arasında pozitif bir ilişki

tespit edilmiştir (76). Ek olarak, bir Amerikan Kanseri Topluluğu, çalışmasında, 434.134 kadında menopoz sonrasında artan boy ile paralellik gösteren göğüs kanseri ölümleri tespit etmişlerdir (47).

Diğer bir uzun süreli çalışmada sigara içmeyen ve boyu 183 cm'den uzun olan erkekler ile 165 cm ve daha kısa olan erkekler karşılaştırılmış ve uzun erkeklerin %36 daha fazla bir kanser oranına sahip oldukları gösterilmiştir. Bu bulgu 17.378 erkeğe ve yaklaşık 30 yıllık bir süreye bağlı olarak oluşturulmuştur (72).

Bir çalışmada da 135.006 İsveçli inşaat işçisinin boylarının prostat kanseriyle pozitif bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. En uzun işçinin prostat kanserinden ölme ihtimalinin % 26-40 daha fazla olduğu gösterilmiştir (5).

Yine bir çok çalışmada boy ile melanom arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir. Daha uzun boylu erkeklerin, daha kısa boylu erkeklere oranla % 2.4 oranında daha yüksek risk taşıdıkları belirtilmektedir (63).

3.5 Multifaktöriyel Kalıtım

Birbirinden farklı pek çok genin ve çevre faktörlerinin etkileşimiyle ortaya çıkan kompleks bir kalıtım biçimidir. Çoğunlukla poligenik olmasına karşın, çevre faktörlerinin etkisi nedeniyle, poligenik kalıtım kavramından ayrı olarak değerlendirilebilir (3).

Multifaktöriyel özellikler kesintili veya sürekli olabilir. Fakat her birinde özellik, farklı lokuslardaki bir çok genin etkileşimi ile belirlenmektedir. Her bir gen çevresel faktörlerin de katılımıyla küçük fakat ek etkiler sağlamaktadır (18).

a. Sürekli Multifaktöriyel Özellikler: Bir çok normal insan karakteristiği sürekli multifaktöriyel özellik olarak belirlenmektedir. Bu özellikler, derecelenmiş

bir sürekli dağılıma sahiptirler. Boy, kilo, cilt rengi, kan basıncı ve zeka bu özellikler arasında yer almaktadır (18).

b. Kesintili Multifaktöriyel Özellikler: 20’den fazla kesintili multifaktöriyel özellik tanımlanmıştır. Bu özellikler, konjenital malformasyonlar ve yetişkin yaşamdaki yaygın durumlar şeklinde ayrılabilir. Kesintili insan multifaktöriyel özelliklerine örnek teşkil eden yarık damak ve dudak, konjenital kalp hastalığı, nöral tüp defekti ve pilor stenozu konjenital malformasyonlara; epilepsi, peptik ülser, şizofreni, multiple skleroz, diabetes mellitus ise yaygın yetişkin hastalıklarına verilebilecek örneklerdir (18).

Multifaktöriyel olarak kalıtılan bir özelliğin klinik hastalıkla sonuçlanması için bir çok faktörün etkileşiminin nasıl olabileceğini açıklamak üzere bir “eşik değer” teorisi geliştirilmiştir. Bu modelde, kesin bir eşik değer üstünde genetik yatkınlığa sahip olanlar klinik hastalık geliştirecektir, özellikle de bunların çevresel etkileri hastalığı tetikleyebilecek tiptedirler. Örneğin, hipertansiyona neden olabilecek çok sayıda geni kalıtmış bir bireyin, hastalığı geliştirme ihtimali, bu genetik yatkınlıkların küçük bir kısmını kalıtan bir bireyden daha yüksek olacaktır. Dahası, yağ ve kolesterolce yüksek bir diyet, arterosklerotik plaklara sebep olmakta ve sonuçta vasküler fonksiyonun bozulması gerçekleşmektedir. Hipertansiyonun olası fenotipi, hastalık için, eşik değerde veya buna yakın bir çevre ve genotipe dayalıdır (8). Ayrıca, bir cinsiyet (erkek veya dişi), problemi muhtemelen diğer cinsiyetten daha fazla göstermektedir. Kompleks hastalığı olan bir bireyin yakın akrabaları, hastalığı geliştirmek için, hastalığı olmayan bireyin yakın akrabalarından daha yüksek bir şansa sahiptir (7)

3.5.1 Multifaktöriyel Kalıtımın Özellikleri

1. Etkilenmiş çocukların çoğunun anne ve babası normaldir.
2. Tekrar riski, bir ailede, etkilenmiş çocukların sayısı ile yükselir.
3. Tekrar riski, defektin ciddiyeti ile yükselir. Daha ciddi etkilenmiş bir anne veya babanın, etkilenmiş bir çocuğu meydana getirme ihtimali daha yüksektir.
4. Akrabalık, etkilenmiş çocuk riskini hafifçe yükseltir.
5. Etkilenmiş akrabaların riski, akrabalık derecesiyle hızlıca düşer.

Tamamlanmamış penetranslı otozomal dominant kalıtım ile karşılaştırıldığında, tekrar riski, akrabalık derecesiyle orantılı olarak düşer.

6. Eğer iki cinsiyetin farklı olasılıklarla etkilenmesi söz konusu ise, daha az muhtemel olan cinsiyet etkilenmişse, bu bireyin etkilenmiş bir çocuk meydana getirme olasılığı daha yüksektir (6).

3.6 Genetik Mutasyon ve Genetik Polimorfizm

Bireylerin DNA dizilerindeki farkların hastalıklarla birliktelik göstermesi, genelde mutasyon olarak adlandırılır. Bununla birlikte, genetik mutasyonlar, genetik polimorfizmin bir çeşididir (73).

Genetik polimorfizm, popülasyonun en az % 1'inde görülen nükleotid dizilerindeki değişimler olarak tanımlanmaktadır (9,33). Genetik polimorfizmler, rastlantı sonucu veya dışardan etki eden virüs veya radyasyon gibi ajanlar ile oluşabilmektedir (73). Biyolojik evrim sürecinde, popülasyonun iki veya daha fazla genotipten oluşmasıyla, popülasyonun polimorfik kaldığı bilinmektedir. Popülasyonda oluşan mutasyonun gen havuzunda çeşitlilik sağladığı ve genetik polimorfizme yol açtığı gösterilmiştir. Bu polimorfizm doğal popülasyonda yaygın şekilde görülmekte ve popülasyonun değişen çevrede varlığını

sürdürmesinde anahtar bir rol oynamaktadır. Bu yüzden popülasyon, mutasyon aracılığı ile genetik polimorfizmi devam ettirerek değişen çevreye adapte olabilmektedir (35). İnsan AB0 kan grupları, insan Rh faktörü, insan major histocompatibility complex (MHC)'i insanlarda görülen polimorfizm örneklerinden birkaçıdır (9).

3.6.1 Polimorfizmlerin Kullanıldığı Yerler

Polimorfizm analizi, doku tiplmesi, hastalık geni bulma ve popülasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Popülasyon çalışmalarında ise genellikle bir popülasyondaki genetik farklılığın derecesini değerlendirmede, iki popülasyonun ayrı türden mi yoksa aynı türün farklı soylarından mı olduğunu belirlemede ya da bir türün migrasyon paternlerini takip etmede kullanılmaktadır (9).

3.6.2 Polimorfizmlerin ortaya çıkma şekilleri

Polimorfizmler, mutasyonla ortaya çıkmaktadır ve polimorfizmlerin popülasyondaki varlığını devam ettiren bir çok faktör vardır.

3.6.2.1 Kurucu Etki

Eğer bir popülasyon, bir veya daha fazla bireyinin özel bir allel taşıdığı birkaç kişiyle başlarsa, bu allel soydaşların çoğunda ortaya çıkabilmektedir. Örneğin; 1680'lerde, hafif metabolik bir hastalık olan Porfria'nın bir allelini taşıyan Ariaantje ve Gerrit Jansz, Hollanda'dan Güney Afrika'ya göç etmişler. Bugün 30.000'den fazla Güney Afrikalı bu alleli taşımakta ve teşhis edilen her olgunun soyu bu çifte uzanmaktadır (9).

3.6.2.2 Genetik Drift

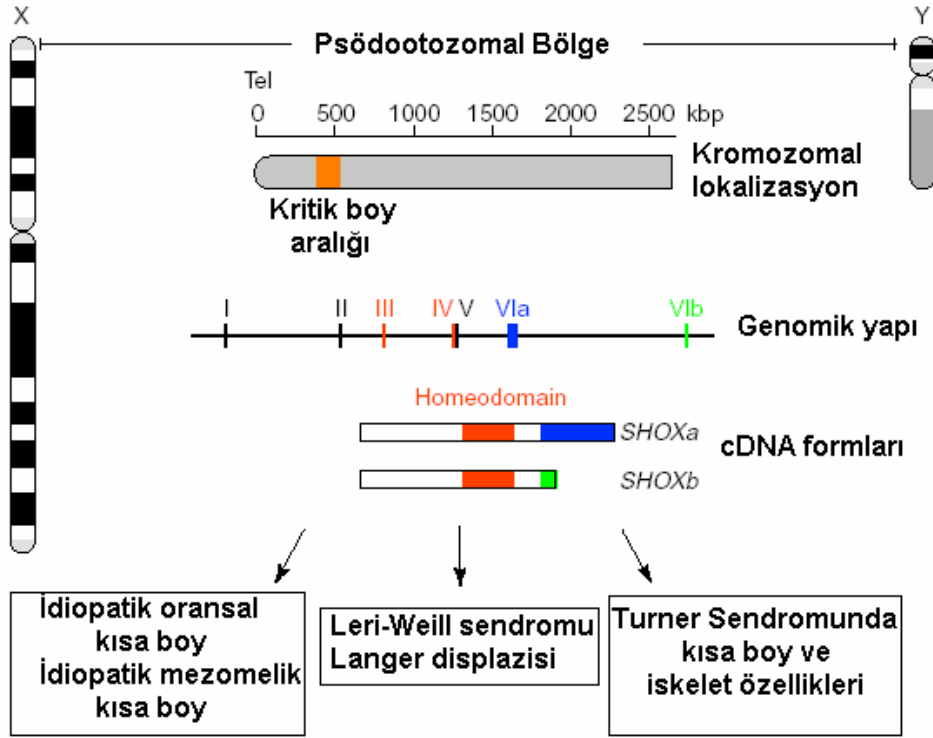
Bir allelin frekansı şans eseri yükselebilmekte veya alçalabilmektedir. Bir popülasyonun her üyesi anne veya baba olmayabilir ve her anne baba aynı sayıda çocuk sahibi olmayabilir. Rastgele genetik drift olarak adlandırılan etki, küçük popülasyonlarda (üreyen 100 çift veya daha azı) ve gen nötral olduğunda; yani, ne yardımcı ne de zarar verici olduğunda özellikle güçlüdür. Sonuç olarak, allel için tüm popülasyon homozigot hale gelebilmekte veya allel kaybolabilmektedir. Bunlardan biri görülmeden önce allel bir polimorfizm göstermektedir (9).

3.7 SHOX Geni (Short Stature Homeobox Containing Gene)

Büyüme, hem beslenme ve enfeksiyon hastalıkları gibi çevresel faktörlerden hem de hormonlar, büyüme faktörleri, bunların reseptörleri ve çeşitli ek genetik faktörler gibi içsel faktörlerce etkilenir. Bu liste son zamanlarda homeobox gen SHOX'un tanımlanması ile genişlemiştir. İnsan X kromozomunun kısa kolunun ve Y kromozomunun kısa kolunun küçük delesyonlarının sürekli olarak kısa boy ile birliktelik gösterdiği gözlemine dayalı olarak, büyümeyi olumlu yönde etkileyen bir genin, cinsiyet kromozomlarının psödootozomal 1 bölgesinde (PAR) yer aldığı ileri sürülmüştür (14). Ogata ve Matsuto adlı araştırmacılar, bu genin PAR1'in 700 kb'lık distalinde lokalize olduğunu göstermiştir ve iki grup daha sonra bu bölgede tek bir homeobox geni tanımlamıştır. Bu gen Rao ve arkadaşlarınca SHOX, Ellison ve arkadaşlarınca ise PHOG (Pseudoautosomal Homeoboxcontaining Osteogenic Gene) olarak adlandırılmıştır (24). 1997'de, SHOX geni, X ve Y kromozomlarının kısa kol bölgelerinin psödootozomal bölgelerinden klonlanmış ve büyümenin düzenlenmesinde aday bir gen olduğu ileri sürülmüştür (39).

3.7.1 SHOX Geninin Yapısı

SHOX geninin X inaktivasyonundan kurtulduğu ve her iki allelin de aktif ve inaktif X kromozomu ile Y kromozomundan eksprese olduğu gösterilmiştir (55). PAR 1’de yer alan genlerin X inaktivasyonundan kurtulması sebebiyle bu genler her iki cinsiyette de iki fonksiyonel kopya halinde bulunmaktadır (14).



Şekil 1: SHOX geninin kromozomal lokalizasyonu, genomik yapısı, cDNA formları ve SHOX mutasyonlarının fenotipik sonuçları (Blaschke ve Rappold’dan değiştirilerek alınmıştır).

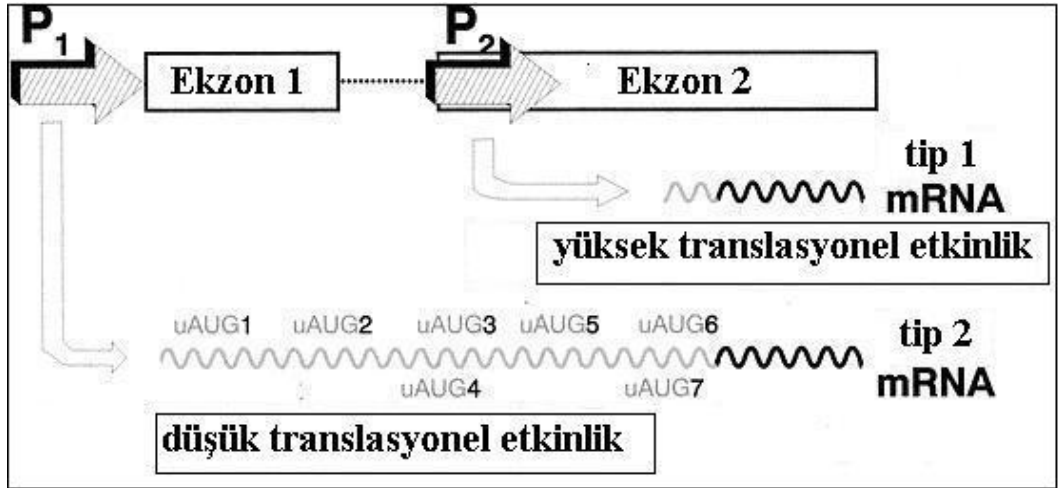
SHOX yaklaşık 40 kb’lik genomik bir bölge kaplamaktadır. 7 ekzondan ibarettir ve 3 ekzonu alternatif splicing ile oluşturulan iki transkript kodlamaktadır. SHOXa ve SHOXb olarak adlandırılan bu transkriptler sırasıyla 292 ve 225 amino asitten oluşan proteinleri kodlamaktadırlar (14).

3.7.2 SHOX Geninin Ekspresyonu

SHOX geni ekstremiteler ve faringeal arkus olmak üzere iki büyük bölgede eksprese olmaktadır. Bu her iki alandaki anormal gelişim, Turner Sendromu'nun iskelet özelliklerinin temelini oluşturmaktadır. Ekstremitelerde SHOX ilk olarak farklılaşmamış mezenşimal dokularda, mezenşim yoğunlaştığında ve kondrifikasyon gerçekleştiğinde ise perikondriyal tabakada daha güçlü eksprese olmaktadır. Bu tabakada kondroblastlar ve daha sonra osteoblast, mezenşim yoğunlaşmasını çevreleyen kıkırdak zarının gelişmesinden önce farklılaşmaktadır. Gelişen kemikteki spesifik ekspresyonu sebebiyle, SHOX'un kemik morfolojisinde yer aldığı ileri sürülmektedir. SHOX temel olarak mezodermal özde eksprese edilmekte ve ekspresyonu lateral olarak yoğun olup iç kısımlara doğru azalmaktadır. En güçlü SHOX ekspresyonu ekstremitelerin orta bölümünde, özellikle dirsek ve dizde görülmektedir. Bu ekspresyon kalıplarının, Leri-Weill hastaları ve bazı Turner dişilerinde görülen kısa bacaklar ve ön kolların kısalması ve eğilmesini ve Turner dişilerindeki karakteristik cubitus valgus ile genu valgumu açıklamaya yardım edeceği ve benzer şekilde, SHOX'un distal ulna/radius ve bilekteki ekspresyonunun, Turner dişilerinde görülen Madelung deformitesi ve kısa metakarpalleri açıklayabileceği de ileri sürülmüştür. Bu sonucu, SHOX mutasyonu hastalarının aynı zamanda Turner hastalarının bazı iskelet özelliklerini gösterdiği bulgusu desteklemektedir (30). Bununla beraber, SHOX ekspresyonu, aksiyal iskelet veya gelişen kafatasında bulunmamıştır (30) ve büyüme ile kemik gelişimi esnasında SHOX'un kesin rolü halen bilinmemektedir (19).

3.7.3 SHOX Geninin Regülasyonu

SHOX geni 5'- transle edilmeyen bölge (Untranslated Region; UTR) sekansları farklı olan ancak aynı proteinleri kodlayan farklı mRNA'ları oluşturan en az iki alternatif promotordan transkripte olmaktadır. SHOX geninin 2. ekzonunda yer alan alternatif intragenik promotor, sırasıyla -137 ve -257 pozisyonlarında bir TATA ve CAAT kutusu içermektedir. SHOX ekspresyonu, aynı kodlama kapasitelerine sahip tip 1 ve tip 2 transkriptleri oluşturan alternatif promotorlar, P1 (promotor 1) ve P2 (promotor 2), tarafından transkripsiyonel seviyede düzenlenmektedir. Bu durumun, P2'nin yüksek SHOX miktarına acil olarak ihtiyaç duyulması esnasında kullanılırken, P1'in muhtemelen hücrel stres durumlarıyla ilişkili olan translasyonel kontrol mekanizmaları ve protein seviyelerinin ince ayarını kolaylaştıran transkriptlerin oluşumuna izin verdiğini ileri sürmüşlerdir (54).



Şekil 2: SHOX geni regülasyonunun birleşik modeli (Blaschke ve Töpfer'den değiştirilerek alınmıştır.)

3.7.4 SHOX Geni ve İnsan Büyüme Hastalıkları

SHOX'un tek doz yetersizliği, insanlarda görülen Turner Sendromu (TS), İdiopatik Boy Kısalığı (İKB) ve Leri-Weill Diskondrosteozu (LWD) olmak üzere üç farklı büyüme hastalığına katkıda bulunmaktadır (78).

Turner Sendromu: İlk olarak 1922'de Rossle tarafından incelenmiş ve daha sonra 1938'de Turner tarafından detaylıca tanımlanmış genetik bir hastalıktır (12). 2.000-5.000 canlı doğumda bir görülmektedir ve kısa boy, ovarian disgenezis, lenf ödem, düşük saç çizgisi ve kısa/yele boyun gibi çeşitli somatik anomalilerden oluşan üç önemli özelliklerle karakterizedir (12, 77). Turner Sendromu, spontan abortusların yaklaşık %10'undan sorumludur (74). Turner Sendromu'nda görülen kısa boyun en büyük sebebinin SHOX geninin tek doz yetersizliği olduğu öne sürülmektedir (50). SHOX tek doz yetersizliğinin TS'unda görülen iskelet anormallikleri ve kısa boy da yer aldığı kesindir, ancak bu durum TS'unun büyüme anormalliklerini tam olarak açıklamamaktadır (24).

İdiopatik Kısa Boy: Sebebi bilinmeyen kısa boydur. Rao ve arkadaşlarının bir çalışmasında, idiopatik kısa boya sahip 200 bireyden sadece ikisinin SHOX geninde anlamsız mutasyonlar taşıdığı gösterilmiştir (40). Binder ve arkadaşları ise, mikrosatellit analizleriyle, idiopatik kısa boya sahip 68 hasta araştırmış ve sadece bir vakada SHOX delesyonu bulmuşlardır (13). Buna dayalı olarak yazarlar, SHOX mutasyonlarının idiopatik kısa boylu hastaların yaklaşık %1'inde beklenebileceğini ileri sürmektedirler (13, 40).

Leri-Weill Diskondrosteozu: Dominant olarak kalıtılan bir iskelet displazisi olan Leri-Weill Diskondrosteoz, kısa boy, mezomeli, Madelung bilek deformitesi ile fenotipik olarak karakterizedir (Şekil 3). LWD şu anda Xp-Yp

psödootozomal bölgede lokalize olmuş SHOX geninin tek doz yetersizliği ile genetik olarak tanımlanabilmektedir. Daha ciddi bir iskelet displazisi olan Langer tipi mezomelik displazinin SHOX geninin veya protein fonksiyonunun tüm kaybından sonuçlanan homozigot LWD formu olduğu düşünülmektedir (19, 30, 57). Şimdiye kadar, LWD hastalarında birçok SHOX mutasyonu ortaya çıkarılmıştır. En sık mutasyon tipleri tüm geni kapsayan delesyonlardır. Bu, muhtemelen PAR1 bölgesindeki yüksek frekanslı tekrarların bir sonucudur (42).



Şekil 3: Distal ulnanın dorsal subluksasyonu ve radiusun kavimsi yapması ile oluşan Madelung deformitesinin radyografik görünümü (19)

3.7.5 SHOX Geni ve Genetik Heterojenite

Fenotip, bir özelliğin görünüşü olarak tanımlanmaktadır. Genotip ise, belirli bir özelliği etkileyen alleller veya genlerin kombinasyonu olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak, genotip fenotipi belirlemektedir (52).

Heterojenite terimi basitçe “farklılığı” ifade etmektedir (52). Genetik heterojenite, görünüşte benzer karakterlerin varlığı için farklı soyağaçlarında yer alan farklı genleri veya farklı genetik mekanizmaları gösteren genetik bir kanıttır. Klinikte ise, aynı hastalığa sebep olan çeşitli genetik bozuklukların varlığını belirtmektedir. Genellikle, aynı gen üzerindeki farklı lokuslarda yer alan mutasyonlara bağlı olarak Alzheimer hastalığı, kistik fibroz, lipoprotein lipaz eksikliği gibi birçok insan hastalığında ortak bir bulgudur (34). Genetik analiz bağlamında fenotipik heterojenite, belirli bir özelliğin farklı formlarının mevcut olduğu anlamına gelmektedir (52).

Fenotipik heterojenite ve aileler arası değişkenlik, tek doz yetersizliği sendromlarında sıkça bulunmuştur (30). SHOX’u eksik bireyler hafif, zorlukla ortaya konabilen iskelet malformasyonlarından, bu hastaların yaşamlarını olumsuz yönde etkileyen ciddi displazilere kadar değişen hatırı sayılır bir fenotipik heterojenite göstermektedirler (54). Bununla beraber, SHOX’taki aynı mutasyonun ya LWD sendromu veya İKB fenotipine yol açtığı gözlenmiştir. (42, 55). Yapılan bir çalışmada 18 aileden 32 LWD hastası dikkatle değerlendirilmiş ve klinik ve moleküler genetik bilgileri detaylı olarak rapor edilmiştir. Hastaların hepsinin belirgin Madelung Deformite’sine ve diğer LWD özelliklerinde dikkate değer bir fenotipik varyasyona sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak, araştırılan LWD ailelerinin yaklaşık yarısında SHOX mutasyonu bulunamamıştır (61). FISH, Southern blot ve DNA dizileme kullanılarak, Schiller ve arkadaşları LWD aileleri çalışmalarının yaklaşık % 41’inde SHOX geninde bir mutasyon tespit edememişlerdir. Tüm bu sonuçlar, SHOX fenotipinde kompleks genetik ve fenotipik heterojenite olduğunu ileri sürmektedir (42, 53, 55). Bahsedilen

fenotipik heterojenite klinik olarak belgelenmiştir ancak moleküler seviyede anlaşılamamıştır. Fonksiyonel proteinin seviyesini düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasının, SHOX ile ilişkili fenotipleri ve bunların kalıtsal fenotipik heterojenitesini açıklamak için önemli ipuçları sağlayacağı bildirilmiştir (54).

Y35X mutasyonu bilateral Madelung deformitesine sahip LWD'li bireylerde daha önce yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır (22). Ancak literatürde bu mutasyon İKB'li bireylerde tespit edilememiştir. A-337G mutasyonu İKB'li bireylerde tespit edilmiştir. Çalışmada, boyu Elazığ boy ortalamasının altında kalan idiopatik kısa boylu bireylerde, SHOX genindeki ekzon 2'de daha önce tanımlanmış olan Y35X ve A-337G mutasyonlarının taranması amaçlanmıştır.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için kullanılan kontrol ve vakalar Elazığ ilinde yaşayan bireylerden seçildi. Bu çalışmada olgu grubu olarak 69 birey ve kontrol grubu olarak 31 birey olmak üzere toplam 100 birey çalışmaya alındı. Bu 100 bireyden 12'si monozigotik , 6'sı dizigotik kardeşler ve 44'ü kardeş çiftiydi. Geriye kalan 38 birey, aynı cinsiyette kardeşleri olmadığından, çalışmaya tek başlarına alındı. Çalışmaya alınan bireylerden yaşı en küçük olanı 20 ve en büyük olanı 50 olmak üzere yaş ortalamaları 28.8 (standart sapma 11.33) idi. Elazığ ilinde bayanlar ve erkekler için boy ortalamalarının hesaplanmasında 640'ı bayan ve 331'i erkek olmak üzere toplam 971 bireyin boy uzunluğu kullanıldı (1, 2, 26). Sonuçta Elazığ ilinde yaşayan bayanların boy ortalaması 157 cm ve erkeklerin boy ortalaması ise 171 cm olarak hesaplandı. Rappold ve ark., 2 SD altında veya 3 persantilin altındaki boya sahip olmayı çalışmaya dahil etme kriteri olarak kullanmışlardır. Ancak bu çalışmada olgular çalışmaya alınırken aşağıdaki kriterler göz önünde bulunduruldu:

1. Monozigot kardeşler için; aralarında en az 5 cm boy farkı bulunan ve kısa boya sahip olan kardeşin bölge boy ortalamasının altında kalması.
2. Dizigot kardeşler ve kardeş çiftleri için; cinsiyetlerinin aynı olması, aralarında en az 5 cm boy farkı bulunması ve kısa boya sahip olan kardeşin bölge boy ortalamasının altında kalması.
3. Çalışmaya tek başına alınan bireyler için; aynı cinsiyette kardeşleri olmaması, boylarının aile ortalamaları ve bölge ortalamasının altında kalması.

Çalışmaya katılan bireylerin 48'i erkek ve 52'si bayan bireylerden oluşmaktaydı. Kısa boy Turner Sendromu'nun en önemli bulgularından olduğu

için, vaka olarak belirlenen bireylerde Turner Sendromu'nun klinik bulgularına sahip olduğu düşünülen hastalar çalışma dışı bırakıldı.

4.1 Sitogenetik ve FISH Preparatlarının Hazırlanması

4.1.1. Kullanılan solüsyonlar, araç ve gereçler

Kolşisin (Biological Industries, Israel), Metanol (Merck, Darmstadt, Germany), Etil alkol (Merck, Darmstadt, Germany), Mc Coy's 5A Basal Medyum (Irvine Scientific, California), New Born Calf Serum (Biological Industries, Israel), L- Glutamin (Sigma, U.S.A, Germany, U.K), Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu (Biological Industries, Israel), Penisilin- Streptomisin-Niasin (Biological Industries, Israel), Glasiyel asetik asit (Merck, Darmstadt, Germany), % 70- % 85 - % 100'lük etanol, Giemsa boyası (Merck, Darmstadt, Germany), Söransan tamponu (pH=6.80), Trypsin Certified (Difco, 1:250), Distile su, Entellan (Merck, Darmstadt, Germany), Heparin (A.I.), KCl (Potasyum klorid), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), mikroskop (Nikon Eclipse E600), etüv (Nüve EN 400), santrifüj (Hettich Universal), hassas elektronik terazi (Chyo), enjektörler, pipetler, 15 ml'lik kültür tüpleri, şaleler, mezürler, lamel, lam, fotoğraf filmi, UV lambası (dalga boyları ayarlanabilir), pH metre (HANNA Instruments).

4.1.2. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Hipotonik solüsyon : 0.075 M KCl 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Fiksatif (Tesbit solüsyonu) : 1:3 oranında asetik asit : metil alkol (metanol) ile hazırlandı. 2 ml asetik asit ve 6 ml metil alkol karıştırıldı.

Söransan Tamponu (pH = 6.80) : 18.96 gr Na_2HPO_4 ve 18.16 gr KH_2PO_4 1000

ml distile suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim 2000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon 1 N NaOH veya 1 N HCL ile pH=6.80'e ayarlandı.

Giemsa Boya Solüsyonu : 5 ml Giemsa boyası üzerine pH'ı 6.80 olan söransan tamponundan 95 ml ilave edilerek hazırlandı.

4.1.3. Periferik Kan Kültür Ortamının Hazırlanması

1. Mc Coy's 5A Basal medium.....100 ml
2. New Born Calf Serum..... 20 ml
3. L-Glutamin.....1 ml
4. Fitohemaglutinin (PHA) solüsyonu.....4.25 ml
5. Penisilin- Streptomisin-Niasin.....1 ml

Yukarıda belirtilen oranlar kullanılarak hazırlanan besi yerinden steril, kapaklı tüplere 5 ml konularak -20°C'de saklandı. Kültür yapılmadan önce besiyeri oda ısısında çözülerek kullanıldı .

4.1.4. Hazırlama İşlemleri

Steril disposable 5 ml'lik enjektör 0.5 ml heparinle yıkandı. Heparinle yıkanmış enjektör ile hastalardan 3-4 ml venöz kan alınarak içerisinde 5 ml besi yeri olan tüpe 8-10 damla (0.5 ml) ekildi ve ekimden hemen sonra 37°C'de etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Kültürün 70. saatinde 100 µl (10 µg/ml) kolşisin ilave edilerek tüp hafifçe alt üst edildi. 2 saatlik 37°C'de inkübasyonu takiben 72. saatte etüvden çıkarılan deney tüpleri, 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki supernatant, pastör pipeti ile atıldı. Pellet üzerinde kalan 1 ml'lik sıvı, pastör pipeti ile karıştırıldı ve üzerine hipotonik solüsyondan 8 ml (0,075 M KCl) vorteks kullanılarak damla damla ilave edilerek 37°C'de 20 dakika

bekletildi. Süre sonunda tekrar 1250 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak dipteki pellet üzerine 8 ml fiksatif damla damla ilave edildi. Tekrar 1250 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Fiksasyon üç kez tekrar edildi. Son fiksasyondan sonra pastör pipeti ile süpernatant atılarak hücreler karıştırıldı. Süspansiyon pipete çekildi. Önceden temizlenmiş ve üzerine ad, soyad, tarih, sıra numaraları yazılmış lamalar kuvvetli nefesle nemlendirildi. Hücre süspansiyonu 8-10 cm’lik mesafeden, 45°’lik açı ile lam üzerine damlatıldı. Preparatlar oda sıcaklığında bir hafta yaşlandırılarak GTG bantlama metodu ile bantlandı .

4.2 Periferik Kan (PK)’dan İnterfaz Preparatı Hazırlanması:

- a) 0.5 ml periferik kan, içinde 7-8 ml hipotonik solüsyon (0.075 M KCl) bulunan steril disposable tüpe eklendi
- b) 37°C’de 20 dakika inkübe edildi.
- c) 1250 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet 1/3 glasiyel asetik asit/metanol fiksatifinde yıkandı. Fiksasyon işlemi üç kere tekrarlandı.
- d) Son fiksasyondan sonra pastör pipeti ile süpernatant atılarak hücreler karıştırıldı. Karışım nemli lamlara 8-10 cm yüksekten 45°’lik açıyla bırakıldı.
- e) Yayma tamamlandıktan sonra preparatlar kurumaya bırakıldı (3-5 saat).
- f) % 50, % 70, % 85, % 90 ve % 99,5’lik alkol serisinde her birinde 2’şer dakika olmak üzere bekletildi ve preparatlar kuruduktan sonra kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi .

4.3 FISH (Fluoresans *İn-Situ* Hibridizasyon) Tekniği

Olgulardan en kısa boylu olduğu belirlenen dördü erkek dördü bayan olmak üzere toplam 8 olguya interfaz FISH metodu uygulandı.

4.3.1 Kullanılan solüsyonlar

1. 20xSSC (Standart Sodyum Sitrat) (1 litre)

Sodyum klorür (Merck, Darmstadt, Germany)..... 175.3 gr

Tri-sodyum-sitrat (Merck, Darmstadt, Germany)..... 88.2 gr

700 ml distile suda eritilerek 1 litreye tamamlandı. pH=7.0'a ayarlandı. Otoklavda sterilize edildi ve buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edildi.

2. 2xSSC (500 ml)

50 ml 20xSSC solüsyonu, 450 ml distile suda çözülerek 500 ml'ye tamamlandı. pH=7.0 olarak ayarlandı.

3. % 70, % 80 ve % 100'lük etil alkol serisi

4. DAPI (4,6-diamino-phenyl-indole) yüzey boyası (Cytocell, Banbury Business Park Addenbury, Oxfordshire, United Kingdom)

5. Tween-20 veya NP-40 yıkama solüsyonu (Nonidet NP-40, Amresco, Solon, Ohio, United States).

50 ml 2xSSC solüsyonu içerisine 50 µl NP-40 ilave edilerek hazırlandı.

6. 0.4xSSC

2 ml 20xSSC solüsyonu, 98 ml distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

4.3.2. Kullanılan Gereçler

0.5 ml mikrosantrifüj tüpleri, mikropipet ve uçları (1, 10 ve 100 µl'lik), 37°C'ye ayarlanabilen benmari, 37°C'ye ayarlanmış etüv, 73°C'ye ayarlanabilen benmari, plastik şale, lamel, rubber solüsyonu (Fixogum Rubber Cement, Marabu, Germany), floresans mikroskop, immersiyon yağı ve parafilm.

4.3.3. Prob

SHOX prob: Biotinle işaretli SHOX bölgesini de içine alan Xp22'deki bölgeye spesifik bir prob kullanıldı (Cytocell, Banbury Business Park Addenbury, United Kingdom).

4.3.4. Hedef Örneklerin Hazırlanması

4.3.4.1 Preparatların Hazırlanması

1. Seçilen olguların sitogenetik çalışma sonucunda elde edilen preparatlarında, elmas uçlu bir kalemle hibridizasyon alanı işaretlendi.
2. Preparat, şaleye konulan 2xSSC solüsyonda 2 dakika bekletildi (37°C).
3. % 70, % 85, % 100'lük alkol serilerinde 2'şer dakika tutuldu ve daha sonra kurumaya bırakıldı.

4.3.4.2 Probun Hazırlanması

Prob ve hibridizasyon solüsyonu -20°C'den çıkarılarak oda ısısına gelene kadar bekletildi. Prob solüsyonunun son hacmi 10 µl olacak şekilde 3 µl prob ve 7 µl hibridizasyon solüsyonu alınarak prob hazırlandı.

4.3.4.3 Denatürasyon

Preparatlar ve prob 37°C'de 5 dakika bekletildi ve 10 µl prob preparatlarda işaretlenmiş bölgeye uygulandı. Üzeri lamelle kapatılan preparatlar rubber solüsyonu ile yapıştırılarak kurumaya bırakıldı. Denatürasyon, PCR cihazında 75°C'de 5 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

4.3.4.4 Hibridizasyon

Örnekler 37°C'ye ayarlanmış benmaride bir gece hibridizasyona bırakıldı.

4.3.4.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkama

Rubber solüsyonu uzaklaştırıldı. Örnekler 0.4xSSC'de 72°C'de iki dakika bekletildi ve bu işlem sonunda lamelin düşmüş olmasına dikkat edildi.

Örnekler daha sonra sırasıyla 2xSSC'de ve % 0.05'lik oda ısısındaki tween 20'de 30'ar saniye yıkandı.

Örneklere 10 µl DAPI uygulanarak, lamel ile yeniden kapatıldı ve 10 dakika karanlık bir ortamda bekletilerek floresans mikroskop ile incelendi.

4.4 DNA İzolasyonu

İncelemeye alınan tüm olguların DNA izolasyonları gerçekleştirilerek polimorfizm çalışmaları için ayrıldı.

4.4.1 Kullanılan solüsyon ve gereçler

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1.5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl'lik pipet (Eppendorf), pipet uçları (Axygen scientific), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol, % 70'lik etil alkol

4.4.2 İzolasyon İşlemi

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13 000-16 000 rpm'de de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.

5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37°C de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.
7. 1.5 µl Rnase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslendi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve -20°C'de saklandı.

4.5 PCR Protokolü

- 20°C'de saklanmış olan DNA'lar çıkartılarak 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi ve üstte kalan % 70'lik etanol atıldı. DNA örneklerinin üzerine 50

μ l distile su konarak oda ısısında 1 saat, takiben 37°C 'lik etüvde bir gece beklemeye bırakıldı.

4.5.1 Kullanılan Solüsyon ve Gereçler

Hasta DNA'ları, H₂O, dNTP seti, MgCl₂, 10X buffer, Taq polimeraz, agaroz, EtBr, DNA boyut markırı, 5X TBE tamponu, yükleme tamponu, mikrosantrifüj, elektronik hassas terazi, vorteks, 37°C'ye ve 65°C'ye ayarlanabilen su banyosu, elektroforez aparatı, elektroforez box, Eppendorf Mastercycler Gradient, UV lambası ile ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi, steril 1.5 ml, 0.5 ml ve 0.2 ml'lik Eppendorf santrifüj tüpleri, Rsa I ve Alu I restriksiyon enzimleri, Ekzon2forward: 5'-CGAGGTCGCCGCGTATAAATA-3' Ekzon2revers: 5'-AGACGGGAGCTGCAAATGTG-3'

4.5.2 PCR Kurulması İşlemi

Her bir tüpe 10 μ l hasta DNA'sı ve üzerine 6 μ l MgCl₂, 6 μ l 10X buffer, 6 μ l dNTP (2.5mM), 1 μ l primer 1 (30pmol), 1 μ l primer 2 (30pmol), 0.3 U Taq DNA polimeraz ve 19.7 μ l ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PCR cihazında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 96°C'de 3 dakika, denatürasyon (melting) için 96°C'de 30 saniye, yapışma (annealing) için 60°C'de 1 dakika, uzatma (extension) için 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirildi. En son döngüdeki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR ampliconları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.5.3 Agaroz Jel Elektorforezi

Elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde koşturuldu. % 2'lik agaroz

jelin hazırlanmasında 2 gr agaroz tartılarak üzerine 100 ml 0.5XTBE eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. Eriyen agaroz-TBE solüsyonu içerisine 7 µl EtBr konuldu ve agaroz-TBE solüsyonu içinde iyice karışması sağlandı. Hazırlanan solüsyon daha önce kenarları bantlanmış olan elektroforez aparatına döküldü ve donmaya bırakıldı.

PCR ürünlerinden 13 µl alınarak 3 µl yükleme boyasıyla karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Her yükleme işleminde 100 bp'lik DNA boyut markırı kullanılarak karşılaştırma ve kontrol işlemleri yapıldı.

4.5.4 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Kesim 20 µl üzerinden yapılmıştır. 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10X buffer, 4 U restriksiyon enzimi ve bunlara ilave olarak suyla toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Kesim işlemi 37° C'de 4 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. İki enzim için de aynı restriksiyon enzim kesim protokolü uygulanmıştır.

4.5.5 Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

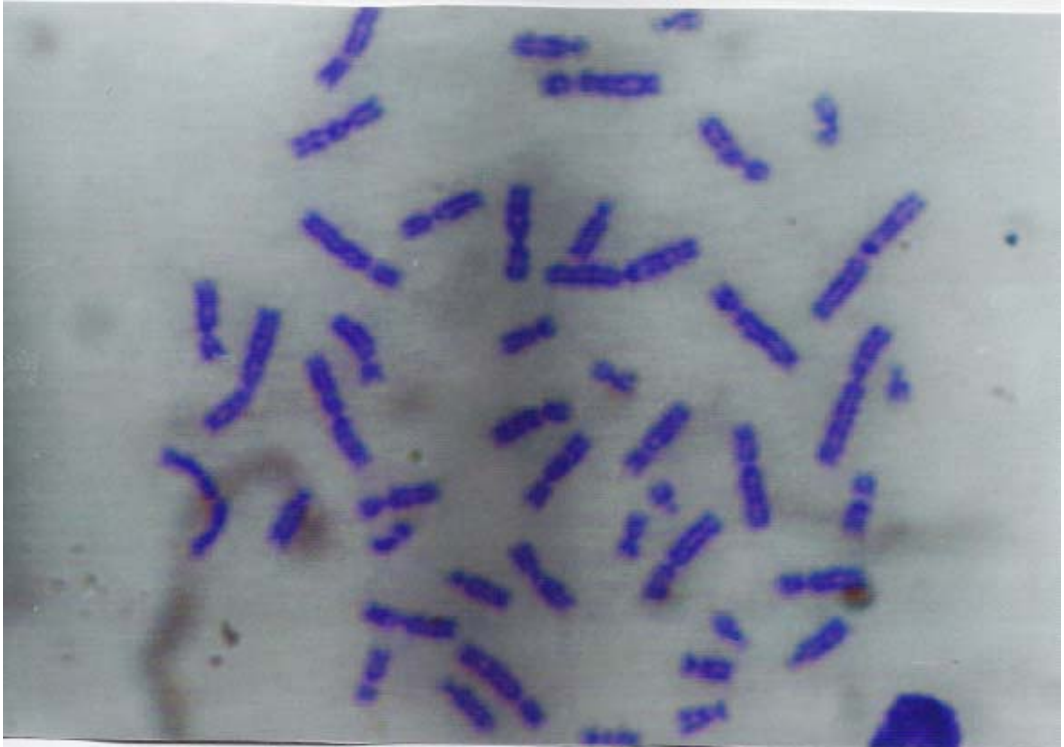
Örnekler 37°C'den çıkarıldıktan sonra % 3'lük agaroz jel elektroforezinde koşturuldu ve görüntüleme sistemiyle görüntülendi.

5. BULGULAR

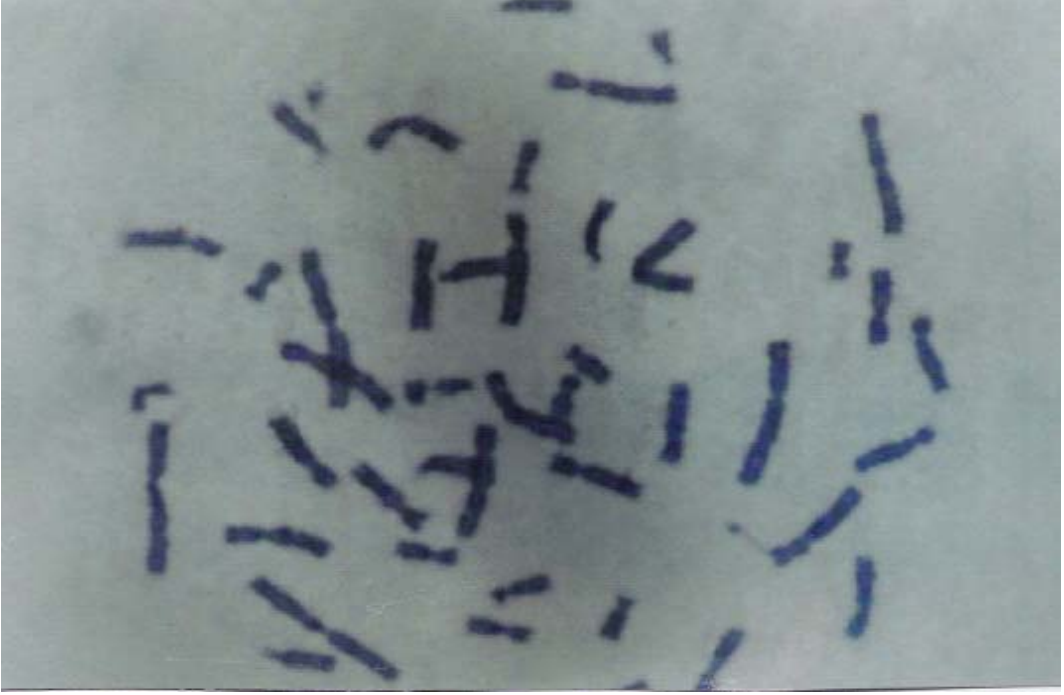
Çalışmaya alınan toplam 100 bireyden 69'u vaka, 31'i kontrol olarak değerlendirildi. Çalışmaya katılanların 48'i erkek ve 52'si bayan bireylerden oluşmaktaydı ve yaş ortalamaları 28.8 (standart sapma 11.33) idi.

5.1 Sitogenetik Bulgular

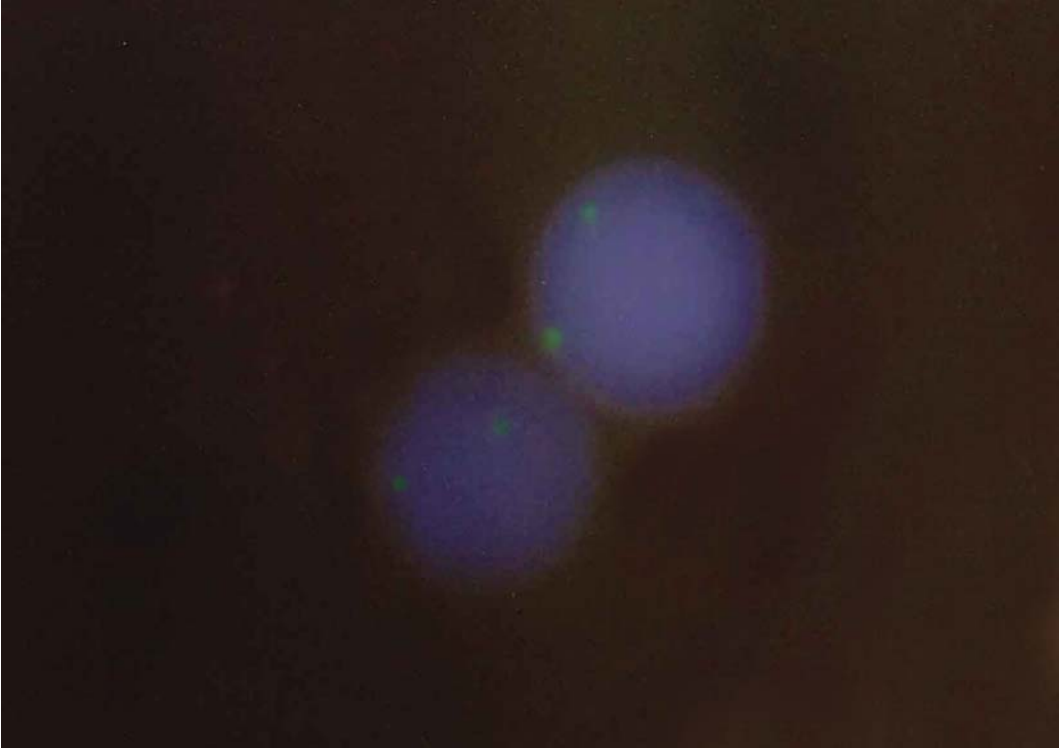
Çalışmaya alınan erkek ve bayan vakaların hepsi konvansiyonel sitogenetik yöntemle incelendi. Sitogenetik yöntemle incelemenin asıl amacı, bayanlardaki Turner Sendromu ihtimalini ortadan kaldırmak ve vaka olarak belirlenen tüm bireylerin kromozomal açıdan normal olduğunu ortaya koymaktı. Yapılan sitogenetik inceleme sonucunda tüm vakaların karyotipi normal olarak değerlendirildi.



Şekil 4: 46,XX karyotipine sahip bireyin metafaz plağı.



Şekil 5: 46,XY karyotipine sahip bireyin metafaz plağı.



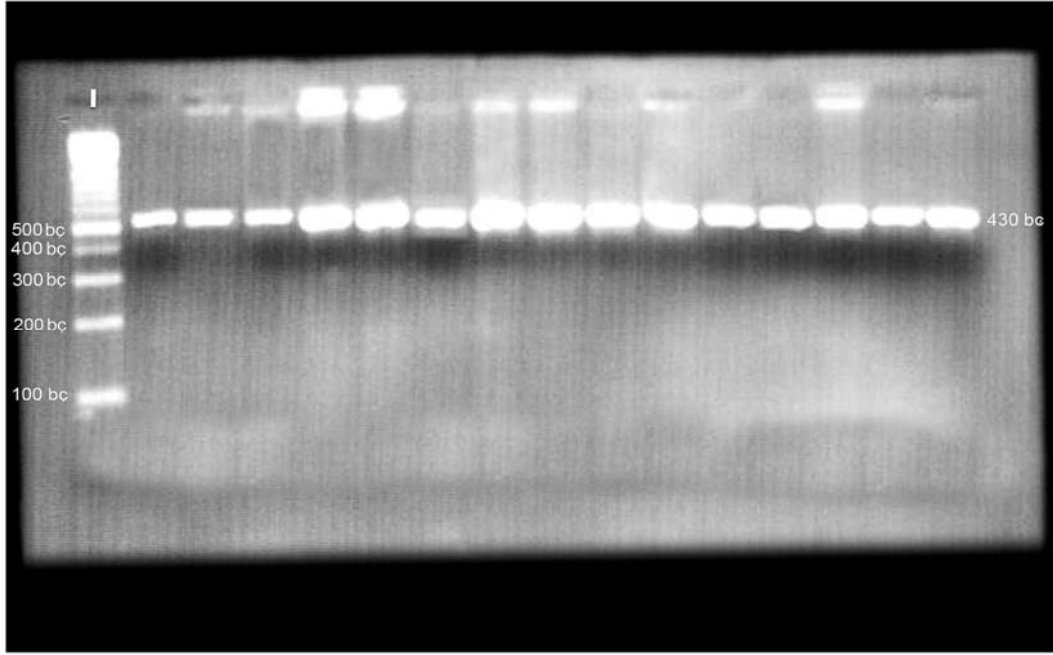
Şekil 6: SHOX genine spesifik olan DXYS129 probu kullanılarak yapılan FISH çalışması sonucunda elde edilen 2 yeşil sinyale sahip bir interfaz hücresi.

5.2 FISH Çalışması Bulguları

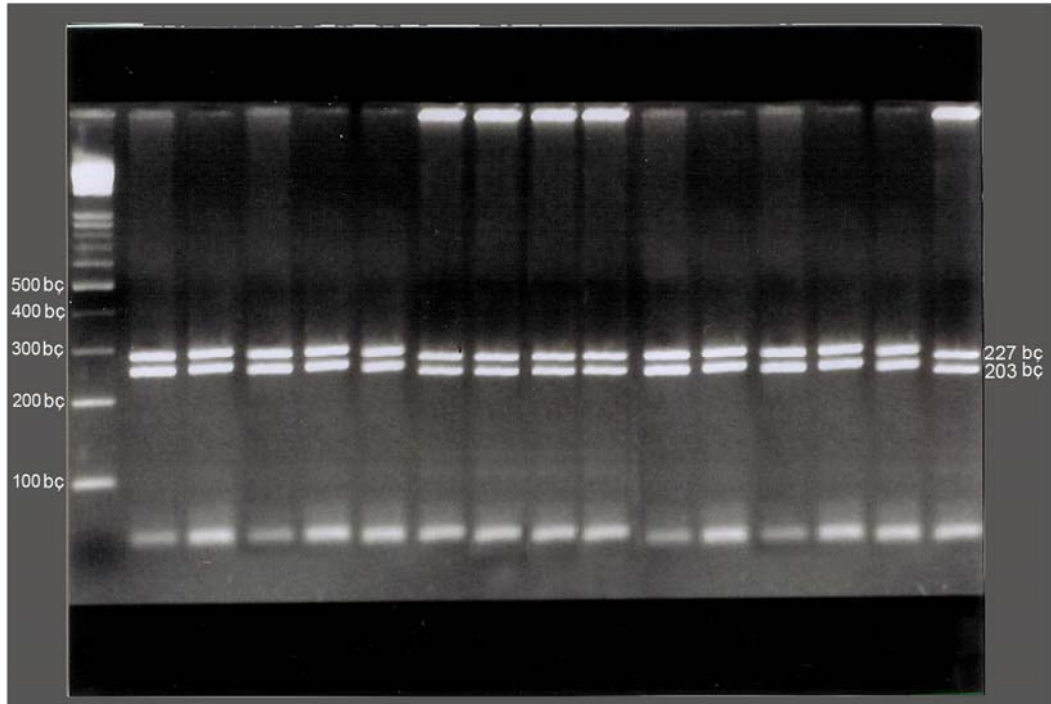
FISH çalışmasına, 4'ü bayan 4'ü erkek toplam sekiz birey (23, 26, 30, 33, 34, 35, 51) alındı. Kullanılan DXYS129 probunun telomerden uzaklığı 160 kb olup SHOX bölgesini de içine alan Xp22 ve Yp11'deki bölgeye spesifiktir. Prob, dioxigenin işaretli olup normal vakalarda 2 yeşil sinyal vermektedir. Çalışılan 8 vakanın FISH analizi sonucunda 2 yeşil sinyal alınmasıyla normal olarak değerlendirildi.

5.3 Moleküler Çalışma Bulguları

Çalışmaya kontrol olarak alınan 31 ve vaka olarak alınan 69 bireyin hepsi moleküler genetik yöntemlerle değerlendirildi. Ekzon2forward: 5'-CGAGGTCGCCGCGTATAAATA-3' ve Ekzon2revers: 5'-AGACGGGAGCTGCAAATGTG-3' primerleri kullanılarak incelenecek bölge çoğaltıldı (S20). A-337G ve Y35X (105 C<A) nokta mutasyonları ekzon 2 için değerlendirildi. A-337G mutasyonunu değerlendirmek için çoğaltılan DNA bölgeleri Alu I enzimiyle ve Y35X mutasyonunu değerlendirmek için Rsa I restriksiyon enzimleriyle kesim işlemi yapıldı (22). AluI enzimi mutasyonlu diziyi ve Rsa I enzimi ise wild type diziyi spesifik olarak kesmektedir. Vaka ve kontroller olmak üzere toplam 100 bireyde, çalışılan mutasyonlardan herhangi biri tespit edilemedi ve bireyler SHOX genindeki bu iki mutasyon açısından normal olarak değerlendirildi.



Şekil 7: A-337G mutasyonu için Alu I restriksiyon enzim kesim sonrası agoroz jele yüklenen ürünlerin görüntüsü.



Şekil 8: Y35X mutasyonu için Rsa I restriksiyon enzim kesim sonrası agoroz jele yüklenen ürünlerin görüntüsü

6. TARTIŞMA

Lineer büyüme, bilinmeyen genlerin mutasyonlarını da içeren pek çok faktör tarafından etkilenen multifaktöriyel bir özelliktir. Kısa boy, genel popülasyondaki bireylerin % 2-3'ünü etkilemekte olup sosyal ve tıbbi öneme sahiptir (39).

İnsan X ve Y kromozomlarının kısa kollarında saptanan küçük delesyonların sürekli olarak kısa boy ile birliktelik gösterdiği gözlemine dayalı olarak, büyümeyi olumlu yönde etkileyen bir genin, cinsiyet kromozomlarının psödootozomal 1 bölgesinde (PAR) yer aldığı ileri sürülmüştür (14). Ogata ve Matsuto adlı araştırmacılar, bu genin PAR1'in 700 kb'lık distalinde lokalize olduğunu göstermiş ve iki grup daha sonra bu bölgede tek bir homeobox geni tanımlamışlardır. Bu gen Rao ve arkadaşlarınca SHOX, Ellison ve arkadaşlarınca ise PHOG (**P**seudoautosomal **H**omeoboxcontaining **O**steogenic **G**ene) olarak adlandırılmıştır (56). 1997'de, SHOX geni, X ve Y kromozomlarının kısa kol bölgelerinin psödootozomal bölgelerinden klonlanmış ve büyümenin düzenlenmesinde aday bir gen olduğu ileri sürülmüştür. Daha sonra LWD'li ve Xp veya Yp delesyonlu hastalarda yapılan pek çok çalışma büyümenin kontrolünde SHOX geninin yer aldığını teyit etmişlerdir. Hem LWD'li hem de İKB'li hastalarda yapılan moleküler çalışmalar SHOX delesyonunun nokta mutasyonlarından daha sık görüldüğünü açığa çıkarmıştır (39).

Ross ve arkadaşları, Langer Mezomelik Displazi'li (LMD) biri bayan diğeri erkek iki kardeşin, akondroplazili ve hipokondroplazili iki bireyle yaptıkları evlilik sonucu doğan 4 çocukta araştırma yapmışlardır. Her bir ailenin biri kız diğeri erkek 2'şer çocuğa sahip oldukları ve her iki ebeveynde de SHOX

allellerinden birinin delesyona uğradığı, fakat diğer SHOX allellerinde moleküler bir defekt tanımlayamadıklarını belirtmişlerdir. Bununla beraber, her iki çiftte de klasik LMD fenotipi belirlenmiştir. Ebeveynlerin 4 çocuğunun da LWD'li olmasına karşın 3 tanesinde SHOX delesyonu tespit etmişlerdir (57). Zinn ve arkadaşları klasik LMD'li 5 probantta çalışma yapmışlar ve 5 hastanın tümünde de SHOX mutasyonu tanımlamışlardır. Çalışmaya katılan iki kardeş probantta bir SHOX allelinin tüm delesyonu, 1 probantta 2 mKBense mutasyon, yine 1 probantta SHOX allellerinden birinde insersiyon ve diğer allelde ise SHOX allelinin tüm delesyonuna rastlamışlardır (78).

Schiller ve arkadaşları 18 aileden gelen LWD'li toplam 32 birey çalışmışlardır. Madelung deformitesi, mezomeli ve kısa boya sahip bu bireylerden yetişkin olanların hepsinde bilateral Madelung deformitesi bulgusuna rastlamışlardır. Bununla beraber yetişkin 18 dişi hastanın 2'sinde ve 5 erkek hastanın 1'inde kısa boy görülmemiştir. Çalışılan 18 ailenin 10'unda, SHOX gen bölgesinde submikroskobik delesyon tanımlamışlardır (61). Cormier- Daire ve arkadaşları 53'ü dişi ve 29'u erkek olmak üzere toplam 82 hastadan oluşan 23 LWD'li aileyi çalışmalarına almışlardır. Tüm ailelerin, LWD'nin tipik klinik ve radyolojik bulgularını gösterdikleri belirtilmiştir. Moleküler SHOX analizleri sonucu, 23 aileden 12'si büyük ölçekli delesyon ve 6'sı nokta mutasyonları göstermiştir (19). Ross ve arkadaşları 21 LWD'li ailede SHOX anormallikleri tanımlamıştır. Bu ailelerden %37.5'inin nokta mutasyonlarına, kalan % 62.5'inin ise gen delesyonlarına sahip oldukları sonucunu bulmuşlardır (56). Grigelioniene ve arkadaşları, LWD'li 5 ve Hipokondroplazi (HCH)'li 18 probantı araştırmışlardır. HCH'li probantlarda HCH ile ilişkisi olduğunu bilinen FGFR3

mutasyonu açısından negatif bireylerdi. Araştırmacılar, LWD'li 3 hastada 3 yeni SHOX mutasyonu, HCH'li bir probandda da bir transisyon bulmuşlardır. LWD'li 2 ve HCH'li 17 hastada ise SHOX mutasyonuna rastlamamışlardır. Bu bireylerde Southern blot analizi kullanılarak yapılan çalışmada küçük yeniden düzenlenmelere de rastlanmamıştır (55).

Normalde PAR1 bölgesinde yer alan genler X inaktivasyonundan kurtulmakta ve bu genler hem erkeklerde hem de dişilerde iki fonksiyonel kopya halinde bulunmaktadır (14). Böylece hem aktif hem de inaktif X kromozomundan eksprese olan SHOX geni, hem dişiler hem de erkeklerde aynı dozajla eksprese olmaktadır (62). Turner Sendromu X kromozomunun tüm veya parsiyel kaybı ile ilişkili, yaygın bir bozukluktur (30). Turner Sendromu'nda görülen tüm X kromozomal aberasyonları SHOX'un tek doz yetersizliği ile sonuçlandığından, kaybedilen SHOX allelinin bu sendromdaki büyüme başarısızlığına sebep olduğu kuvvetle muhtemeldir (13).

Kısa boy genel popülasyondaki bireylerin %2-3'ünü etkilemektedir (39). SHOX tek doz yetersizliği, hem Turner Sendromu'nda hem de LWD'li hastaların % 60'ından fazlasında SHOX geninin nokta mutasyonları veya delesyonlarına bağlıdır. SHOX eksikliğinin Turner Sendromu ve LWD'de iyice anlaşılmasına karşın, SHOX mutasyonlarının izole kısa boylu hastalarda oynadığı role ilişkin bilgiler sınırlıdır (55). Hem LWD hem de yine bir iskelet displazisi olan Hipokondroplazi'de (HCH) fenotip, orta dereceden şiddetliye değişim gösterdiğinden, bu iki bozukluğu birbirinden ve İKB'den ayırt etmekte zorluklarla karşılaşmaktadır (24). SHOX'u eksik bireyler hafif, zorlukla ortaya konabilen iskelet malformasyonlarından, bu hastaların yaşamlarını olumsuz yönde etkileyen

ciddi displazilere kadar değişen hatırı sayılır bir fenotipik heterojenite göstermektedirler (54). Bununla beraber SHOX'taki aynı mutasyonun LWD veya İKB fenotipine yol açtığı da gözlenmiştir (42, 55). Dolayısıyla, bazı LWD vakaları, İKB olarak teşhis edilmektedir (56). Tüm bu sebepler de göz önüne alınarak İKB'li bireylerde SHOX genindeki mutasyonlar ve delesyonların bazı LWD ve HCH'li olgulardaki mutasyonlardan ayırt edilmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır.

Çalışmamızda, idiopatik kısa boylu hastalarda yapılan diğer çalışmalara uygun olarak, seçtiğimiz hastaların karyotipik olarak normal olduğunu konvansiyonel sitogenetik metotla ortaya koyduk (39, 40, 54, 55). Böylelikle özellikle dişi bireyler için Turner Sendromu olasılığı ortadan kaldırılmıştır (30).

Çalışma grubumuz içerisinde normal karyotipe sahip İKB'li hastalardan boyları ortalamanın altında kalan ve en kısa boya sahip olduğu belirlenen 8 bireye uyguladığımız interfaz FISH çalışması sonucunda, 8 bireyden de 2 yeşil sinyal alındı ve bu bireyler normal olarak değerlendirildi. İKB'li hastalarda yapılan diğer çalışmalarda, FISH yöntemi için SHOX genine özgü ve Xp22.3 ile Yp11.3'te lokalize olan LLNOYCO3'M'34F5 kozmid probu kullanılmıştır (39, 40, 55). Çalışmayı yaptığımız sırada bu prob ticari olarak elde edilebilir olmadığından, SHOX bölgesini de içine alan Xp22 ve Yp11'deki bölgeye spesifik farklı bir prob kullanıldı. İnterfaz FISH metodu uygulanarak elde edilen sonuç, Müsebeck ve arkadaşlarının (40) 35 İKB'li probantta yaptıkları çalışmanın sonucuyla uyumludur. Buna karşın, Morizio ve arkadaşlarının 33 dişi ve 23 erkek olmak üzere toplam 56 İKB'li hastada FISH metodu ile yaptıkları araştırma sonucu 4 hastada (%7.1) tek bir SHOX geni kopyasının varlığını tespit etmişlerdir. Bu 4

hastada da SHOX'un bir kopyasının delesyonunun de novo olduğu ve X kromozomunda meydana geldiği ortaya konmuştur (39). Benzer şekilde Binder ve arkadaşları 68 İKB'li hasta çalışmışlar ve yalnızca 1'inde SHOX delesyonu bulmuşlardır (13). Rao ve arkadaşları da İKB'li 91 hastada yaptıkları inceleme sonucu sadece 1 hastada, SHOX geninde bir nokta mutasyon tespit etmişlerdir (54). Diğer bir çalışmada Rappold ve arkadaşları 150 İKB'li hastayı FISH ile incelemişler ve 3'ünde SHOX delesyonuna rastlamışlardır (55).

Konvensiyonel ve moleküler sitogenetik (FISH) çalışmaları tamamlandıktan sonra, hasta grubumuzda olan 69 birey ve kontrol olarak kullanılan 31 birey moleküler genetik olarak da araştırıldı. SHOX geni ile ilgili daha önce yapılmış olan çalışmalar dikkate alınarak seçilen A-337G ve Y35X mutasyonlarını kendi hasta ve kontrol grubumuzda değerlendirdik. Y35X'teki değişim C105A şeklinde tanımlanmıştır ve anlamsız (nonsense) mutasyona neden olmaktadır (22).

A337G ve Y35X mutasyonlarının hasta grubumuzda var olup olmadığı, hastaların PCR ürünlerinin AluI I ve Rsa I restriksiyon enzim kesimiyle araştırıldı. Alu I enzimiyle kontrol edilen hastalar ve kontroller A337G mutasyonu açısından negatif olarak değerlendirildi. Aynı şekilde Y35X mutasyonu Rsa I enzimi ile araştırıldı ve hasta ile kontrollerin tümü bu mutasyon açısından da negatif bulundu.

Rappold ve arkadaşları 2002 yılında 900 İKB'li hastada yaptıkları çalışmada hastaların %2.4'ünde SHOX mutasyonlarını tespit etmişlerdir. Çalışmada A337G mutasyonunu 2 (%0.22) hastada tespit etmişlerdir. Hasta seçim kriterlerinin farklı olduğu göz önünde bulundurulursa bu mutasyona çalışma

grubunda rastlanmaması mümkündür. Daha önce Flanagan ve arkadaşlarının LWD'li hastalarda yapmış oldukları çalışmada tespit ettikleri Y35X mutasyonuna İKB'li 69 bireyde rastlanmamıştır. Bu mutasyon, muhtemelen LWD spesifik olup İKB'ye neden olmamaktadır. Daha önce İKB'li bireylerde yapılan SHOX geni mutasyon tarama çalışmalarında bu mutasyonun İKB'ye neden olduğuna dair bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Gendeki aynı mutasyonların İKB veya LWD'ye neden olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Örneğin R195X mutasyonuna hem LWD'li hem de İKB'li bireylerde rastlanmıştır (55). SHOX geninde belirlenen mutasyonların restriksiyon fragment uzunluk polimorfizimi yöntemi ile hem İKB hem de LWD hastalarında taranması her iki hastalığa neden olabilen ortak nokta mutasyonlarının belirlenmesi açısından önemlidir.

Sonuç olarak sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler incelemelerimiz sonucunda, İKB'li 69 proband ve 31 kontrol bireyinde herhangi bir anormalliğe rastlanmadı. Ancak çalışma, SHOX geninin 2. ekzon primerleri (24) kullanılarak yapılmış olup sadece bu ekzondaki A-337G ve Y35X olmak üzere iki mutasyonun varlığı araştırılmıştır. Oysa SHOX genindeki mutasyonlar tüm gen boyunca dağılım göstermektedir (42). Dolayısıyla İKB'li hastaları SHOX gen mutasyonları açısından değerlendirirken, bu gene ait tüm ekzonların incelenmesinin daha doğru sonuçlar vereceği kanaatindeyiz. Bununla beraber İKB'li hastalarda, SHOX'ta görülen mutasyonların prevalansının % 1 olduğu (54) dikkate alındığında, İKB'li hastalardaki SHOX mutasyonu araştırması için daha fazla sayıda hasta incelemenin daha bilgi verici olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Açık Y, Bulut HY, Glbayrak C, Ardıçoğlu , İlhan N. (2004). Effectiveness of a diabetes education and intervention program on blood glucose control for patients with type 2 diabetes in a Turkish Community. Southeast Asian J. Trop Med Public Health. Vol: 35 No:4.
2. Açık Y, Güngör L, Kuloėlu M, Atmaca M, Güngör MY, Oėuzncl AF. (2003). Orta ve ileri yaşlardaki kadınlarda depresyon belirtileri sıklığı ve etkileyen faktörler. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi, Cilt: 20 Sayı:1.
3. Akın H. (2003). Tıbbi genetik terimleri szlğ. Sendrom III. Cilt:1, Sayı:1.
4. Albanes D, Jones DY, Schatzkin A, Micozzi MS, Taylor PR. (1988). Adult stature and risk of cancer. Cancer Res 48(6): 1658-1662.
5. Andersson SO, Wolk A, Bergstrom R, Adami HO, Engholm G, Englund A, Nyren O. (1997). Body size and prostate cancer: A 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. J Natl Cancer Inst 89(5): 385-389.
6. Anonim. (2004). Human Genetics. Eriřim: (<http://www.uic.edu/classes/bms/bms655/lesson11.html>). Eriřim tarihi: 02.05.2004.
7. Anonim. (2004). Multifactorial Inheritance. Eriřim: (<http://www.alsa-or.org/research/inheritance.htm>). Eriřim tarihi: 15.05.2004.
8. Anonim. (2004). Multifactorial Inheritance. Eriřim: (<http://www.uic.edu/nursing/genetics/Lecture/Types/Multifactorial/multifact.htm>). Eriřim tarihi: 07.05.2004.
9. Anonim. (2004). Polymorphisms. Eriřim: (<http://www.users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Polymorphisms.html>). Eriřim tarihi: 02.05.2004.
10. Anonim. (2004). Dictionary. Eriřim: (<http://www.answers.com/topic/stature>). Eriřim tarihi: 03.02.2004.
11. Beunen G, Thomis M, Maes HH, Loos R, Malina RM, Claessens AL, Vlietinck R. Genetic variance of adolescent growth in stature. Ann Hum Biol 27(2): 173-186.
12. Bilge I, Kayserili H, Emre S, Nayir A, Sirin A, Tkel T, Bas F, Kilic G, Basaran S, Gunoz H, Apak M. (2000). Frequency of renal malformations in Turner syndrome: analysis of 82 Turkish children. Pediatr Nephrol 14: 1111-1114.
13. Binder G, Schwarze CP, Ranke MB. (2000). Identification of short stature caused by SHOX defects and therapeutic effect of recombinant human growth hormone. J Clin Endocrinol Metab Vol. 85, No.1: 245-249.
14. Blaschke RJ, Rappold GA. (2000). SHOX: Growth, Leri-Weill and Turner syndromes. TEM Vol. 11, No. 6: 227-230.
15. Blaschke RJ, Töpfer C, Marchini A, SteinbeİKBer H, Janssen JWG, Rappold GA. (2003). Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. J Bio Chemist Vol. 278, No. 48: 47820-47826.

16. Boycott KM, Parslow MI, Ross JL, Miller IP, Hansen NTB, MacLeod PM. (2003). A familial contiguous gene deletion syndrome at Xp22.3 characterized by severe learning disabilities and ADHD. *Am J Med Genet* 122A: 139-147.
17. Brush G, Harrison GA. (1990). Components of growth variation in human stature. *IMA J Math Appl Med Biol* 7(2): 77-92.
18. Conner JM, Ferguson MA. (1993). *Essential Medical Genetics*. Blackwell Scientific Publications. Fourth Edition. P: 97-103.
19. Daire VC, Huber C, Munnich A. (2001). Allelic and nonallelic heterogeneity in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Am J Med Genet* 106: 272-274.
20. Deng H, Xu F, Liu Y, Shen H, Deng H, Huang Q, Liu Y, Conway T, Li J, Davies KM, Recker RR. (2002). A whole-genome linkage scan suggests several genomic regions potentially containing QTLs underlying the variation of stature. *Am J Med Genet* 113: 29-39.
21. Eaton SB, Konner M, Shostak M. (1988). Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am J Med* 84(4):739-749.
22. Flanagan SF, Munns CFJ, Hayes M, Williams B, Berry M, Vickers D, Rao E, Rappold GA, Batch JA, Hyland VJ, Glass IA. (2002). Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood. *J Med Genet* 39:758-763.
23. Goldbourt U, Tanne D. (2002). Body height is associated with decreased long term stroke but not coronary heart disease mortality? *Stroke* 33: 743-748.
24. Grigeliuniene G, Eklöf O, Ivarsson SA, Westphal O, Neumeyer L, Kedra D, Dumanski J, Hagenas L. (2000). Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum Genet* 107: 145-149.
25. Gunnell D, Okasha M, Smith GD, Oliver SE, Sandhu J, Holly JM. (2001). Height, leg length, and cancer risk: a systematic review. *Epidemiol Rev* 23(2): 313-342.
26. Güngör MY. (2001). Elazığ Yeni Mahalle Eğitim ve Araştırma Sağlık Ocağı bölgesindeki 35 ve üstü yaş grubunda hipertansiyonun prevalansı ve kontrolündeki eksikliklerin saptanması. Uzmanlık tezi. T.C. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı ABD.
27. Hebert PR, Ajani U, Cook NR, Lee IM, Chan KS, Hennekens CE. (1997). Adult height and incidence of cancer in male physicians (United States). *Cancer Causes Control* 8(4): 591-597.
28. Hisama FM, Zemel S, Cherniske EM, Vladuitu GD, Pober BR. (2001). 46,XX Gonadal dysgenesis, short stature, and recurrent metabolic acidosis in two sisters. *Am J Med Genet* 98: 121-124.
29. Ijzerman RG, Stehouwer CD, van Wel KB, Benbruch MM, de Geus EJ, Boomsma DI. (2001). Intra-uterin and genetic influences on the relationship between size at birth and height in later life: analysis in twins. *Twin Res* 4(5): 337-343.

30. Jones MC, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA. (2000). The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* Vol. 9, No.5: 695-702.
31. Karlberg J, Luo ZC. (2000). Foetal size to final height. *Acta Paediatr* 89(6): 632-636.
32. Kee F, Nicaud V, Tiret L, Evans A, O'Reilly D, Backer G. (1997). Short stature and heart disease: nature or nurture? *Int J Epidemiol* Vol. 26, No. 4: 748-756.
33. Knudsen LE, Loft SH, Autrup H. (2001). Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res* 482: 83-88.
34. Kusin JA, Kardjati S, Houtkooper JM, Renqvist UH. (1992). Energy supplementation during pregnancy and postnatal growth. *Lancet* 340(8820): 623-626.
35. Lee HY, Kim D, Choi MY. (1998). Genetic polymorphism in an evolving population. *Physical Review E* Vol. 57, No. 4: 4842-4845.
36. Luo ZC, Low LC, Karlberg J. (2000). Fetal size to final height in hong Kong Chinese children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(3): 269-279.
37. McCarron P, Okasha M, McEwen J, Smith GD. (2002). *Am J Epidemiol* 155(8): 688-689.
38. Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsway V, Easter TE, Gregory JW, Fryklund L, Norin M, Crowne EC, Davies SJ, Edwards P, Kirk J, Waldron K, Smith PJ, Phillips JA, Scanlon MF, Krawczak M, Cooper DN, Procter AM. (2003). Novel mutations of the Growth Hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Hum Mutat* 21: 424-440.
39. Morizio E, Stuppia L, Gatta V, Fantasia D, Franchi PG, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D, Giannotti A, Verrotti A, Chiarelli F, Calabrese G, Palka G. (2003). Deletion of the SHOX gene in patients with short stature of unknown cause. *Am J Med Genet* 119A: 293-296.
40. Müsebeck J, Mohnike K, Beye P, Tönnies H, Neitzel H, Schnabel D, Grüters A, Wieacker PF, Stumm M. (2001). Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridisation in patients with short stature. *Eur J Pediatr* 160: 561-565.
41. Neyzi O, Ertuğrul T. (2002). *Pediatric. Nobel Tıp Kitabevleri. Üçüncü Baskı. S:120-132.*
42. Niesler B, Fischer C, Rappold GA. (2002). The human SHOX mutation database. *Hum Mutat* 20: 338-341.
43. Ohlsson C, Sjögren K, Jansson JO, Isaksson OGP. (2000). The relative importance of endocrine versus autocrine/paracrine insulin-like growth factor-1 in the regulation of body growth. *Pediatr Nephrol* 14: 541-543.
44. Okasha M, Gunnell D, Holly J, Smith GD. (2002). Childhood growth and adult cancer. *Best practice & research clinical endocrinology and metabolism* Vol. 16, No. 2: 225-241.

45. Parker DR, Lapane KL, Lasater TM, Carleton RA. (1998). Short stature and cardiovascular disease among men and women from two southeastern New England communities. *Int J Epidemiol* 27: 970-975.
46. Peck MN, Lundberg O. (1995). Short stature as an effect of economic and social conditions in childhood. *Soc Sci Med* 41(5): 733-738.
47. Petrelli JM, Calle EE, Rodriguez C, Thun MJ. (2002). Body mass index, height, and postmenopausal breast cancer mortality in a prospective cohort of US women. *Cancer Causes Control* 13(4): 325-332.
48. Phillips K, Matheny AP Jr. (1990). Quantitative genetic analysis of longitudinal trends in height: preliminary results from the Louisville Twin Study. *Acta Genet Med Gemellol* 39(2):143-163.
49. Pine DS, Cohen P, Brook J. (1996). Emotional problems during youth as predictors of stature during early adulthood: results from a prospective epidemiologic study. *Pediatrics* 97: 856-863.
50. Prandstraller D, Mazzanti L, Picchio FM, Magnani C, Bergamaschi R, Perri A, Tsingos E, Cacciari E. (1999). Turner's Syndrome: cardiologic profile according to the different chromosomal patterns and long-term clinical follow-up of 136 nonpreselected patients. *Pediatr Cardiol* 20: 108-112.
51. Preece MA. (1996). The genetic contribution to stature. *Horm Res* 45(2): 56-58.
52. Rantakallio P. (1983). A follow-up study up to the age of 14 of children whose mothers smoked during pregnancy. *Acta Paediatr Scand* 72(5): 747-753.
53. Rao E, Weik B, Fukami M, Mertz A, Meder J, Ogata T, Heinrich U, Garcia-Heras J, Schiebel K, Rappold GA. (1997). FISH deletion mapping defines a 270-kb short stature critical interval in the pseudoautosomal region PAR1 on human sex chromosomes. *Hum Genet* 100: 236-239.
54. Rao E, Weik B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA. (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16: 54-63.
55. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadoupoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T. (2002). Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *The Journal of clinical Endocrinology&Metabolism* 87(3): 1402-1406.
56. Rosenfeld RG. (2001). Editorial: A SHOX to the system. *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5672-5673.

57. Ross JL, Bellus G, Scott CI, Abboudi J, Grigelioniene G, Zinn AR. (2003). Mesomelic and rhizomelic short stature: the phenotype of combined Leri-Weill Dyschondrosteosis and achondroplasia or hypochondroplasia. *Am J Med Genet* 116A: 61-65.
58. Sağlam M, Aştı RV, Özer A. (1997). Genel Histoloji. Yorum Matbaacılık Sanayii. S: 202-203.
59. Samaras TT, Elrick H, Storms LH. (2003). Is height related to longevity? *Life Sciences* 72: 1781-1802.
60. Samaras TT, Elrick H, Storms LH. (2004). Is short height really a risk factor for coronary heart disease and stroke mortality? A review. *Med Sci Monit* 10(4): RA63-76.
61. Schiller S, Spranger S, Schechinger B, Fukami M, Merker S, Drop SLS, Tröger J, Knoblauch H, Kunze J, Seidel J, Rappold GA. (2000). Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Leri-Weill syndrome. *Eur J Hum Genet* 8: 54-62.
62. Shago M, Sgro M, Barozzino T, Antinucci D, Chakraborty P, Chitayat D, Teshima I. (2002). An active ring X and haploinsufficiency of SHOX contribute to short stature, congenital anomalies, and developmental delay in a female. *Am J Med Genet* 113: 279-285.
63. Shors AR, Solomon C, McTiernan A, White E. (2001). Melanoma risk in relation to height, weight, and exercise (United States). *Cancer Causes Control* 12(7): 599-606.
64. Sinclair D. (1989). *Human Growth after Birth*. Oxford University Press. Fifth Edition. P:63-70-160-161.
65. Silventonien K. (2003). Determinants of variation in adult body height. *J Biosoc Sci* 35(2): 263-285.
66. Silventonien K, Kaprio J, Koskenvuo M, Lahelma E. (2003). The association between body height and coronary heart disease among Finnish twins and singletons. *Int J Epidemiol* 32(1): 78-82.
67. Silventonien K, Kaprio J, Lahelma E. (2000). Genetic and environmental contributions to the association between body height and educational attainment: a study of adult Finnish twins. *Behav Genet* 30(6):477-485.
68. Silventonien K, Kaprio J, Lahelma E, Koskenvuo M. (2000). Relative effect of genetic and environmental factors on body height: differences across birth cohorts among Finnish men and women. *Am J Public Health* 90(4): 627-630.
69. Silventonien K, Kaprio J, Lahelma E, Viken RJ, Rose RJ. (2001). Sex differences in genetic and environmental factors contributing to body height. *Twin Res* 4(1): 25-29.
70. Silventonien K, Lahelma E, Rahkonen O. (1999). Social background, adult body-height and health. *Int J Epidemiol* 28(5): 911-918.
71. Silventonien K, Sammalisto S, Perola M, Boomsma D, Cornes BK, Davis C, Dunkel L, de Lange M, Harris JR, Hjelmborg JVB, Luciano M, Martin NG, Mortensen J, Nistico L, Pedersen NL, Skytthe A, Spector TD, Stazi MA, Willemsen G, Kaprio J. (2003).

- Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res* Vol. 6, No. 5: 399-408.
72. Smith GD, Shipley M, Leon DA. (1998). Height and mortality from cancer among men: prospective observational study. *BMJ* Volume 317:1351-1352.
 73. Smith K. (2002). Genotyping, haplotype assembly problem, haplotype map, functional genomics and proteomics.
 74. Soares SR, Vidal F, Bosch M, Pasrell OM, Nogues C, Egozcue J, Templado C. (2001). Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108: 499-503.
 75. Stindl R. (2004). Tying it all together: telomeres, sexual size dimorphism and the gender gap in life expectancy. *Med Hypotheses* 62: 151-154.
 76. Tretli S. (1989). Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570000 women in Norway. *Int J Cancer* 44(1): 23-30.
 77. Turner C, Dennis NR, Skuse DH, Jacobs PA. (2000). Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet* 106: 93-100.
 78. Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI, Marttila P, Ross JL. (2002). Complete SHOX deficiency causes langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 110: 158-163.
 79. Wannamethee SG, Shaper AG, Winchup PH, Walker M. (1998). Adult height, stroke, and coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 148(11): 1069-1076.
 80. Wild SH, Laws A, Fortmann SP, Varady AN, Byrne CD. (1995). *Ann Epidemiol* 5(6): 432-439.
 81. Willet WC. (2000). Nutritional epidemiology. *Epidemiol Rev* 22(1):82-86.

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 tarihinde Antakya’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Antakya’da tamamladım. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım.

Semra KALKAN