

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**DİSTROFİNOPATİLİ AİLELERDE
GENOTİP VE FENOTİP İLİŞKİSİNİN
AYRINTILANDIRILMASI**

DR. HANDE ÖZKALAYCI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2019

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**DİSTROFİNOPATİLİ AİLELERDE
GENOTİP VE FENOTİP İLİŞKİSİNİN
AYRINTILANDIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. HANDE ÖZKALAYCI

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
GRAFİK LİSTESİ	vi
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Distrofinopati Tanım ve Kısa Tarihçe	5
2.2. Klinik Tipler.....	5
2.2.1. Duchenne Musküler Distrofi.....	5
2.2.1.1. Duchenne Musküler Distrofi’de Kognitif Fonksiyonlar ve Nörogelişimsel Hastalıklar	6
2.2.2. Becker Musküler Distrofi	7
2.2.3. Semptomatik Kadın Taşıyıcılar	7
2.3. Tanı	8
2.3.1. Serum Biyokimyası	8
2.3.2. Moleküler Tanı	9
2.3.3. Kas Biyopsisi.....	10
2.4. Distrofin Geni	11
2.4.1. Genin Keşfi	11
2.4.2. Doku Spesifik Promotörleri	11
2.5. Distrofin Proteini.....	12
2.5.1. Distrofin Glikoprotein Kompleksi	14
2.6. Duchenne Musküler Distrofi Patofizyolojisi	16
2.7. Genotip Fenotip Korelasyonları.....	18
2.8. Tedavi	20
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	21

3.1. Hasta Seçimi	21
3.2. Verilerin Toplanması	21
3.3. Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metodu.....	22
3.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyon.....	22
3.3.2. Spektrofotometre ile DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi.....	22
3.3.3. Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu	23
3.3.4. Kapiler Elektroforez Cihazına Yükleme	24
3.3.5. <i>DMD</i> geni Sekanslaması	25
3.3.6. Varyantların analizi	25
3.4. Okuma Çerçevesi Analizi	25
3.5. IQ Ölçümü ve Psikiyatrik Değerlendirme	25
3.5.1. Wechsler Çocuklar İçin Zeka Ölçeği (WISC-R)	25
3.5.2. Okul Çağı Çocukları için Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi – Şimdi ve Yaşam Boyu Versiyonu – Versiyon 1.0 [Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School Aged Children – Kiddie-SADS-Present and Lifetime Version]	26
3.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	26
4. BULGULAR	27
4.1. Olguların Demografik ve Klinik Profilleri.....	27
4.2. Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu İle Saptanan <i>DMD</i> Gen Mutasyonları	27
4.2.1. <i>DMD</i> Genindeki Delesyon Paternleri	28
4.2.2. <i>DMD</i> Genindeki Duplikasyon Paternleri.....	29
4.3. Kırık Noktaların Dağılımı	32
4.3.1. Delesyon Kırılma Noktaları Dağılımı	32
4.3.2. Duplikasyon Kırılma Noktaları Dağılımı	32
4.4. <i>DMD</i> Geni Sekans Analizi Sonuçları.....	35
4.5. Aile Öyküsü Ve Taşıyıcılık Durumları.....	35
4.6. Okuma Çerçevesi ve Fenotipler.....	37
4.6.1. Okuma Çerçevesine Uymayan <i>DMD</i> Olguları	37
4.6.2. Okuma Çerçevesine Uymayan <i>BMD</i> Olguları.....	38
4.7. Kardiyomyopati saptanan olgular.....	39

4.8. “Manifest” Taşıyıcılar.....	40
4.9. Gonadal Mozaiklik Tespit Edilen Aileler	40
4.10. Psikiyatrik Değerlendirme	40
4.10.1. IQ ölçümleri	40
4.10.2. Saptanan Psikopatolojiler	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
7. KAYNAKLAR.....	51
8. EKLER	62
EK 1. Etik Kurul Onayı	62
EK 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	64
EK 3. Etik Kurul Onayı (Psikiyatri).....	66
EK 4. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Psikiyatri)	67
EK 5. Veri Kayıt Formu	71

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Nokta mutasyonu tespit edilen olgular ve mutasyonları

Tablo 2. Okuma çerçevesi kuralına uymayan büyük yeniden düzenlenmeler

Tablo 3. Kardiyomyopati olguları ve genotipleri

Tablo 4. “Manifest” taşıyıcı olgular

Tablo 5. Dp140 izoform ekspresyonuna göre DMD olgularının IQ puan ortalamaları

Tablo 6. Psikiyatrik değerlendirmeye alınan olguların mutasyonları, ek tanıları ve zihinsel durumları



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** A: Distrofin geninin genomik organizasyonu;
B: Farklı distrofin proteinlerinin domain kompozisyonları
- Şekil 2.** Distrofin molekülü ve tanımlanan partnerleri
- Şekil 3.** Distrofin glikoprotein kompleksi



GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1.** Duplikasyon olgularında etkilenen ekzonların sıklıkları
Grafik 2. Delesyon olgularında etkilenen ekzonların sıklıkları
Grafik 3. *DMD* genindeki delesyonların intronik kırılma noktalarının dağılımı
Grafik 4. *DMD* genindeki duplikasyonların intronik kırılma noktalarının dağılımı
Grafik 5. A) Delesyonlu olgularda annenin taşıyıcılık durumu;
B) Duplikasyonlu olgularda annenin taşıyıcılık durumu
Grafik 6. Olgulardaki familyal ve sporadik vakaların dağılımı



KISALTMALAR

ABD1	Aktin bağlayıcı domain 1
ABD2	Aktin bağlayıcı domain 2
aCGH	Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
AD	Anabilim Dalı
ADHD	Attention deficiency and hyperactivity disorder
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BMD	Becker musküler distrofi
Ca	Kalsiyum
cDNA	Komplementer deoksiriboz nükleik asit
CK	Kreatin kinaz
CR	Sistein-zengin domain
CT	Karboksi terminal domain
DEHB	Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu
DEUTF	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
DGC	Distrofin glikoprotein kompleks
DKMP	Dilate kardiyomyopati
DMD	Duchenne musküler distrofi
H	Menteşe yapıları
hnRNPA1	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A1
IHK	İmmunohistokimya
IL-1	İnterlökin-1
IQ	Intelligence quotient
kDa	Kilodalton
LINEs	Uzun dağılmış nükleer elemanlar
LOVD	Leiden Open Variation Database
MDB	Major depresif bozukluk
MLPA	Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu
NF-kappa	Nükleer faktör kappa

NGS	Yeni nesil dizi analizi
NMD	Nonsens aracılı mRNA yıkımı
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NT	Amino terminal domain
OKB	Obsesif kompulsif bozukluk
OSB	Otizm spektrum bozukluğu
PDGFRα	Platelet kökenli büyüme faktörü reseptör α
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Rod domainin her bir tekrar bölgesi
ROS	Reaktif oksijen subünitleri
SPSS	Statistical Package for Social Science
SSPN	Sarkospan
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
UGC	Ütrofin glikoprotein kompleks
UK	Birleşik Krallık
UMD	Universal Mutation Database
WISC-R	Wechsler Çocuklar İçin Zeka Ölçeği
YAB	Yaygın anksiyete bozukluğu
α-DG	α -dystroglikan
β-DG	β -dystroglikan

TEŞEKKÜR

Öncelikle uzun yıllardan beri canla başla Duchhene musküler distrofi olgularına ve ailelerine hizmet veren, tez yürütücüm olan ve kapısına her gittiğimde beni hoşgörüyüyle karşılayan Sayın Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp' e içten teşekkürlerimi sunuyorum. Bu hastalar ve aileleri ile çalışmama vesile olduğu için de kendisine ayrı minnettarlık duyuyorum.

Bu olgular için yıllardır büyük özveriyle çalışan hocalarım Prof. Dr. Derya Erçal'a, Prof. Dr. Özlem Giray Bozkaya'ya, Doç. Dr. Elçin Bora'ya, Doç. Dr. Tufan Çankaya'ya ve yıllardan beri *DMD* gen analizi için laboratuvarda gayret ve sabırla çalışan Bio. Funda Yetiş'e, verilerin kayıtlarına emek vermiş olan Uzm. Dr. Cemre Randa'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Geldiği günden bugüne, deneyimini, bilgisini bizimle paylaşan, bize cesaret veren, yol gösteren, hasta sonuçlarını heyecanla benimle paylaşan, güzel yürekli ağabeyim Dr. Öğr. Üyesi Altuğ Koç'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Olguların klinik takip verilerini bizimle paylaşan, Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Uluç Yiş'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın psikiyatrik değerlendirme bölümünde emekleri geçen, Çocuk Psikiyatrisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Aynur Akay'a, Uzm. Dr. Serkan Turan'a ve Psik. Ümit Şahin'e çalışmalarından ötürü teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak da canım eşim Özgür'e bu süreçte bana karşı anlayışlı olduğu ve her zaman motivasyon sağladığı için, anneme, babama, dostlarıma desteklerini benden eksik etmedikleri için ve biricik kedim Ruhi'ye bilgisayar başında bana eşlik ettiği için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

DİSTROFİNOPATİLİ AİLELERDE GENOTİP VE FENOTİP İLİŞKİSİNİN AYRINTILANDIRILMASI

Dr. Hande Özkalaycı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İZMİR

Duchenne musküler distrofi (DMD; OMIM#310200) ve Becker musküler distrofi (BMD; OMIM #300376) distrofin genindeki mutasyonların neden olduğu X'e bağımlı kalıtılan allelik kas hastalıklarıdır. Ayrıca DMD olgularının yaklaşık 1/3'ünde zihinsel yetersizlik olmakla beraber dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu (DEHB) gibi nörogelişimsel hastalıkların daha yüksek oranda görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur.

Bu çalışmada tarafımızca genetik tanı sağlanan distrofinopatili olguların genotipik özelliklerini ortaya koymayı, klinik bulgularıyla genotipik özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemeyi ve literatürdeki verilerle kendi verilerimizi karşılaştırmayı amaçladık.

2007 Ocak-2018 Temmuz arasında genetik tanısını sağladığımız tüm olgular çalışmaya dahil edilmiş olup, olgulara ait klinik ve genetik test verilerine Tıbbi Genetik Anabilim Dalı dosyalarına ek olarak Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'nın dosya ve medikal kayıt sistemini tarayarak ulaştık. Ayrıca takip olgularımızdan çalışmayı kabul eden 29 olgumuzun IQ değerleri ölçülüp, psikiyatrik değerlendirilmesi yapılmıştır.

Mutasyon tespit edilen 347 D/BMD olgusuna ait verileri paylaştık. Bir ya da daha fazla ekzon içeren 293 delesyon, 41 duplikasyon saptadık. Delesyon oranımızı %87,7, duplikasyon oranımızı ise %12,3 olarak bulduk. On üç olgumuzda 7'si novel, nokta mutasyonu tespit ettik. DMD olgularının %93,9'u (9/147) okuma çerçevesi kuramına uyarken, BMD olgularında bu oran %89,7 (70/78) olarak tespit edildi. Zihinsel yetersizlik ve DEHB oranını DMD grubunda sırasıyla %35 ve %26,3 olarak tespit ettik.

Bu çalışma Türkiye'de D/BMD olgularına ait Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyon (MLPA) yöntemi ile elde edilen genotip verilerinin incelendiği en büyük olgu gruplu çalışmadır. Genotip ve fenotip ilişkisini ortaya koyan çalışmalar hem klinik hem de temel bilimler için önemli veriler sunmaktadır. Bu anlamda çalışmamız distrofinopatilerin mekanizmalarına yönelik literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: DMD geni, Duchenne musküler distrofi, Becker musküler distrofi, MLPA, Türk populasyonu

SUMMARY

Elaboration of Genotype Phenotype Correlation in Families with Dystrophinopathy

Dr. Hande Özkalaycı

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Izmir

Duchenne muscular dystrophy (DMD; OMIM#310200) and Becker muscular dystrophy (BMD; OMIM #300376) are X linked allelic muscle diseases caused by the mutations in dystrophin gene. Additionally, intellectual disability is seen approximately in one third of DMD patients. Also there are some researches revealing some neurodevelopmental disorders like attention deficiency and hyperactivity disorder (ADHD) are more common in these patients compared to the population.

We aim to exhibit genotypic features of the patients with dystrophinopathy with genetic diagnose performed in our laboratory; examine the correlation between their genotypes and phenotypes and compare our findings with literature.

All cases in which genetic diagnosis were performed between January 2007 and July 2018 were included in the study, and the clinical and genetic test data of the cases were obtained by scanning the file and medical record system of the Department of Pediatric Neurology in addition to the Department of Medical Genetics. Besides, IQ values of the 29 patients from our follow-up cases volunteer to join in our study were measured and their psychiatric evaluation was made.

We shared the data of 347 patients with D/BMD. We detected 293 deletions, 41 duplications including one or more exons. Our deletion rate was 87.7% and duplication rate was consistent with 12.3%. We found point mutations in 13 cases and 6 of them were novel mutations. The 93.9% (138/147) of DMD patients were consistent with the reading frame rule, whereas this rate was 89.7% for BMD patients.

Intellectual disability and ADHD were determined to accompany to DMD patients in 24.1% and 26.3%, respectively.

This is the largest study examining the MLPA based genotype data in Turkish D/BMD patients. Studies showing the relationship between genotype and phenotype provide precious data for both clinical and basic sciences. In this sense, our study will contribute to the literature on the mechanisms of dystrophinopathies.

Key Words: *DMD* gene, Duchenne muscular dystrophy, MLPA, Turkish population

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Musküler distrofiler progresif kas güçsüzlüğü ile giden, klinik olarak heterojen bir grup kas hastalığıdır. Hastalıkların isimlendirmesinde kas patolojisinde gözlenen kronik ve ciddi myopatik değişimlere itafen “distrofi” kelimesi kullanılmıştır (1). Bu grubun bir üyesi olan distrofinopatiler, distrofin proteinini kodlayan, X kromozomunda yer alan *DMD* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Klinik spektrumun bir ucunda semptomsuz kreatin kinaz (CK) enzim yüksekliği ve kas kramplarıyla beraber olan myoglobini yer alırken diğer ucunda Duchenne/Becker musküler distrofi (D/BMD) ve *DMD* ilişkili dilate kardiyomyopati (DKMP) karşımıza çıkmaktadır (2).

Duchenne musküler distrofide olguların motor gelişim basamaklarında ılımlı gecikme olabilir ve çoğunda proksimal kas güçsüzlüğüne bağlı olarak koşamama, zıplayamama görülmektedir. Aynı zamanda bu proksimal güçsüzlüğe bağlı olarak olgular yerden kalkarken klasik “Gowers manevrasını” kullanırlar (3). On üç yaşına kadar ambulasyonlarını kaybederler. Nöromusküler skolyoz ve eklem kontraktürleri kas güçsüzlüğü ilerledikçe ortaya çıkar (4).

Farklı distrofin izoformları santral sinir sisteminin farklı bölgelerinde yerleşmektedir. Distrofinin bu hücrelerdeki yokluğu nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilidir (5). Duchenne musküler distrofide olguların bir kısmında zihinsel yetersizlik olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda %23’ten %36.2’ye kadar değişen mental retardasyon sıklığı tespit edilmiştir (6-9). Ek olarak dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (9, 10) ve otizm spektrum bozukluğu (7, 8, 10, 11) için artmış sıklıklar bildirilmiştir.

Becker musküler distrofide kas güçsüzlüğünün dağılımı *DMD* ile benzer olsa da, hastalığın seyri çok daha benin olup, bulgular genelde 12 yaş civarında başlar. Hatta bazı olguların yaşamın ileri dönemlerine kadar bulguları yoktur (12). On altı yaşından sonra tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelirler (3). İskelet bulguları daha hafif olmakla beraber DKMP’ye bağlı kırklı yaşlarda ölüm sık görülmektedir (2).

Monaco ve ark., okuma çerçevesini bozan mutasyonların erken dur kodon oluşumuyla güdük ve nonfonksiyonel proteine neden olarak *DMD* ile sonuçlandığını, çerçeve okumasını bozmayan mutasyonların ise daha kısa ama fonksiyonel protein oluşumu ile BMD’ye neden olduğunu önermişlerdir (13). Bu kural olguların %92’sinde geçerlidir (14).

Distrofin geninde en sık karşılaşılan mutasyonlar bir veya daha fazla ekzonu içeren delesyonlardır. Mutasyonların yaklaşık %60-70’ini oluşturmaktadır. Duplikasyonlar ise %10-15’inden sorumlu tutulmaktadır. Küçük mutasyonlar (dur kodonu, yanlış anlamlı, kesim bölgesi mutasyonları, küçük in/del mutasyonlar) ise geri kalan %17-25’lik kısımda etkilidir (15-18).

Moleküler tanıda en sık görülen mutasyonlara yönelik uygulanan kantitatif analizler ve takiben kalitatif yaklaşım olan tüm gen sekansı, olguların büyük çoğunluğuna tanı koyabilmektedir. Çoklu ligasyon-bağımlı prob amplifikasyon (MLPA) yöntemi ile *DMD* genine ait 79 ekzon incelenip, kopya sayısı değişiklikleri saptanabilmektedir (19).

Bu hastaların moleküler karakterizasyonları, farklı bir tanı oluşturma, uygun klinik izlem sağlama, hasta yönetimi, yeni tedavilere ışık tutması ve genetik danışmanlık açısından oldukça önem taşımaktadır (15). Biz de bu çalışmada tarafımızca genetik tanı sağlanan distrofinopatili olguların genotipik özelliklerini ortaya koymayı, klinik bulgularıyla genotipik özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemeyi ve literatürdeki verilerle kendi verilerimizi karşılaştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Distrofinopati Tanım ve Kısa Tarihçe

Musküler distrofiler ilerleyici kas güçsüzlüğü ile giden bir grup heterojen hastalıktır (20). Kas güçsüzlüğünün klinik dağılımına göre 6 major gruba ayrılabilirler. Bu grupta yer alan hastalıklar konjenital musküler distrofi, Duchenne ve Becker musküler distrofi, Emery-Dreifuss musküler distrofi, fasyoskapulahumeral musküler distrofi, okulofaringeal musküler distrofi, limb-girdle musküler distrofidir (12). Klinik olarak Distrofi kelimesi Yunanca *dys*—yanlış, zor ve *trophè*—beslenme kelimelerinden köken almaktadır (21). Bu hastalık grubu arasında en yaygın görülen Duchenne musküler distrofi aslında 1851 yılında bir İngiliz doktor olan Edward Meryon tarafından Royal Medical and Chirurgical Society'nin toplantısında tanımlanmış (22) ve sonrasında da yayınlanmıştır (23).

Meryon hastalığın erken çocukluk dönemde progresif kas güçsüzlüğü ile başlayıp geç adolesan dönemde ölümle sonuçlandığını anlatmıştır. Hastalığın ailesel geçiş gösterip sadece erkekleri etkilediğini ve spinal kordun nekroskopide etkilenmediğini kanıtlamıştır. Böylece hastalığın ön boynuz hücre dejenerasyonundan değil kastaki hasardan dolayı ortaya çıktığını bildirmiştir. Ayrıca, yaptığı histolojik çalışmalarla kas membranının yani sarkolemanın hasarlandığı sonucuna ulaşmıştır. Ancak Meryon'un gözlemleri çeşitli sebeplerle yıllarca görmezden gelinmiş ve hastalık klinik ve kas histolojisini yıllar sonra detaylandıran ve hastalığa da adını veren Duchenne ile ilişkilendirilmiştir (24).

2.2. Klinik Tipler

2.2.1. Duchenne Musküler Distrofi

Distrofinopatiler bir hastalıklar spektrumudur. Kliniğin hafif kısmında semptomsuz CK enzim yüksekliği ve kas kramplarıyla beraber olan myoglobini yer alırken daha ağır formunda Duchenne/Becker musküler distrofi (D/BMD) ve DMD ilişkili DKMP karşımıza çıkmaktadır (2).

Duchenne musküler distrofinin insidansı 1/3802 ve 1/6291 arasında değişmektedir (25). Genellikle erken çocukluk döneminde oturmada ve bağımsız ayağa kalkmada gecikme gibi motor gelişim basamaklarında aksaklık ile kendini gösterir. Ortalama yürüme yaşı 18 aydır. Duchenne musküler distrofide ailelerin fark edebildiği ilk bulgular genel motor becerilerdeki gecikmeler olup (%42), ısrarcı parmak ucu yürümleri ve düz tabanlık gibi yürüyüş problemleri (%30), yürümede gecikme (%20), öğrenme güçlükleri (%5) ve konuşma problemleri (%3) gözükmektedir (26).

Aile öyküsünün olmadığı erkek DMD olgularında ortalama tanı yaşı 4 yaş 10 aydır ve bu aralık 16 ay ile 8 yaş arasını kapsamaktadır (27). Proksimal kas

güçsüzlüğünün erken bulguları badi yürüyüşü, yerden kalkmada, merdiven çıkmada, koşmada, zıplamada ve çömelir pozisyondan ayağa kalkmada zorlanma şeklindedir. Olgular supin pozisyondan ayağa kalkarken, pelvik kuşak kas güçsüzlüğünü kompanze etmek için kollarını kullanır. Yapılan bu manevraya “Gowers manevrası” adı verilmektedir. Baldır kasları hipertroftiktir ve muayenede serttir. Sıklıkla baldırda ağrı mevcuttur. Boyun fleksörleri hastalığın tüm evrelerinde zayıftır. Sırt üstü pozisyonda DMD’li bir çocuk yerçekimine karşı boynunu kaldıramaz. Duchenne musküler distrofide kas gücü kaybı sürekli devam eder. Üç ve 6 yaş arasında normal gelişimin kas gücü zayıflamasının önüne geçmesi sonrası “balayı dönemi” denilen geçici bir iyileşme süreci görülebilir. Altı ve 11 yaşları arasında kas gücü neredeyse lineer olarak azalır. Fonksiyon kayıpları sırayla ortaya çıkar. Öncelikle merdiven çıkmada sorunlar başlar, daha sonra supin pozisyondan kalkmada güçlük, merdiven tırabzanlarına tutunurken zorlanma, supin pozisyondan emekler pozisyona geçmede güçlük ve sonunda da kısa mesafe yürümede güçlük kendini gösterir. İlerleme hızı hastalar arasında farklılık gösterir. Çoğu hastada 10 yaşında eklem stabilize edici ortez kullanımı gerekirken 11 ile 13 yaş arasında olgular tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyarlar. Çoğu DMD hastası (%70) 6 ile 10 yaş arasında aşil tendonu, iliotibial band ve kalça eklemi kontraktürlerine bağlı olarak parmak ucunda yürüme ve kalça fleksiyon kusuru ile karşılaşır. Sekiz yaşına kadar ise diz, dirsek ve bilek ekstensörlerinde kontraktürler meydana gelir ve bu bulgular ambulasyon kaybı ile korelasyon gösterir (2). Steroid tedavisi öncesindeki geçmiş çalışmalarda ambulasyon kaybının 12 yaşından önce gerçekleştiği bildirilmiştir.

Tekerlekli sandalyeye bağımlı olduğunda ise olgularda zorlu vital kapasitede düşme başlamakta ve özellikle geceleri olan solunum yetmezliği baş göstermektedir. Skolyoz da sık gözlenmekte ve cerrahi düzeltme gerekebilmektedir. Kardiyomiyopatinin insidansı yaşla birlikte artar ve tartışmasız bir şekilde daha fazla klinik etkiye sahiptir, çünkü noninvaziv ventilatör bakımındaki gelişmeler yaşam beklentisini arttırmaktadır. Ventilatör uygulaması olmadığında ölüm tipik olarak yirmili yaşların sonlarında ya da otuzların başlarında görülür (28). Kardiyak etkilenmeye eşlik eden pnömoni, ölümün en sık nedenidir (12).

2.2.1.1. Duchenne Musküler Distrofi’de Kognitif Fonksiyonlar ve Nörogelişimsel Hastalıklar

Farklı distrofin izoformları santral sinir sisteminin farklı bölgelerinde yerleşmektedir. Distrofinin bu hücrelerdeki yokluğu nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilidir (5). Duchenne musküler distrofide olguların bir kısmında zihinsel yetersizlik olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda %23’ten %36.2’ye kadar değişen mental retardasyon sıklığı tespit edilmiştir (6-9). Yedi yüz yirmi bir DMD olgunun değerlendirildiği bir metaanalizde, ortalama IQ değeri 82 olarak bulunmuş olup, %20’sinin skoru 70’in altında, %3’ünün ise 50’nin

altında saptanmıştır. Bu olgularda ortalama zeka normalin 1 SD altı olarak bulunmuştur (6). Bu metaanalizde performans IQ'ya nazaran verbal IQ'nun daha belirgin etkilendiğinin altı çizilmiştir. Ayrıca zihinsel yetersizliğe ek olarak DMD olgularında dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), otizm spektrum bozukluğu (OSB), obsesif kompulsif bozukluk (OKB) sıklığı da topluma göre artmış olarak bulunmuştur. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu için %11.7'den %32'ye kadar değişen sıklıklar bulunmuştur (9, 10). Otizm spektrum bozukluğu için sıklıklar ise %3.1'den %21'e kadar değişmektedir (7, 8, 10, 11). Obsesif kompulsif bozukluk sıklığı ise bir çalışmada %4.8 olarak saptanmıştır (10).

2.2.2. Becker Musküler Distrofi

İlk kez 1955 yılında Becker ve Kiener tarafından DMD'ye benzer şekilde kas etkilenmesi gösteren "X kromozomu ile ilişkili yeni bir musküler distrofi" olarak tanımlanmıştır (29). Ancak bu hastalığın çok daha yavaş progresyon gösterdiği gözlenmişti. Becker bu iki hastalığın aynı gendeki problemten kaynaklanabileceğini öne sürmüştü. Daha sonra Xp21'deki genin keşfi ile bu iki hastalığın aynı gendeki problemten kaynaklandığı anlaşıldı (30, 31). Becker musküler distrofinin insidansı DMD'nin üçte biridir (32). Hastalık DMD'ye göre daha benin seyretmektedir. Bulguların başlangıç yaşı ortalama 12 olmakla beraber bazı olgularda hayatın ileri dönemlerinde de kendini gösterebilmektedir (12). On altı yaşından sonra tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelirler (3). İskelet bulguları daha hafif olmakla beraber DKMP'ye bağlı kırıklı yaşlarda ölüm sık görülmektedir (2).

Bu olgular çocukluk döneminde DMD'ye benzer şekilde limb girdle zayıflığı ve baldır hipertrofisi ile başvurabilir. Olguların yarısında tipik olarak 10 yaşına kadar kas güçsüzlüğü gözlenirken pek çoğunda ise güçsüzlük olmadan eforla ortaya çıkan myalji ve baldır hipertrofisi gözlenir. BMD ambulasyon kaybının 15 yaşından sonra gerçekleşmesiyle tanımlanırken, çoğu çocukluk çağı başlangıçlı hasta tipik olarak üç ve dördüncü dekada ambulasyon kaybı yaşar. Bazılarında ise çok daha hafif semptomlar vardır. Yetişkinlik döneminin başında ya da ortalarında semptomlar başlayabilir (33, 34); izole quadriceps güçsüzlüğü (35); yetişkin ya da çocukluk kramp-myalji sendromları ya da egzersizle indüklenen myoglobüniüri (36); ya da (çok nadiren) asemptomatik hiperkreatininkinazemi (37) gözlenebilir.

2.2.3. Semptomatik Kadın Taşıyıcılar

Duchenne/Becker musküler distrofide taşıyıcılar çoğunlukla bulgu vermese de belirti veren "manifest" kadınlar mevcuttur. Bulgu veren taşıyıcıların oranı %5-19 oran aralığında değişmektedir (38-40). Taşıyıcılarda yapılan bir çalışmada sol ventrikül dilatasyon oranı %18 olarak saptanmıştır. Genetik danışmanlıkta kadın

olgulara bu açıdan takip önerilmelidir (41). Asemptomatik taşıyıcı kadınlarda kas distrofininin mozaik ekspresyonu nadir görülen bir durumken, belirti veren taşıyıcı kadınlarda bu durum belirgindir. Bu olgularda kas krampları erken bulgu olabilir. Güçsüzlük çocukluk döneminde ortaya çıkabildiği gibi erişkin döneme kadar görülmeyebilir ve ilerleyici ya da durağan olabilir. Psödohipertrofi genelde mevcuttur. Güçsüzlük sıklıkla asimetriktir; etkilenmiş erkeklere benzer şekilde elektrokardiyografik anormallikler görülür ve CK enzim düzeyleri daima yüksektir ve nadiren etkilenmiş erkeklerin düzeyine kadar çıkabilir. Ancak bazı kadın taşıyıcılarda yüksek CK enzim düzeyleri görülse de herhangi bir kas güçsüzlüğü yoktur (42). Becker ve Duchenne musküler distrofi taşıyıcılarında klinik bulguların ortaya çıkmasıyla ilgili bazı mekanizmalar önerilmiştir. Bunlar: her iki allelede *DMD* gen mutasyonu varlığı (1), bir X kromozomunun kaybolması (Turner Sendromu) (2), *DMD* dışı genlerde (osteopontin gibi) saptanan polimorfizmler (3), çarpık X kromozom inaktivasyonu nedeniyle normal distrofin allelinin baskın inaktivasyonu (4), *DMD* genini içeren X;otozom translokasyonu olan kadınlar (5), uniparental dizomi (6). Tüm bu mekanizmalar iskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonunda azalmayla sonuçlanmaktadır (43).

2.3. Tanı

2.3.1. Serum Biyokimyası

Becker musküler distrofi ya da *DMD* şüphesi olduğunda neredeyse daima ilk yapılan tetkik serum CK enzim düzeyi ölçümüdür. Bu enzim doğumdan itibaren daima yüksektir. Yüksek olasılıkla enzim yüksekliğinin nedeni sarkolemma permabilitesindeki artıştır. Kreatin kinaz enziminin üç izoformu (MM,BB,MB) mevcut olup, *D/BMD* olgularında özellikle iskelet kası hasarında CK-MB anlamlı yüksekliği görülür. Duchenne musküler distrofi ve *BMD* hastalığında normalin 50-100 katı artış gösteren CK enzim düzeyleri görülebilmektedir (40). Duchenne musküler distrofide 2-5 yaş arası, *BMD*’de 10-15 yaş arasında enzim düzeylerinin pik yaptığı bulunmuştur (44). Daha ılımlı CK enzim düzey artışları (normalin on katı kadar) limb-girdle musküler distrofi, fasyoskapulohumeral ve konjenital musküler distrofide, ılımlı spinal musküler distrofide, metabolik miyopatiler ve inflamatuvar miyopatilerde görülebilmektedir (40). 1990 yılında Wales (UK) *DMD* için kan CK enzim düzeyi ile yenidoğan tarama programı başlatmış ve 2011 yılına kadar bunu sürdürmüştür. Olguların 145’inde bu enzim yüksek bulunmuş, yaklaşık 6 haftalık izlemde 79 olguda normal düzeye döndüğü, 66 olguda ise yüksekliğin sebat ettiği gözlenmiştir. Olguların 56’sına *DMD* tanısı, 5’ine *BMD* tanısı ve diğerlerine de diğer nadir kas hastalıkları tanısı konulmuştur. Daha sonra ise aileler için tanıyı önceden öğrenmenin katkısı için yeterli kanıt olmadığından program durdurulmuştur (45).

Serum transaminazları olan aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) artışları da *DMD* ve *BMD*’de görülmektedir (46). Bu

yükseklikler hastalığının erken döneminde hepatik kökenli olarak yorumlanıp olguların tanı alma yaşının ilerlemesine neden olabilmektedir. Olgulardaki durumu karaciğer hasarından ayırt etmede gama-glutamil transferaz enzim düzeyi kullanılmalıdır (47).

2.3.2. Moleküler Tanı

Distrofin geninde en sık karşılaşılan mutasyonlar bir veya daha fazla ekzonu içeren delesyonlardır. Mutasyonların yaklaşık %60-70'ini oluşturmaktadır. Duplikasyonlar ise %10-15'inden sorumlu tutulmaktadır. Küçük mutasyonlar (dur kodonu, yanlış anlamlı, kesim bölge mutasyonları, küçük in/del mutasyonlar) ise geri kalan %17-25'lik kısımda etkilidir (15-18). Olguların %2'sinden azında ise kompleks yeniden düzenlenmeler ve derin intronik mutasyonlar mevcuttur (48). Moleküler tanıda en sık görülen mutasyonlara yönelik uygulanan kantitatif analizler ve takiben kalitatif yaklaşım olan tüm gen sekansı, olguların büyük çoğunluğuna tanı koyabilmektedir.

Çoklu ligasyon-bağımlı prob amplifikasyon yöntemi ile *DMD* genine ait 79 ekzon incelenip, kopya sayısı değişiklikleri saptanabilmektedir (19). Bu teknik her bir *DMD* ekzonuna hibridize olabilen problemler içerir. Her bir prob seti belirli bir ekzonda birbirine bitişik olarak hibridize olan iki oligonükleotit ihtiva eder. Problemler polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) izin verecek şekilde kuyruklara sahiptir. Ayrıca problemlerden biri "stuffer (dolgu)" sekans denilen her bir probda farklı uzunlukta olan dizilere sahiptir. Hibridizasyon boyunca, ligasyon basamağı ile problemler birbirine bağlanır ve yalnızca hibridize olan problemlerin çoğalabildiği PZR reaksiyonu gerçekleşir. Elde edilen PZR ürünleri fragman analizi ile yürütülür ve böylece farklı fragman uzunlukları tarafından prezente edilen ekzonlar analiz edilir. Bu yöntem bize herhangi bir ekzonun olup olmadığı hususunda ve ilgili pik oranlarını karşılaştırarak kopya sayısı hakkında bilgi sağlar. Bu analiz hem hasta hem de taşıyıcılardaki delesyon ve duplikasyonları gösterebilmektedir (49). Bu analizde dikkat edilmesi gereken bir husus vardır. Bir ekzondaki küçük mutasyonlar probun bağlanmasını engelleyip tek ekzon delesyonu olarak MLPA'da karşımıza çıkabilir. Bu yüzden genelde intronik primerler aracılığıyla yapılan PZR ekzonik delesyonla küçük mutasyonu ayırt etmede kullanılır (50).

Ayrıca MLPA tekniği intronik kırık noktalarının lokasyonu hakkında bilgi verici değildir. Alternatif olarak, dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) yöntemi de kopya sayısı değişikliklerini saptamada kullanılmaktadır. Distrofin ekzonlarını ve intronlarını kapsayan, cam bir preparat üzerine konjuge edilmiş problemler kullanılır. Kontrol ve hasta DNA'ları önce parçalanır, daha sonra ayrı floroforlarla etiketlenir ve problemlere hibridize edilir (51).

Delesyonlar ve daha nadiren duplikasyonlar için distrofin geninde iki sıcak nokta mevcuttur. Delesyon küme bölgesi I ekzon 45-53'ü kapsar ve rod domainin bir parçasını yok eder, bölge II ise ekzon 2-20'de yer almakta olup, aktin bağlayıcı

bölgenin bir kısmını ya da tamamıyla rod domaininin bir kısmını ortadan kaldırır (52). Kırık noktaları sıklıkla intron 44, intron 2 ve 7 şeklindedir (53). Bu sıcak noktalardan yola çıkılarak düzenlenmiş multipleks PZR metoduyla bakılan on sekiz ekzon D/BMD olgularında delesyonların %98'ini saptayabilmektedir (54). Bu yöntemin birkaç dezavantajı vardır. Kırık noktaları tam olarak bilinmemekte, fenotip-genotip korelasyonu ve ekzon spesifik tedaviler açısından uygunluğu değerlendirmek zorlaşmaktadır. Ayrıca duplikasyonlar ve taşıyıcılığı araştırmak mümkün olmamaktadır. Bu sebeplerden ötürü MLPA ve aCGH yöntemlerinin ilk basamak olarak tercih edilmesi önerilmektedir (3).

Büyük delesyon/duplikasyon saptanamayan olgularda Sanger sekanslama yöntemi ya da yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi ile küçük mutasyonlar araştırılmaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojisi ile hem büyük delesyon/duplikasyonlar hem de küçük mutasyonları saptamak mümkün hale gelmiştir. Bununla beraber ileri optimizasyon ve validasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır (55). Büyük delesyon/duplikasyon ve küçük mutasyon taramalarına rağmen genetik tanı koyulamayan çok az hasta grubu mevcuttur. Bu grupta kas biyopsisinden mRNA analizi yapılarak olası patojenik derin intronik mutasyonlar saptanabilmektedir. Artık invaziv bir işlem olan kas biyopsisi tanıda ilk basamak değildir. Genetik testler yapılmalı, genetik tanısı aydınlatılamayan olgularda uygulanmalıdır. Genetik test sonucu ile fenotipi arasında uyumsuzluk olan olgularda opsiyonel olarak uygulanabilir (56).

Hastada mutasyon bulunduğunda anneye taşıyıcılık açısından genetik test yapılmalıdır. Yine de annede taşıyıcılık saptanamayabilir. Çünkü *DMD* gen mutasyonlarının üçte biri yeni mutasyon olarak karşımıza çıkmaktadır (57). Ancak taşıyıcılık saptanamayan annelerin bir sonraki gebeliklerinde riskin sıfır olmadığı görülmüştür. Bu noktada "gonadal mosaisizm" adı verilen fenomen akılda tutulmalıdır. Genetik danışmanlıkta annenin mutasyon taşımadığı olgularda hastalığın tekrar riski %4,3 olarak verilebilir (58). Passos ve ark. yaptıkları çalışmada tekrar riskinin delesyonun lokasyonuna göre değiştiğini vurgulamışlardır. Familial delesyonların daha çok proksimal, sporadik mutasyonların ise distal olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu duruma neden olarak da proksimal delesyonların embryonik gelişimin erken döneminde, distal delesyonların ise geç döneminde oluşma eğiliminde olabileceği fikrini öne atmışlardır (59).

2.3.3. Kas Biyopsisi

Distrofinopatinin erken ya da orta evrelerinde kas histolojisinde lif boyutlarında değişiklikler, nekroz ve rejenerasyon odakları, hipertrofik lifler, santral yerleşimli nükleuslar, lif yarıklanması ve artmış bağ dokusu, yuvarlaklaşmış, opak lifler dikkati çeker. Hastalığın daha ileri aşamalarında ise kas lifinde belirgin kayıp mevcuttur ve yağ ve bağ dokusu birikimi dikkat çekicidir (2). Distrofin proteinini

ekspresyonu kas kesitlerinin immunofloresans (IF) ya da immunohistokimyasal (IHK) boyaması ile ya da homojenize dokunun immunoblot (Western blot) analizi ile değerlendirilebilir. Distrofin boyamasında proteinin amio-terminalini, çubuk benzeri domainini ve karboksi terminalini hedef olan üç çeşit antikor kullanılmaktadır. Immunofloresans ya da IHK boyama distrofinin lokalizasyonu gösterir ve miktarı hakkında semikantitatif bilgi verir (örn; “boyanma yok,” “azalmış,” “eser miktarda”). Duchenne musküler distrofide distrofin proteini bulunmazken, BMD’de yamalı paternde azalmış distrofin proteini mevcuttur. Ancak DMD’li olgularda distrofin eksprese eden az sayıda kas lif grupları hastaların %50’sinde göze çarpmaktadır (28). Bunlar “ters mutasyon gösteren lif” olarak adlandırılmakta ve kas prekürsör hücrelerindeki spontan ekzon atlama (alternatif kesim) ile ortaya çıkıp, yaşla beraber klonal ekspansiyona uğramaktadırlar (60). Distrofin kantitasyonu ve boyutunun (moleküler ağırlık) analizi için western blot kullanılabilir. Duchenne musküler distrofide distrofin miktarı %3’ün altındayken, %20’den fazla değerler BMD ile ilişkilendirilmiştir (61).

2.4. Distrofin Geni

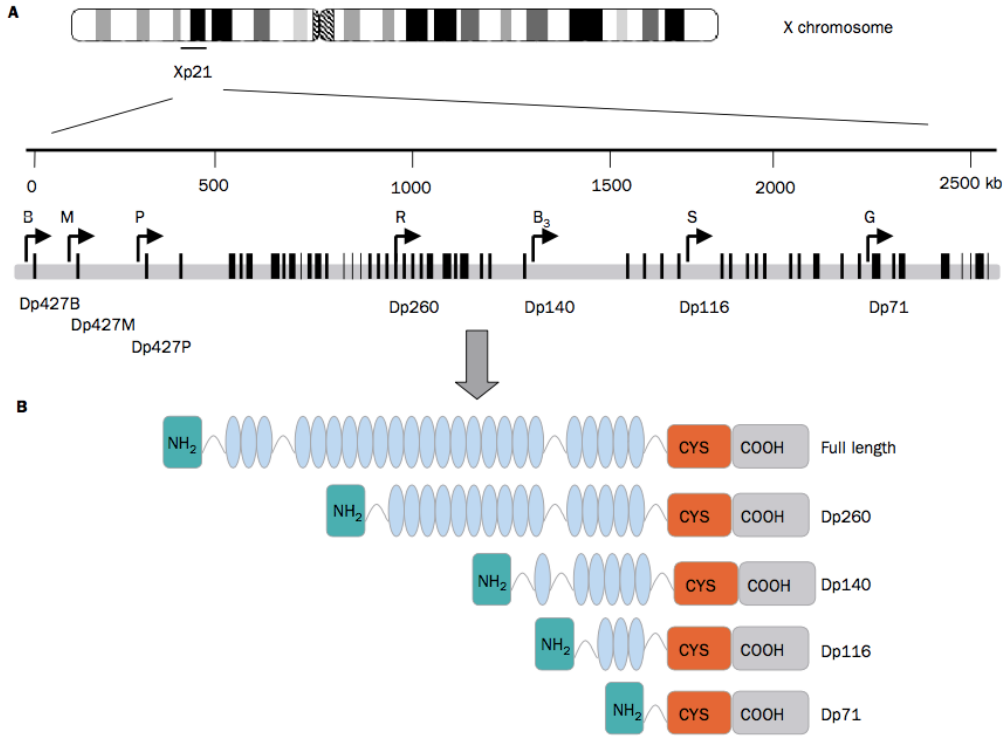
2.4.1. Genin Keşfi

Duchenne musküler distrofi hastalığının geninin lokalizasyonunun Xp21olabileceği, ilk defa DMD hastalığı olan bir kız olguda kırık noktası Xp21’de olan X;1 translokasyonun saptanması üzerine ifade edilmiştir (62). Bununla beraber daha pek çok X kromozomu otozom translokasyonu olan kız DMD hastası bildirilmiş (63) ve yapılan linkaj analizleri de bu lokasyonu desteklemiştir (64-66). Ayrıca BMD ve DMD’nin allelik hastalıklar olduğu anlaşılmıştır (67, 68). İskelet kasındaki tam transkripti temsil eden *DMD* komplementer deoksiriboz nükleik asiti (cDNA)14 kb olarak klonlanmış (31) ve kapladığı alanın 2.5 megabazın üzerinde olduğu bildirilen gen, o zamana kadar tespit edilen en büyük gen ünvanını almış ve en az 79 ekzon içerdiği belirtilmiştir (69-71).

2.4.2. Doku Spesifik Promotörleri

Distrofin geninde tam boy distrofin molekülünün ekspresyonunu sağlayan üç promotör bölge ve daha kısa distrofin izoformlarıyla ilişkili dört internal promotör bölge yer almaktadır (Şekil 1). Tam boy distrofin ürünlerini eksprese eden promotörler doku spesifik ekspresyonu yansıtacak şekilde Dp427 (B), Dp427 (M), Dp427 (P) olarak gösterilebilmektedir. Bunlar sırasıyla beyin, kas ve purkinje hücrelerini ifade eder. Her bir internal promotör ise retinal (R), beyin-3 (B3), schwann hücresi (S) ve genel (G) olarak ifade edilip kendine özgü bir ilk ekzon kullanarak ürün oluştururlar. Bu ekzonlar 30, 45, 56 ve 63’tür. Sırasıyla 260 kDa (kilodalton) (Dp260), 140 kDa (Dp140), 116 kDa (Dp116) ve 71 kDa (Dp71) ağırlığında ürün oluştururlar. Dp427 (B) kortikal nöronlar, iskelet ve kalp kasında,

Dp427 (M) iskelet ve kalp kasında ve ayrıca glial hücrelerde, Dp427 (P) ise purkinje hücreleri ve az oranda iskelet kasında yer alır. Daha küçük izoformlara bakacak olursak: Dp260 retina ve az miktarda beyin ve kalpte, Dp140 beyin, retina ve böbrekte, Dp116 periferik sinir hücrelerinde, Dp71 ise iskelet kası dışında pek çok hücrede yaygın ekspresyona sahiptir (53).



Şekil 1. A: Distrofin geninin genomik organizasyonu. Siyah dikey çizgiler 79 ekzonu, oklar ise farklı promotör bölgeleri: beyin (B), Kas (M), Purkinje hücreleri (P); R, B₃, S ve G Dp260 (retinal), Dp140 (beyin-3), Dp116 (Schwann hücreleri), ve Dp71 (genel) promotörleri göstermektedir. B: Farklı distrofin proteinlerinin domain kompozisyonları gösterilmiştir. Sırasıyla amino terminal domain, spektrin benzeri domain, sistein zengin domain, karboksi terminal domain (53).

2.5. Distrofin Proteini

Distrofin 427 kDa ağırlığında (72) primer olarak kas hücrelerinin kostamer bölgelerinde lokalize büyük bir proteindir (73). Kostamerler, çizgili kas hücrelerinde sarkolemmanın altına yerleşmiş olan ve yakınlarındaki hücrel miyofibrillerin periferik tabakasının Z-çizgileri ile hizalanan çok proteinli düzeneklerdir (74, 75). Kasılma miyofibrillerin bir kas hücresi içinde oluşturduğu kuvvetlerin, Z hatları üzerinden sarkolemdeki kostamerlere ve nihayetinde hücre dışı matrikse lateral olarak iletildiğine inanılmaktadır (74).

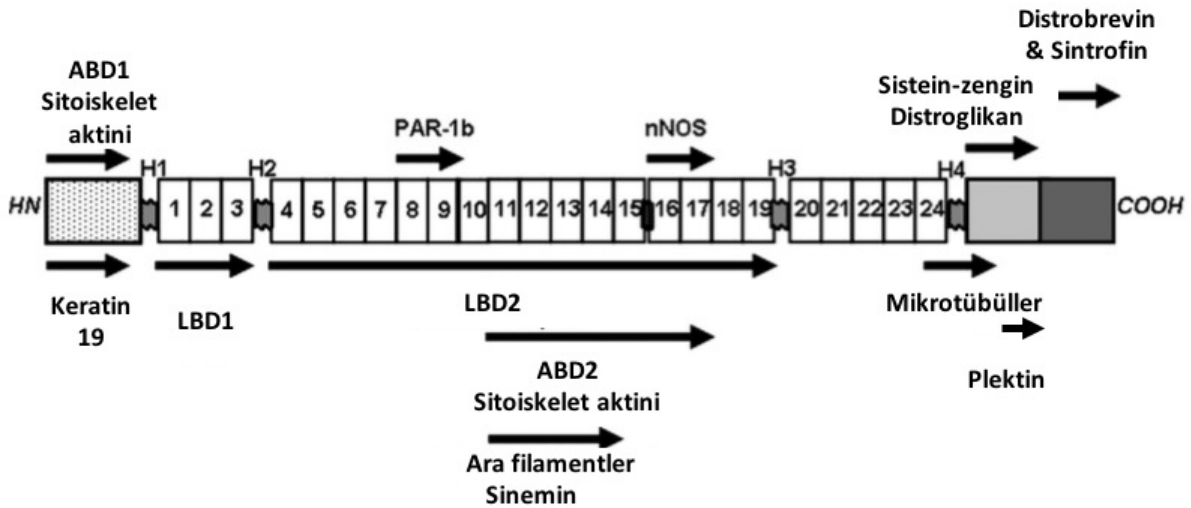
Distrofin büyük çubuk şeklinde bir proteindir. Dört adet fonksiyonel domaine sahiptir. Bunlar sırasıyla aktin bağlayan N-terminal domain (ABD1), orta-rod domain, sistein-zengin (CR) domain ve C terminal (CT) domainidir. Orta rod domain 24 spektrin benzeri tekrar (R) içermektedir. Bu tekrarlar α -heliks yapısında 5 nm boyutunda çubuklara katlanan 109 aminoasid içeren yapılardır (72, 76). Bu tekrarlar boyunca dört adet, kısa, prolinden zengin, proteine esneklik sağlayan ve bu yüzden “menteşe” (H) adı verilen ara yapılar yer almaktadır (77). Distrofin molekülünde N-terminal (NT) domainine ek, rod domaininde yer alan ikinci bir aktin bağlayıcı domain (ABD2) mevcuttur. Spektrin benzeri tekrarlardan R11-17’nin oluşturduğu bu birim bazik amino asitlerden zengin olup, asidik aktin filamentleriyle elektrostatik etkileşime girdiği düşünülmektedir. Ayrıca ABD1 ile iş birliği içerisinde aktin molekülü üzerinde güçlü lateral etkiye sahiptir (78, 79). 8R ve 9R bölgelerinin Par-1b kinaz ile ilişkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu tekrarları fosforilleyen yapının önemi tam anlaşılamamıştır (80). Rod domain R16-17’nin de nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) proteinin sarkolemmaya tutunmasında etkili olduğu anlaşılmıştır (81). Ancak bu etkileşimin, direk bir bağlanmadan ziyade R17’ye bağlanan α -sintrofin aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (82).

Distrofin ve distrofin kompleksi ayrıca kas membran stabilitesini sağlamada önemli olan sitoskeleti bir arada tutma görevi de görür. Örneğin, ABD1 aktine ek olarak bir ara filaman olan sitokeratin 19 proteinine tutunur ve distrofini iskelet kasındaki kontraktıl aparata bağlar (83). Rod domainin R20-23 bölgeleri mikrotübüllerle etkileşerek iskelet kasında mikrotübül ağının organizasyonunda rol oynamaktadır (84). Rod domainin aynı zamanda membran fosfolipidlerine triptofan rezidüleri aracılığıyla bağlandığı in vitro olarak gösterilmiştir (85). Bu bağlanmada R1-19’un etkili olduğu saptanmış olup, distrofinin kas hücrelerinde, membranın çift katmanlı lipid tabakasına solid destek sağlayan proteinlerden biri olabileceği öne sürülmüştür (86).

Sistein-zengin domain distrofini kas membranına β -dystroglikan etkileşimi ile tutturur (87, 88). Menteşe 4 yapısı rod domainin sonunda yer almakta ve protein-protein etkileşiminde görev alan bir WW domain içermektedir (89). Bu domain iki komşu EF-el motifi ile β -dystroglikanın karboksi-terminaline bağlanarak distrofini sarkolemmaya tutturur (90). Son dönemde bu bölgeler dışında R1-3, R10-12 ve CT domainlerinin de bağlanmada etkisinin olduğu fare ve köpek kasında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (91). EF-hand motifi iki α -heliks ve bunlar arasındaki bağlantıyı sağlayan ve kalsiyum bağlayan kısa bir ilmekten oluşur (72). Distrofin molekülünde iki EF-hand motifi CR domaininde yer alır. Bu domain ayrıca korunmuş sistein rezidülerine sahip olan ve Zn^{+2} gibi divalent metal katyonları varlığında katlanan bir çinko parmak (ZZ) yapısı içermektedir. WW domainine ve Zn^{+2} iyonu bağlamasına atıfta bulunularak adı bu şekilde konmuştur (92). Distrofinin ZZ domaini kalsiyum bağımlı olarak kalmoduline bağlanır (93). Sisteinden zengin domain ayrıca ankrin-B proteinine tutunur (94). Ankrin B distrofin, dinaktin-4 ve mikrotübüllere bağlanır ve bu proteinlerin ve dystroglikanın sarkolemmal

bağlantısında etkilidir. Distrofin, distroglikan ve mikrotübüllerin kostamerlerde lokalize olmasında Ankrin-B'nin $\beta 2$ spektrin ve dinaktin-4 ile etkileşimi gerekmektedir (95). Sistein zengin domain ve rod domainin R11-14 bölgeleri bir ara filaman olan sinemine bağlanmakta ve myofibrillerle kostamerik bölgeler arasındaki bağlantıyı daha da güçlendirmektedir (96). Aktin filamanlarını, ara filamanları ve mikrotübülleri bağlayan plektin molekülü de sistein zengin domainle etkileşime girmekte ve bir başka ara filaman olan desmin ile distrofinin indirekt bağlantısını sağlamaktadır (97).

Karboksi terminal domain temelde iki α -heliksten oluşur ve bu bölge çift sarmal yapısında olup prolin zengin bağlantı aracılığıyla ayrılır (98). Çift kıvrımlı yapı aynı zamanda sintrofin (99) ve distrobrevin için de bağlanma bölgesidir (100). Anlaşıldığı üzere distrofin pek çok molekülle etkileşim içerisinde. Bu etkileşimlerinin şematik gösterimi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Distrofin molekülü ve tanımlanan partnerleri. H1-4, menteşeler; ABD1 ve ABD2, aktin bağlayıcı domain 1 ve 2; LBD1 ve LBD2, lipid-bağlayıcı domain 1 ve 2 (86)

2.5.1. Distrofin Glikoprotein Kompleksi

Distrofin sarkolemmadan bir grup proteinle beraber ekstrakte edilmiştir. Bu yapıya distrofin-glikoprotein kompleksi (DGC) adı verilmiştir. Ardı sıra yapılan pek çok çalışmayla bu yapıdaki moleküller tanımlanmış ve hücresel lokalizasyonlarına göre üç gruba ayrılmışlardır. Ekstrasellüler bölgede α -distroglikan (α -DG), transmembran yerleşimli β -distroglikan (β -DG), sarkoglikanlar ve sarkospan (SSPN), sitoplazmik tarafta ise distrofin, distrobrevin ve sintrofin bu yapıyı meydana getirmektedir (Şekil 3) (101).

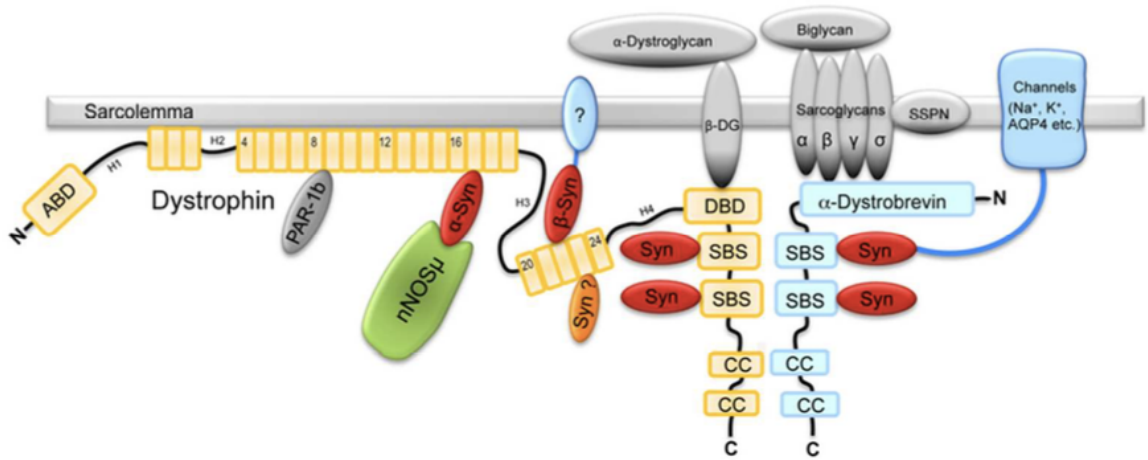
DAG1 geni tarafından kodlanan tek mRNA yapısından post-translasyonel modifikasyon yolu ile α -DG ve β -DG olarak iki farklı molekül yapısı oluşmaktadır. Glikolizasyona uğraması ve distrofin ile olan ilişkisinden dolayı bu ismi almışlardır. α -DG laminin (102), perlekan (103), agrin (104), slit (105) gibi ekstrasellüler proteinler için ligand görevi görmekte ve yüksek derece glikozillenmiş O-mannoz şeker grubu bu bağlanmada görev almaktadır. Ekstrasellüler proteinlerle etkileşimi dolayısıyla α -DG'nin sitoskelet proteinlerini ekstrasellüler matrikse bağladığı görüşüne varılmıştır (106). α -distroglikan nöronal proteinler olan nöreksin (107), pikaçurin (108) ve slit (105) ile de ilişkilidir. Ayrıca transmembran protein olan β -DG'nin ekstrasellüler N-terminali α -DG ile sıkı bir etkileşim içerisindedir (109). Proteinin sitoplazmik C-terminali ise distrofinle bağlıdır (87).

α -distroglikanın glikozillenmesinde görevli yolların etkilenmesi sonucu distroglikanopati olarak adlandırılan hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıklarda fenotip ağır konjenital musküler distrofiden daha ılımlı erişkin başlangıçlı limb girdle musküler distrofiye kadar değişmektedir. En ağır gidenlere örnek olarak Walker–Warburg sendromu (OMIM236670), kas-göz-beyin hastalığı (OMIM253280), Fukuyama tip konjenital musküler distrofi (OMIM253800) örnek olarak verilebilir. Bu ağır formlar sıklıkla beyin ve oküler anomalilerle ilişkilidir (110). İskelet kasında sarkoglikan komplekste α -sarkoglikan, β -sarkoglikan, γ -sarkoglikan ve δ -sarkoglikan yer almaktadır. Bu proteinleri kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlar LGMD2C-2F ile ilişkilidir. Bu kompleks subüniteleri birleşir ve kas hücresi içinde beraber transloke olur. Bundan dolayı bu kompleksteki herhangi bir sarkoglikandaki fonksiyon kaybettiren mutasyon, normal sarkoglikanların stabilitesini ve taşınması bozar (111).

Sarkospan sarkoglikanlarla ilişkili bir transmembran proteindir (112). Sarkolemmayı kateden multipl domaine sahip olmasından dolayı bu ismi almıştır (113). Sarkospan ekspresyon artışının *mdx* musküler distrofide utrofin glikoprotein kompleksinde artışa sebep olarak iyileşme yarattığı gösterilmiştir (114). Ayrıca defektli SSPN'ye sahip farede $\alpha 7$ integrin geninin silinmesi azalmış DGC ve ütrofin glikoprotein kompleks (UGC) ile sonuçlanmıştır. Bu durum SSPN ve $\alpha 7$ integrin etkileşiminin DGC ve UGC'nin sarkolemmal stabilitesinde önemini vurgulamaktadır (115). Sintrofinler distrofin ve distrofin ilişkili proteinler olan ütrofin ve distrobrevinle direk etkileşim yoluyla pek çok hücre komponentinin distrofin protein kompleksine bağlanmasında görev alan adaptör proteinlerdir (116). Sintrofinin distrofinin CT domainine ek olarak R17 ve R22'ye tutunduğu gösterilmiştir. α -sintrofin R17'ye tutunup nNOS distrofin etkileşimini sağlarken, β -sintrofin R22'ye bağlanmaktadır. Sintrofinin yalnızca R17'ye bağlanan bölgesi nNOS etkileşimde görevlidir (82). Distrobrevinler DGC yapısının sitoplazmik bir komponenti olup distrofinin CT domaini ile sekans homolojisi göstermektedir (117). İki farklı gen homolog proteinler olan α -distrobrevin ve β -distrobrevini kodlamaktadır. α -distrobrevin primer olarak kas dokusu ve beyinde eksprese olurken β -distrobrevin kas dışı

dokularda sentezlenir (110, 118). α -dystrobrevin 1, α -dystrobrevin 2 ve α -dystrobrevin 3 N-terminal bölge aracılığıyla sarkoglikan komplekse bağlanır (119). α -dystrobrevin 1 ve α -dystrobrevin 2 korunmuş çift kıvrım yapısıyla distrofine bağlanır. α -dystrobrevin 1 ve α -dystrobrevin 2'de bu çift kıvrım yapının yukarısında ise sintrofin bağlayıcı bölge yer almaktadır (120).

Distrofin yokluğunda, kas membranı hasara duyarlı hale gelir ve kas lifi bozulmaları meydana gelir. Bu durum kas dokusunun yerine yağ dokusunun geçmesi ve fibrozisle sonuçlanan dejenerasyon ve rejenerasyon sikluslarıyla sonuçlanır (20).



Şekil 3. Distrofin glikoprotein kompleksi (82)

2.6. Duchenne Musküler Distrofi Patofizyolojisi

1975 yılında Mokri ve Engel DMD kasının ultrayapısal özelliklerini incelemek amacıyla elektron mikroskobu kullanmışlardır. Lezyonlu bölgede plazma membranının hiç olmadığını ya da bozulduğunu, sitoplazmik anormalliklerin eşlik ettiğini bildirmişler ve bu plazma membran yapısının etkisiz bir bariyere neden olabileceğini düşünmüşlerdir. Daha sonra ise lezyonlarda sıklıkla peroksidaz içeren ekstrasellüler sıvı alımını görmüşler ve bu düşüncelerini doğrulamışlardır (121). İntrasellüler bir enzim olan kreatin kinazın hücre çıkışının artması, albümin, Procion orange (122) ve Evans mavisi gibi büyük proteinlerin non-nekrotik kas liflerinde hücre içine alınmasının gösterilmesi de membran hasarının bu makro moleküllerin geçişine izin verecek şekilde ciddi olduğunu göstermiş ve bu moleküllerin hasarlı kas incelemeleri için biyobelirteç olarak kullanılabilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır (123). Sarkolemmal hasarın düzeyinin kontraksiyonda kas mebranına uygulanan mekanik stresin boyutuyla doğrudan ilişkili olduğu ve distrofinin primer görevinin sarkolemmaya dayanıklılık sağlamak ve kas kontraksiyonları esnasında sarkolemmayı hasardan korumak olduğu

anlaşılmıştır (122).

Hiperkontrakte fiberler DMD hastalığının en erken morfolojik anomalisi olup kalıcı artmış intraselüler Ca (kalsiyum) ile ilişkilendirilmiştir (124). İskelet kasında eksitasyon-kontraksiyon-relaksasyon durumları sitozolik Ca düzeyi ile yakından ilişkilidir: yüksek Ca oranları kasılmayı tetiklerken, düşük Ca gevşemede kritiktir. Bundan dolayı hızlı bir Ca siklus mekanizması ve etkili bir depolama süreci kas liflerinde önemlidir (125). İskelet kasında intraselüler Ca artışının sebebi hala net değildir. Bazı yayınlarda artmış membran geçirgenliği suçlanırken (126), bazı çalışmalar ise artmış Ca sızıntı kanal aktivitesini ya da gerilimle aktive olan kanalları sorumlu tutmaktadır (127). Bu hücre içindeki artmış Ca, patolojik Ca duyarlı yolların aktivasyonuna neden olmaktadır. Kalpain proteazları aktive olur (128), kalmodulin (129), kalsinörin ve mitokondriyal geçiş porları (130) gibi kalsiyumla aktive olan sinyal yolları bozulur. Ayrıca artmış Ca, fosfolipaz A2 enzim aktivitesi ve mitokondri tarafından üretilen reaktif oksijen substrat (ROS) düzeyini artırma yoluyla membran hasarına katkı sağlamaktadır (131).

Reaktif oksijen substratları nükleer faktör-kappa (NF-kappa) yolak aktivasyonuna yol açmakta ve bu durum proinflamatuvar sitokinler olan interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) sentezinde artışa neden olmaktadır (132). Tümör nekroz faktör- α ayrıca ROS üretimine yol açtığı için bu durumun pozitif geri bildirimle etkisini artırması muhtemeldir (133). Tümör nekroz faktör- α antagonisti bir ilaçla *mdx* farelerde yapılan çalışmada, bu ilacın kas hücre nekrozunu ve kastaki inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (134). İnflamatuvar hücreler olan nötrofiller ve makrofajlar da ROS üretebilmektedirler. Nitrik oksit (NO) üretilen bu ROS'u temizleyebileceği düşünülmektedir (135). Distrofin defektli farede nNOS düzeyi azalmıştır. Bu durum azalmış NO seviyesine yol açmakta olup, ROS hasarının daha da artmasına sebep olmaktadır. Nitekim distrofin defektli farede NOS transgeni kullanılarak NO düzeyinde artış sağlandığında kas hasarında, infiltrat olan inflamatuvar hücre sayısında ve plazma CK düzeylerinde önemli düzeyde azalma saptanmıştır (136). Duchenne kas hastalığı olarak adlandırılan, dejeneratör kalp ve iskelet kasında bağ dokusu birikimi ortaya çıkar. Fibrozis en belirgin patolojik özelliklerden olup, hastalık progresyonunda önem arz etmektedir. Fibrozisin mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır. Adipozit ve fibroblastlara dönüşebilen mezenşimal progenitör hücrelerin, Platelet kökenli büyüme faktörü reseptör α (PDGFR α) pozitif hücreler olup, DMD iskelet kasının patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, mezenşimal progenitör hücrelerdeki PDGFR α aktivasyonunun aslında hasarlı kasta tamirde rol oynadığı ancak DMD'de ise bu yolağın kalıcı ve aşırı aktivasyonun doğrudan fibroze yol açtığı ve tamiri bozduğu saptanmıştır. Bu yolağının progresif DMD'de tedavi hedefi olabileceği düşünülmektedir (137). Nitrik oksit iskelet kasında vazomodülasyon, mitokondriyal biyogenez, glukoz alımı, oksidatif stres supresyonu, siklik GMP sentezi ve ryanodin reseptörlerinin nitrotilasyonu yoluyla eksitasyon-kontraksiyon eşlenmesi gibi pek çok görevde rol

oynamaktadır. Bu fonksiyonlarından ötürü NO üretim ve hücrel lokasyonunun bozulmasının musküler distrofi gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Sarkolemmal yerleşmesi için modifiye edilmiş nNOS_u kullanılarak mdx farelerde yapılan bir çalışmada NOS-M molekülünün zarar verici ekzantrik kontraksiyonlar ve tekrarlayıcı izometrik kasılmalarda güç kaybını azalttığı ve yorgunluk sonrası iyileşmeyi arttırdığı saptanmıştır. Aynı çalışmada sarkolemmal yerleşimi hedeflenmemiş nNOS kullanıldığında herhangi bir iyileştirici etki saptanmamıştır. Bu çalışma sarkolemmal yerleşimli nNOS proteininin önemini vurgulamaktadır (138).

Duchenne musküler distrofide kas fibrillerinin dejenerasyonu makrofaj, T-lenfosit gibi inflamatuvar hücrelerin invazyonu ile ilişkili olup, nekrozun T-hücre aracılı hasar yoluyla arttırılabileceği akla gelmiştir. Ekstrasellüler matris ligandları ve reseptörlerinin kendi dokusunu yabancı olarak algılamaya yol açan sitotoksik lenfositleri indükleyebileceği ve kompleman ve kalsiyumun içeri girişinde artışla beraber nekroza yol açabileceği üzerinde durulmuştur. Nitekim DMD'de periferik kanda T supresör/sitotoksik hücrelerin sayısında önemli bir artış olduğunun saptanması bu hipotezi desteklemiştir. Ayrıca distrofik kasta, normal kas dokusunda saptanmayan majör histokompatibilite kompleks I antijenlere rastlanması da distrofik kasın T hücre aracılı atağa daha da açık hale geldiğini göstermiştir. Ayrıca mast hücrelerinin proteolitik aktivitesinin mdx farede büyük kas lif gruplarının nekrozundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. İnflamasyonun patolojideki önemi ile ilgili olarak distrofik kasta artmış dendritik hücre de destekleyici bulgulardan biridir (139). Son zamanlarda distrofinin satellit hücrelerde eksprese olduğu ve apikobazal polarite sağlayarak asimetrik kök hücre bölünmesinde görev aldığı anlaşılmıştır. Distrofin eksikliğinde satellit hücre disfonksiyonu ortaya çıkması, myojenik programın bozulması ile beraber rejenerasyon defekti, hastalık patogenezinde rol oynamaktadır (140).

2.7. Genotip Fenotip Korelasyonları

Monaco ve ark., okuma çerçevesini bozan mutasyonların erken dur kodon oluşumuyla güdük ve nonfonksiyonel proteine neden olarak DMD ile sonuçlandığını, çerçeve okumasını bozmayan mutasyonların ise daha kısa ama fonksiyonel protein oluşumu ile BMD'ye neden olduğunu önermişlerdir (13). Bu kural olguların %92'sinde geçerlidir (14). Santral rod domainin proksimalini silen delesyonlar asemptomatik olabilmekte ya da egzersiz sonrası kas krampları, artmış CK enzim düzeyleri gibi hafif bulgularla seyredebilmektedir (141). Ekzon 2-8 (aktin bağlayıcı domain) çerçeve içi delesyonları ağır BMD ile ilişkili olup (142) santral rod domainde görülen çerçeve içi geniş delesyonlar ise BMD fenotipi ile ilişkilidir (143). Ancak, amino terminal uçtan başlayıp santral domaine uzanan çerçeve içi delesyonlar genellikle DMD fenotipine neden olmaktadır. Bu noktada aktin bağlayıcı domainlerin etkilenim oranları ön plana çıkmaktadır (142).

Delesyonun büyüklüğü ile fenotip arasında doğrudan bir ilişki olmasa da bir eşik değer mevcuttur. Otuz altı ekzonu aşan çerçeve içi delesyonlar ağır bir klinik tablo ile ilişkili bulunmuştur. Çok kısa distrofin molekülünün distrofin ağıнын yanlış dizilimine sebep olabileceği fikri ortaya atılmıştır (144). Ekzon 8 öncesinde ortaya çıkan okuma çerçevesini bozan mutasyonlar BMD ile sonuçlanabilmektedir. Bu durumdan ekzon 6'da ya da ekzon 8'de yer alan alternatif translasyon başlangıç bölgesi sorumlu tutulmuştur. Ekzon 3-7 delesyonu BMD ya da DMD fenotipiyle sonuçlanabilmektedir. Ekzon 3-7 delesyonu olan bir grup hastada yapılan çalışmada amino terminal uca ve ekzon 8'in 5' ucuna spesifik antikörlerle distrofin saptanamazken, 3' bitimine spesifik antikörlerle distrofin tespit edilmiştir. Bu duruma ekzon 8'de yer alan bir alternatif translasyon başlangıç bölgesinin sebep olduğunu bildirmişlerdir (145). Ekzon 1'de ortaya çıkan güdük protein mutasyonlarında görülen BMD fenotipinin de ekzon 6'da yer alan alternatif translasyon başlangıç bölgesi kaynaklı olduğu gösterilmiştir (146).

Dur kodonu oluşturan ya da çerçeve kayması mutasyonlarına sahip bazı BMD olgularına rastlanmıştır. Bu olgularda mutasyona uğrayan ekzonun alternatif kırılma ile mRNA'ya katılmadığı gözlenmiş olup, bu durumdan alternatif kırılma ya da mutasyon kaynaklı ekzon atlama sorumlu tutulmuştur (147). Nitekim ekzon 31'de dur kodonu mutasyonuna sahip bir olguda mutasyonun bir susturucu protein olan heterojen nükleer ribonükleoprotein A1 (hnRNPA1) için yüksek düzeyde spesifik bağlanma bölgesi oluşturarak ekzonik kırılma susturucusu meydana getirdiği gösterilmiş ve distrofin geninde ekzon atlamanın moleküler mekanizması ilk defa gösterilmiştir (148). Sisteinden zengin domainde delesyonu olan olgularda ağır DMD kliniği gözlenmektedir. Bu domain distrofin molekülünün fonksiyonunda oldukça önemlidir (149, 150). Ekzon 44'ü çevreleyen delesyonlar geniş bir klinik spektrumla karşımıza çıkabilmektedir (151). Ekzon 44'ün spontan olarak atlandığı bu olgularda gösterilmiş olup, bir miktar çerçeve içi distrofin üretimi sağlamaktadır (152).

Distrofinopatilerde ayrıca mental retardasyonun genotiple ilişkisi saptanmıştır. Özellikle Dp140 (8, 153) ve Dp71 (8, 154) izoformlarını etkileyen mutasyonlarda IQ değerleri daha düşük bulunmuştur. Daoud ve ark. tarafından 81 D/BMD'li olguda yapılan çalışmada ise Dp71 izoformunun ekspresyonunu bozan tüm DMD olgularında zihinsel yetersizlik saptanmış, Dp71'i etkilemeyip diğer tüm izoformları etkileyen mutasyonları olan olguların çoğunda ise normal ya da sınırda bilişsel performans tespit edilmiştir. Ayrıca Dp71 etkileniminin bilişsel yetersizliği ağırlaştırdığı ve IQ skorunu 2 SD aşağı çektiği bulunmuştur (154). Ekzon 31 ve 44 arasındaki mutasyonlar uzun izoformlara ek olarak Dp260 (en çok retina); ekzon 45 ve 62 arasındaki mutasyonlar ek olarak hem Dp140 (beyin ve böbrek) hem de Dp116 (Schwann hücreleri); ekzon 63'ün aşağısındaki mutasyonlar ise en kısa form olan Dp71 (en çok bulunan beyin izoformu) ve tüm distrofin ürünleri üzerinde bozulma yaratacaktır (53).

2.8. Tedavi

Şu an için D/BMD için kür sağlayan herhangi bir tedavi mevcut değildir. Olgularda kas inflamasyonunu azaltarak hastalık progresyonunu geciktiren steroidler tek seçenektir. On iki DMD çalışmasının toplandığı 667 olguyu kapsayan bir metaanalizde kortikosteroidlerin kas gücünde 2 yıl kadar iyileşme sağladığı tespit edilmiştir (155). Ancak bu alandaki gen ve hücre tedavisi çalışmaları umut vericidir. Ekzon atlamada *DMD* geninin pre-mRNA kırılmasında önceden belirlenmiş ekzonların atlanmasını sağlayan sentetik antisens oligonükleotitler kullanılır. Burdaki amaç okuma çerçevesini düzelterek BMD'ye benzer şekilde çerçeve içi protein elde etmektir. Eteplirsen bir fosforamidat morfolino oligomeridir ve ekzon 51 atlama için tasarlanmıştır (156). Duchenne musküler distrofi olgularının %10-15'inde kullanıma uygundur . Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi tarafından 2016 yılında onaylanmıştır (157). Bir diğer ilaç ise olguların %10-15'inde prematür stop kodon oluşumuna neden olan mutasyonlara yönelik oral olarak kullanılan Ataluren'dir. Ribozomal RNA subünitlerine bağlanarak prematür dur kodon tanınmasını bozarak translasyonun devamını ve modifiye bir distrofin protein üretimini sağlar. Ataluren' e Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi tarafından onay verilmemiş olup sadece Avrupa İlaç Ajansı tarafından 2014 yılında onay verilmiştir (156). Ataluren ülkemizde 2015 yılında Sosyal Güvenlik Kurumu tarafından ödeme kapsamına alınmıştır.

Ayrıca kas gelişimi ve rejenerasyonu (myoblast transplantasyonu, kardiyosfer kökenli-hücreler, ütrofin modülatörü, myostatin inhibitörü), inflamasyon ve fibrozis azaltıcı ajanlar (NF-kappa B inhibitörleri, givinostat) ve kalsiyum homeostazı (Rimeporid) ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (156).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta Seçimi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2017 Aralık-2018 Temmuz tarihleri arasında başvuran olgulardan genetik tanı sağladığımız Duchenne/Becker musküler distrofi hastalarından araştırmayı kabul edenler ve 2007 Ocak-2017 Aralık arasında genetik tanısını sağladığımız tüm Duchenne/Becker musküler distrofi olguları çalışmaya dahil edilmiştir. Aralık 2017 sonrasında çalışmaya alınmak istenen hastaların ebeveynlerine çalışma hakkında bilgi verilip onam formu imzalatıldı. On sekiz yaşından büyük olguların ise kendisinden onam alındı (Bkz: Ek 1). Çalışma DEÜTF Etik Kurulu tarafından 07.12.2017 tarih ve 2017/28-32 sayılı karar ile onaylandı (Bkz: Ek 2).

Ayrıca takip olgularımızdan 6-18 yaş grubunda olup, çalışmayı kabul edenlerin IQ değerleri ölçülüp, psikiyatrik değerlendirmesi yapılmıştır. Ek 3'te belirtilen etik kurul onayı olan çalışmamızda, bu olguların ebeveynlerinden ve kendilerinden gerekli onam alınmıştır. (Bkn: Ek 4)

3.2 Verilerin Toplanması

DMD geninde MLPA yöntemi ya da yeni nesil dizi analizi yöntemi ile elde edilen mutasyon verilerine DEÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (AD) arşivindeki dosyalardan ve dijital kayıtlardan ulaşıldı. Ayrıca klinik ve laboratuvar bulgularına ait veriler Tıbbi Genetik AD dosyalarına ek olarak DEÜTF Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı'nın dosya ve medikal kayıt sistemi taranarak elde edildi. Olgulara ait veriler veri kayıt formuna kaydedildi (Bkz: Ek 5). Veri kayıt formu başvuru yaşı, başvuru şikayeti, şikayet başlangıç yaşı, başvurudaki kreatin kinaz enzim düzeyi, gelişim basamakları, fizik muayene bulguları (baş çevresi, boy ve kilo ölçümleri, varsa dismorfik bulgular, gastrokinemius psödohipertrofisi, Gowers bulgusu), konjenital kalp hastalığı, skolyoz, osteoporoz, kırık, ortopedik komplikasyon, zihinsel yetersizlik (varsa IQ skoru), malign hipertermi, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, otizm, obsesif kompulsif bozukluk tanıları ve ek hastalıklarının olup olmadığı ve kas biyopsisi, Ekokardiyografi ve son değerlendirilen solunum fonksiyon testi bilgilerini ve indeks olgunun ve annesinin *DMD* gen analiz sonuçlarıyla, aile öyküsünü içermekteydi.

Olgular klinik bulgularına, şikayet başlangıç yaşlarına, hastalık ilerleyişine ve ambulasyon kayıp yaşlarına (*DMD* <13, *BMD* ≥16, *IMD* ≥13<16) göre üç gruba ayrıldı.

3.3. Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metodu

3.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, organik açıdan bozulmamış olan hücrelerde özel teknikler aracılığıyla DNA molekülünün ortaya çıkarılmasıdır. Olgularda periferik kandan spin kolon yöntemi ile “High Pure PCR Template Preparation (Roche, Almanya)” kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Protokol kit içeriğinde belirtilen standartlara göre gerçekleştirildi:

- 1) Her hasta için 1,5 ml’lik steril, kapaklı bir mikrosantrifüj tüpü numaralandırılıp hasta ismi üzerine yazıldı. Tüplere hastalara ait 200 µl periferik kan örneği aktarıldı. Üzerlerine sırasıyla 200 µl “binding buffer” ve 40 µl proteinaz K (kullanım öncesi liyofilize halde bulunan proteinaz K 4,5 ml distile suda çözüldü) ilave edilip vorteks karıştırıcı yardımıyla 2-3 sn karıştırıldı.
- 2) Tüpler ısı bloğuna konuldu ve 72°C’de 10 dk boyunca inkübe edildi.
- 3) Süre bitiminde, tüplerin üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Sonrasında tüplerdeki karışımlar içlerinde “high püre” filtre bulunan 2 ml’lik toplama tüplerine aktarıldı.
- 4) 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
- 5) “High püre” filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarıldı ve önceki toplama tüpleri atıldı. “High püre” filtreli tüpler üzerine 500 µl “inhibitor removal buffer” eklendi.
- 6) 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
- 7) “High püre” filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı ve önceki toplama tüpleri atıldı. “High püre” filtreli tüpler üzerine 500 µl “washing buffer” eklendi.
- 8) 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
- 9) “Washing buffer” ile yıkama işlemi 2 defa tekrarlandı.
- 10) “High püre” filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı ve üzerine herhangi bir çözelti eklenmeden 13000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
- 11) “High püre” filtreli tüp daha önceden numaralandırıp hasta isimlerini yazdığımız mikrosantrifüj tüplerine alındı ve önceki toplama tüpleri atıldı.
- 12) “High püre” filtreli tüpler üzerine daha önceden 72°C’ye ısıtılan elution buffer’dan 100 µl eklendi ve oda ısısında 2 dk inkübasyona bırakıldı.
- 13) İnkübasyon sonrasında 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
- 14) “High püre” filtreli tüpler atıldı.
- 15) Elde edilen DNA’lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, Parafilmle sarılıp DNA saklama kutularına yerleştirilip -20°C’de saklandı.

3.3.2. Spektrofotometre ile DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi

Spektrofotometre, DNA, RNA, oligonükleotidler gibi ışık absorpsiyonu yapabilen maddelerin sıvı solüsyonlar içindeki miktarı hakkında kantitatif bilgi verir. Çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilir ve çözelti tarafından ne kadar ışığın absorbe (A) edildiği belirlenir. DNA ve RNA 260 nm’de ve proteinler 280 nm’de

ışığı maksimum absorbe ettiği için A260/A280 oranı kullanılarak nükleik asitlerin saflığı hesaplanabilir. Saflığı, analiz için uygun olan DNA 1,8-2 değerlerinde A260/A280 oranına sahiptir. Bu değer aralığından daha az olan oranlar protein kontaminasyonunu gösterirken üzerindeki değerler RNA miktarının fazla olduğunu gösterir.

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede (NanoDrop) ölçüldü. Saflık ve konsantrasyonlarında problem olan DNA'lar tekrar izole edildi.

3.3.3. Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu

DMD geninin 79 ekzonunun tamamı MLPA yöntemi ile tarandı. Reaksiyon için iki reaktif seti (SALSA MLPA prob seti P034 ve P035) üreticinin (MRC-Holland, Amsterdam, Hollanda) talimatlarına uygun olarak kullanıldı. Genomik DNA denatüre edildi, hibridize edilip, ligasyon işlemine tabi tutuldu ve çoğaltıldı. Amplifiye edilen ürünler kapiller elektroforez cihazına (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) yüklendi.

DNA Denatürasyonu ve Prob Miks ile Hibridizasyonu

- Çalışmada kullanılacak DNA'lar -20 °C den çıkartılarak çözüldü
- Kısa süreli santrifüjün ardından spektrofotometrede ölçüm yapıldı.
- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan ölçümler neticesinde 5 µl (60-200 ng DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PZR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C de 15 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA' nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler 25 °C ye soğutuldu.
- 25 °C deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (p034 ve p035) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Daha sonra 95 °C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C de 18 saat hibridizasyona bırakıldı.

Ligasyon

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Her bir örnek için 3µl Ligase 65Buffer-A, 3 µl Ligase-65 Buffer-B, 25 µl su ve 1 µl Ligase 65 enzim hazırlanarak pipetaj ile karıştırıldı.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edildi.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.
- Ardından 20 °C de ürünler cihazdan alınarak bir sonraki aşamaya geçildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışması

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PZR strip tüplerine aktarıldı.
- Bu aşamadan sonra yapılacak çalışmalar buz üzerinde devam edildi.
Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla; 7.5 µl distile su, 2 µl Salsa Primer FAM, 0.5 µl Salsa Polimeraz eklenir ve PZR başlatılır.
- PZR programı;

Denatürasyon	95°C 30 sn	} 35 döngü
Bağlanma	60 °C 30 sn	
Uzama	72 °C 1 dk	
Final Uzama	72 °C 20 dk	

- Program bitiminde örnekler alınarak yükleme işlemine geçilir.

3.3.4. Kapiler Elektforez Cihazına Yükleme

- Örnekleri yürütmek üzere ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem, Foster City, USA) cihazı kullanıldı.
- Örnek yükleme plağı için örnek başına; 10 µl formamid, 0,5 µl liz500 size standart olacak şekilde mastermiks hazırlanır.
- Mastermiks kuyucuklara 10.5 µl olacak şekilde dağıtılır.
- 2 şer µl PZR ürünü kuyucuklarına eklenir.
- MLPA problemlerinin dozaj oranının analizi için Coffalyser.Net™ ((MRC-Holland, Amsterdam, Hollanda) yazılımı kullanıldı.
- Kromozomal açıdan normal olduğu bilinen 3 vakanın pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı.
- Program tarafından test edilen prob bölgesi için, dozaj oranı (DO) 0.8 ve 1.2 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu belirlendi. Olası farklı ihtimaller için dozaj oranları sırasıyla şu şekildeydi;

Erkek olgular için;

Hemizigot delesyon DO=0

Duplikasyon 1.65<DO<2.25

Kadın olgular için

Taşıyıcılık 0.4<DO<0.65

Homozigot delesyon DO=0
Heterozigot duplik. $1.30 < DO < 1.65$
Heterozigot triplik./
Homozigot duplik. $1.75 < DO < 2.15$

- Elde edilen sonuçlar değerlendirilmek üzere kaydedildi.

3.3.5. DMD geni Sekanslaması

Hedef bölgenin çoğaltılması için 10-50 ng DNA DMD geninin tüm kodlayıcı ekzonlarını hedef alacak şekilde “NEXTflex Duchenne Muscular Dystrophy Amplicon Panel” (Bioo Scientific, Texas, USA) kiti ile amplifiye edildi. Hedef bölgeler PZR I’de çoğaltıldıktan sonra, adaptör ligasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra PZR II ile hem istenilen bölge zenginleştirildi hem de hastalara spesifik barkodlar ve aşağı yönlü okuma için gerekli sekanslar yerleştirildi. Böylece amplicon kütüphanesi oluşturuldu. Sekanslama MiniSeq platformu (Illumina) ile üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

3.3.6. Varyantların analizi

Elde edilen dataların analizi için Seq (Genomize İns., İstanbul, Türkiye) yazılımı kullanıldı. Varyantların sınıflandırılması Amerikan Tıbbi Genetik Derneği’nin 2015 yılı rehberi doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.4. Okuma Çerçevesi Analizi

Büyük delesyon ve duplikasyonların okuma çerçevesi üzerine olan etkisi “DMD exonic deletions/duplications reading-frame checker 1.9 (updated 2009, http://www.humgen.nl/scripts/DMD_frame.php)” yazılımı ile tespit edildi.

3.5. IQ Ölçümü ve Psikiyatrik Değerlendirme

3.5.1. Wechsler Çocuklar İçin Zeka Ölçeği (WISC-R)

Wechsler Çocuklar İçin Zeka Ölçeği 6-16 yaş arası bireylere uygulanmaktadır. Sözel ve Performans olmak üzere iki ana bölüme ayrılır ve her bir bölüm farklı yetenek alanlarına ait 6 alt-test içermektedir. Uygulama sırasına göre bu alt-testler: genel bilgi, resim tamamlama, benzerlikler, resim düzenleme, aritmetik, küplerle desen, sözcük dağarcığı, parça birleştirme, yargılama, şifre, sayı dizisi ve labirentlerdir. Son iki alt-test yardımcı yedek testlerdir. Sözel alt-testlerden biri, performans alt-testlerinin tamamı sürelidir. Uygulama yaklaşık 60-90 dakika sürmektedir. Sözel ve performans bölümlerinden alınan puanlar toplanır ve ayrı ayrı Sözel ve Performans zeka bölümü puanlarına dönüştürülürler; bu

ikisinin toplamı ise çocuğun Toplam zeka bölümü (IQ) puanını verir. Testlerde 69 ve altında alanlar zeka geriliği, 70-79 arasında alanlar sınırdaki zeka, 80-89 arasında alanlar donuk normal, 90-109 arasında alanlar normal ve 110-119 arasında puan alanlar parlak zeka, 120-129 arası alanlar üstün zeka, 130-139 arası puandakiler çok üstün zeka, 140 ve üstü puan alanlar dahi olarak değerlendirilmektedir.

Ayrıca zeka geriliğinin derecesi de ICD 10'da hafif (50-69), "orta" (35-49), "ağır" (20-34) ve "çok ağır" (20'nin altında) olarak dört gruba ayrılmıştır (158).

3.5.2. Okul Çağı Çocukları için Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi – Şimdi ve Yaşam Boyu Versiyonu – Versiyon 1.0 [Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School Aged Children – Kiddie-SADS-Present and Lifetime Version]

Çocuk ve ergenlerin DSM-III-R ve DSM-IV tanı ölçütlerine göre geçmişteki ve şu andaki psikopatolojilerini saptamak amacıyla, Kaufman ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, yarı yapılandırılmış bir görüşme formudur (159). Form, üç bölümden oluşmaktadır. 'Yapılandırılmış Başlangıç Görüşmesi' olarak adlandırılan ilk bölümde çocuğun demografik bilgileri, sağlık durumu, şu andaki yakınması, geçmişte aldığı psikiyatrik tedavilere ilişkin bilgilerle, çocuğun okuldaki durumu, hobileri ve arkadaş ilişkileri gibi bilgiler edinilir. İkinci bölüm olan 'Tanı Amaçlı Tarama Görüşmesi' iki yüze yakın özgül belirti ve davranışı değerlendirir. Her bir belirtiyi değerlendirmek için, belli tarayıcı sorular ve değerlendirme ölçütleri verilmiştir. Tarama görüşmesi ile pozitif belirtiler varsa tanıyı doğrulamak amacıyla aşağıdaki altı tanı alanında ek puanlama yapılmaktadır: Duygulanım bozuklukları, psikotik bozukluklar, anksiyete bozuklukları, davranış bozuklukları, madde kullanım bozuklukları ve diğer bozukluklar. Her bir ek belirti listesi, tarama soruları ile bozukluğun şimdiki ve geçmişteki en ağır ataklarını değerlendirmek üzere ölçütler içermektedir. Her bir tanı için DSM-III-R ve DSM-IV için tanı ölçütleri verilmiştir. Çocuğun şu andaki işlev düzeyini belirlemek için düzenlenen üçüncü bölüm ise 'Çocuklar için Genel Değerlendirme Ölçeği' olarak adlandırılır. Belirti şiddeti 'yok', 'eşik altı' ve 'eşik' şeklinde derecelendirilir. Bu çizelge tanı koyulan bireylerde belirtilerin varlığına dair bilgi verir, belirtilerin şiddetini değerlendirmez.

3.6.Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistik analizleri SPSS (Statistical Package for Social Science) 15.0 istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı. Sayımla belirtilen değişkenlerin iki grup karşılaştırmasında Ki kare ve Fisher kesin testi kullanıldı. Ölçümle belirtilen değişkenlerin analizinde ise Student t ya da Mann Whitney U Testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Demografik ve Klinik Profilleri

Tanı konan 156 DMD (%65,85), 78 BMD (%32,8), 4 IMD (%1,7) olgusu vardı. Olgulardan 96'sının fenotipi bilinmiyordu. Olgulardan 222'sinin başvuru şikayeti net olarak kaydedilmişti. Başvuru şikayeti olarak en sık yürüyüş problemleri görüldü (% 56,8). İkinci sıklıkta ise rutin testler esnasında saptanan CK enzim yüksekliği geliyordu (%36). Beş olgu aile öyküsü, üç olgu kas krampları ve ağrı, üç olgu baldırlarda şişlik, üç olgu motor gelişim basamaklarında gerilik ve iki olgu da konuşma gecikmesi şikayeti ile geldi. Rabdomyoliz nedeniyle araştırılan yalnızca bir olgu mevcuttu. Duchenne musküler distrofi olgularında başvuru yaşı ortalama 6 ± 4 olup, BMD olgularında ise $13,6\pm12,4$ idi. Olguların %24,9'unda 18 aydan sonra yürüme mevcuttu, %24,6'sının yürümesi zamanındaydı ve %48,5'nin yürüme zamanı bilinmiyordu. Duchenne musküler distrofi olgularının yürüme zamanı BMD olgularına göre daha geç olarak tespit edildi ($18,4\pm6,2$, $14,2\pm4,3$; $p<0,005$). Baş tutma, destekli oturma, desteksiz oturma, konuşmaya başlama zamanları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Olgulardan %47.1'inin (65/138) konuşmasında gecikme mevcuttu, %52,9'unda (73/138) konuşmada gecikme yoktu. Duchenne musküler distrofi olgularında konuşmaya başlama zamanı $15,54\pm7,4$ ay, BMD olgularında $16,3\pm6,8$ ay olarak tespit edildi. Olguların %58,7'sinin ise konuşma zamanı bilinmiyordu. Gastrokinemius hipertrofisi olguların %51,5'inin başvuruda mevcuttu, %24,3'ünün ise yoktu. %24,3'ünün ise kayıt edilmemişti. Gowers bulgusu olguların %37,4'ünde pozitifken, %35,9'unun negatifti. Olgularımızdan 51'inin tekerlekli sandalyeye bağımlı olduğunu, 20 olguda kardiyomyopati saptandığını, 11 olguda konjenital kalp hastalığı olduğunu, 7 olgumuzda pelvikaliektazi olduğunu öğrenebildik.

4.2. Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu İle Saptanan DMD Gen Mutasyonları

Bir ya da daha fazla ekzonu içeren 293 delesyon 41 duplikasyon saptadık. Delesyon oranımız %87,7, duplikasyon oranımız ise %12,3 olarak tespit edildi. Delesyon tespit edilen olgulardan 85'inin (%29) fenotipi kategorize edilemedi. Delesyon saptanan olgular arasında 130 DMD (130/208, %62.5), 74 BMD (74/208, %35,6), 4 IMD (4/208, %1,9) olgumuz vardı. Duplikasyon olgularımızın 11'inin (%26,8) fenotipi bilinmiyordu. Duplikasyonu olan 26 DMD (26/30, %86,7), 4 BMD (4/30, %13.3) olgusu mevcuttu. Duchenne musküler distrofi olgularının %83,3'ünde delesyon saptanırken %16,7'sinde duplikasyon tespit edildi. Bu oranlar BMD olgularında delesyon için %94,9, duplikasyon için %5,1 şeklindeydi.

4.2.1. DMD Genindeki Delesyon Paternleri

334 probanddaki delesyonlar şöyledi: en sık olarak tek ekzon delesyonları (%18.4) görülmüş olup, onu sırasıyla 3 (%17,1), 4 (%13), 2 (%8,9), 6 (%8,2) ve 5 (%7,2) ekzon delesyonları izlemekteydi. Altı ekzon ve daha az sayıdaki ekzonların delesyonları toplam delesyonlu olguların %72.8'ini oluştururken, 14 ekzon ve üstündeki ekzon sayısını içeren delesyonlar olguların %9.4'ünü oluşturmaktaydı.

Tek ekzon delesyonları içinde en sık ekzon 45 delesyonu (13/54, %24,1) saptandı. Onu sırasıyla ekzon 44 (12/54, %22,2), ekzon 51 (9/54, %16,7), ekzon 50 (5/54, %9,3) ve ekzon 52 delesyonları (5/54, %9,3) izlemekteydi.

334 olguda ekzon 48 en sık delesyona uğrayan ekzondur (122/334). Onu sırasıyla, ekzon 46, 47, 50, 45 ve 49 izlemekteydi. Çoklu ekzon delesyonu olan 139 olguda ise en sık 45-48 delesyonu (n=22) görülürken onu, 45-47 (n=21), 45-50 (n=14), 48-50 (n=14) delesyonları izliyordu.

Delesyonlar en sık santral bölgedeki ekzon 45-54 bölgesinde ortaya çıkmıştı. Üç olgumuzda kompleks delesyon mevcuttu: Bunlar ekzon 19-21 ve 25-29 delesyonu, ekzon 10-47 ve 49-51 delesyonu ve ekzon 3-7 ve 66 delesyonu şeklindeydi. Delesyona uğrayan ekzonların sıklıkları Grafik 1'de gösterilmiştir.

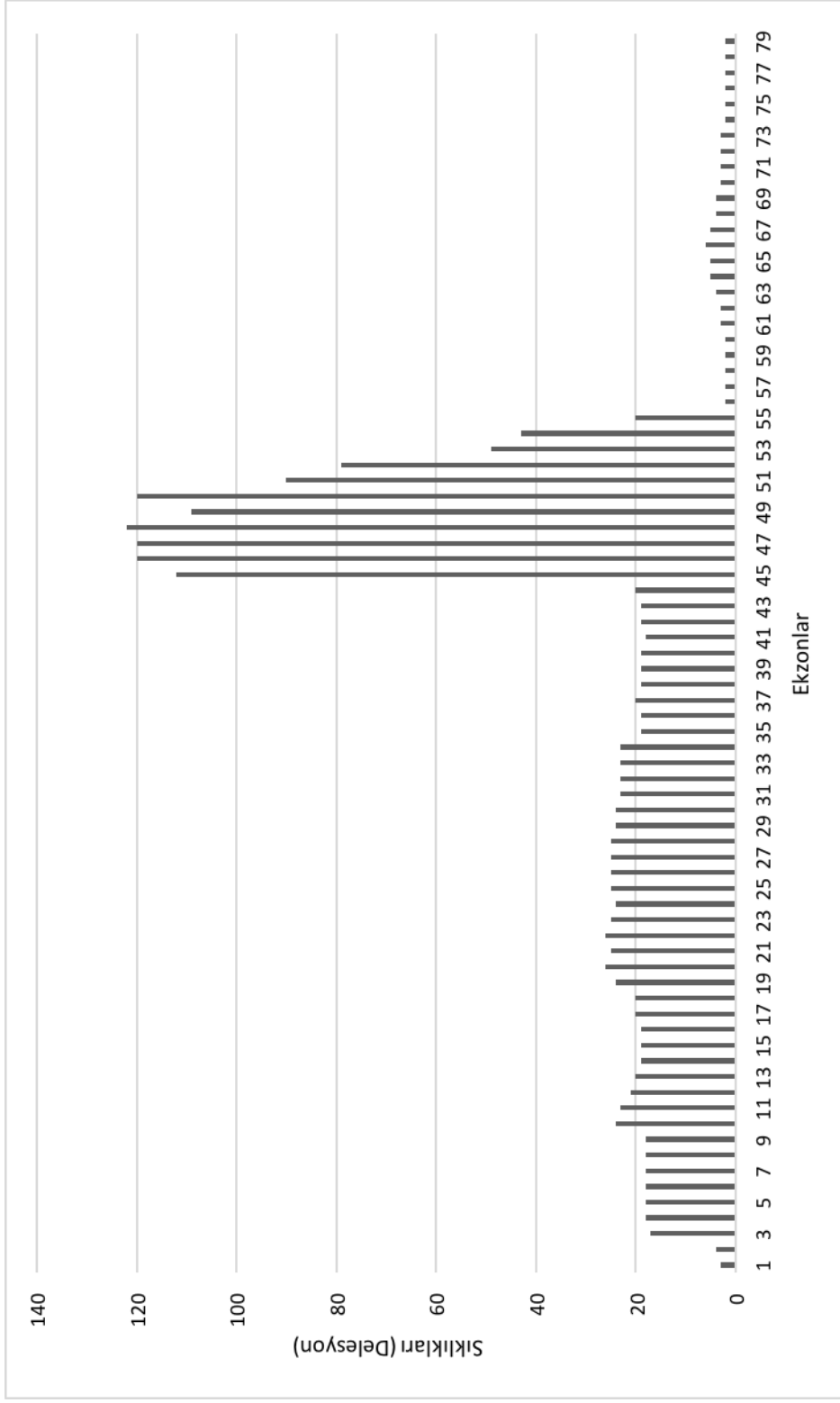
Duchenne musküler distrofi olgularında en sık gözlediğimiz delesyon paterni ekzon 45-50 delesyonuydu (n=9). Bunu sırasıyla ekzon 44 (n=7), ekzon 48-50 (n=6), ekzon 51 (n=6) izlemekteydi. Becker musküler distrofi olgularında saptadığımız en sık delesyon paternleri ise ekzon 45-48 delesyonu (n=20), ekzon 45-47 delesyonu (n=19), ekzon 45-55 delesyonu (n=6) şeklindeydi.

Olgularımızdaki en büyük delesyon genin tüm ekzonlarını içermekteydi. Adrenal yetmezliği olduğu da öğrenilen olguda klinik bilgilerle Xp21.2 bitişik gen silinme sendromu düşünüldü. Ayrıca bir olgumuzda mikroarray dizilime yöntemi ile Xp21.2 mikrodelsyonu tespit edildi.

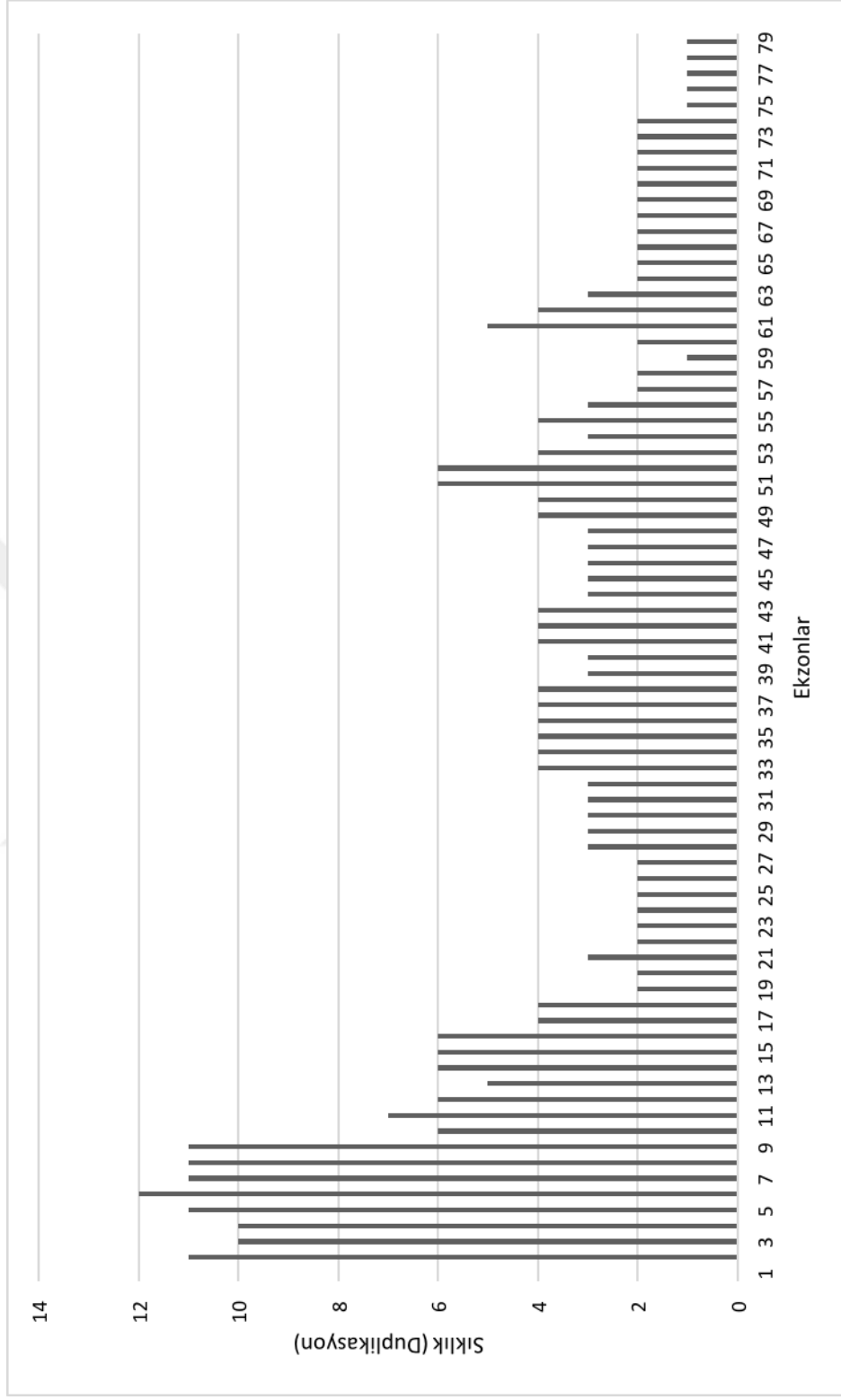
Beş yaşında erkek olgu gastrokinemius hipertrofisi, Gowers bulgusu ve kreatin kinaz enzim yüksekliği nedeniyle tarafımıza distrofinopati ön tanısıyla genetik analiz amacıyla yönlendirildi. Olguda 43 günlükken hiperkalemi, hiponatremi ve büyüme geriliği nedeniyle başvurduğu hastanede adrenal bez hipoplazisi saptandığı öğrenildi. Ayrıca lipemik kan görüntüsü nedeniyle bakılan lipid profilinde trigliserit yüksekliği ve idrar trigliserit düzeyinin yüksek pozitif çıkması nedeniyle alfa gliserol kinaz eksikliği düşünülmüştü. Olgunun ayrıca motor mental gelişim geriliği, unilateral işitme kaybı mevcuttu. Olgumuz ve annesinde 61-79 ekzon delesyonu saptandı. Kromozom analizi normal gelen olgudan mikroarray analizi gönderildi. Xp21.2 bölgesinde 1.2 Mb boyutunda delesyon saptandı.

4.2.2. DMD Genindeki Duplikasyon Paternleri

Tek-ekzon duplikasyonları %22 oran ile en sık gözlenen duplikasyon paterniydi (n=9). Onu sırasıyla 2 ekzon (n=5) ve 6 ekzon (n=5) duplikasyonları izlemekteydi. En sık duplikasyona uğrayan ekzon, ekzon 6 olup onu eşit sıklıktaki 2, 5, 7 ve 9. ekzonlar izlemekteydi. Duplikasyon olgularında etkilenen ekzonların sıklıkları Grafik 2'de gösterilmiştir. Altı ekzon ve daha az sayıdaki ekzon duplikasyonları tüm duplikasyonların % 63,4'ünü (26/41) oluşturuyordu. Üç tane kompleks yeniden düzenlenmeye rastlandı. Bunlar sırasıyla beş sıralı duplikasyon olan ekzon 17,18, 21-38, 41, 49-58, 61-63 duplikasyonu ve iki sıralı 6,7, 42-44 ve 8,9,11 duplikasyonlarıydı. Toplam 30 farklı paternde duplikasyon tespit edilmiş olup, en sık ekzon 2 duplikasyonu (5/41, %12,2) görüldü. Onu sırasıyla ekzon 2-7 (n=4), ekzon 8-9 (n=4), ekzon 3-11 (n=2) duplikasyonları izlemekteydi. Duchenne musküler distrofi olgularında en sık saptadığımız duplikasyon paternleri ekzon 8-9 duplikasyonu (n=4) ve ekzon 2 duplikasyonu (n=3) şeklindeydi.



Grafik 1. Delesyon olgularında etkilenen ekzonların sıklıkları



Grafik 2. Duplikasyon olgularında etkilenen ekzonların sıklıkları

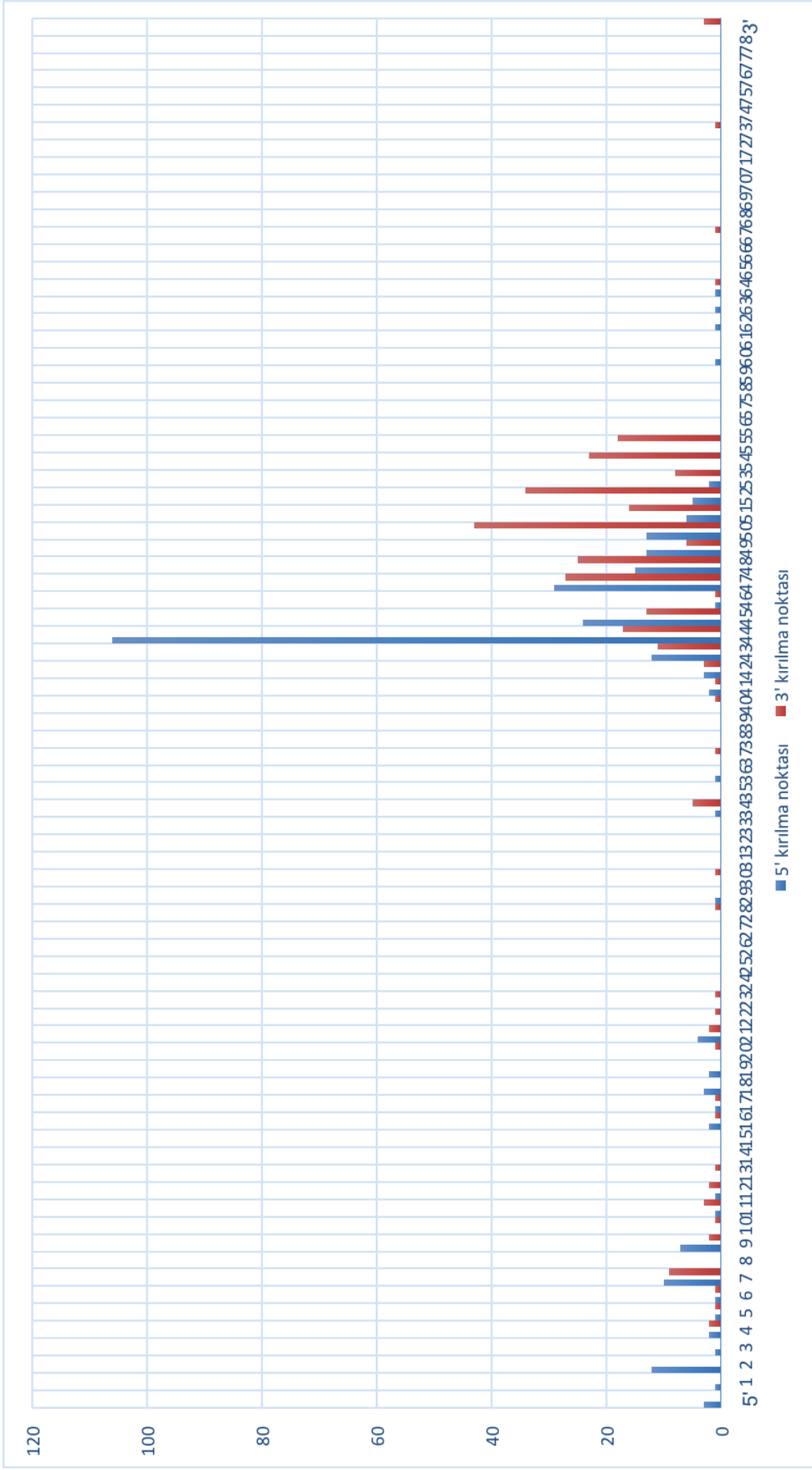
4.3. Kırık Noktaların Dağılımı

4.3.1. Delesyon Kırılma Noktaları Dağılımı

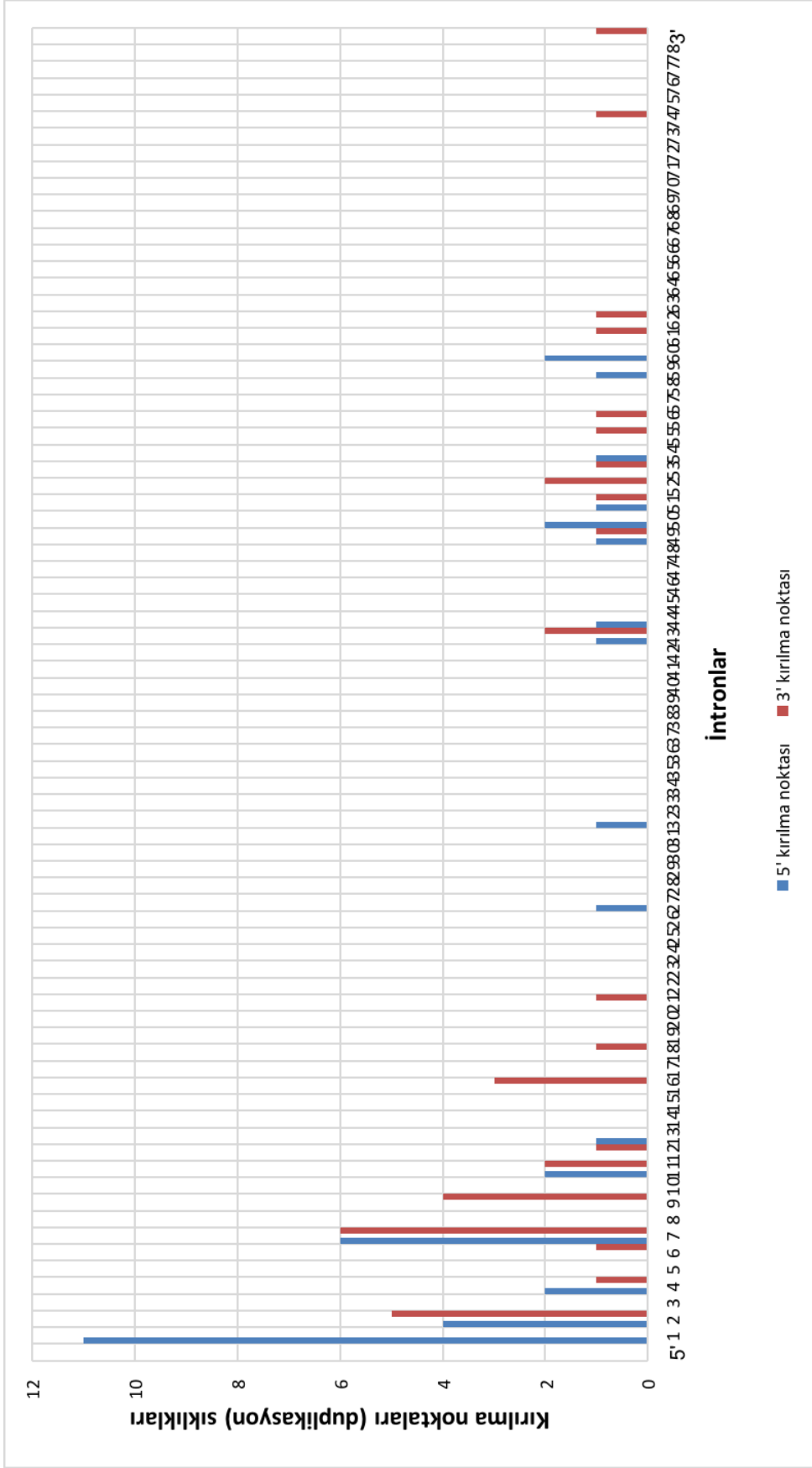
Delesyon kırılma noktaları intron 43-55 bölgesinde kümelenmişti. İtron 43-55 kırıkları delesyondaki kırıkların %80,7'sini oluşturmaktaydı. İtron 44 en sık kırılan introndu (%21,2) ve özellikle de başlangıç kırık noktası (%36,6) olarak karşımıza çıkmaktaydı. Onu sırasıyla intron 47 (%9,7), intron 50 (%9,7), intron 48 (%6,9) izlemekteydi. İtron 8, 14, 15, 24-27, 31-33, 35, 38, 39, 56-59, 61, 65, 66, 68-72, 74-78 kırık noktası olarak saptanmadı. Başlangıç kırık noktası olarak en sık intron 44 (%36,6) olup, onu intron 47 (%10), 45 (%8,3), 48 (%5,2) kırıkları izlemekteydi. Bitiş kırık noktalarının dağılımları ise intron 50 (%14,8), 52 (%11,7), 47 (%9,3), 48 (%8,6) şeklindeydi. Delesyonların intronik kırık noktalarının dağılımı Grafik 3'te gösterilmiştir.

4.3.2. Duplikasyon Kırılma Noktaları Dağılımı

Duplikasyon kırık noktaları *DMD* geninin 5' ucunda yoğunluk göstermekteydi. En sık kırılan intron 7 (%15,8) olup, onu intron 1 (%14,5), 2 (%11,8), 9 (%5,3) takip etmekteydi. İtron 3, 5, 8, 14, 15, 17, 19, 20, 22-26, 28-31, 40-42, 45-48, 57, 58, 63-73 ve 75-78 kırık noktası olarak karşımıza çıkmadı. Başlangıç noktası olarak en sık intron 1 (%28,9) etkilenmekle beraber onu intron 7 (%15,8) ve intron 2 (%10,5) izlemekteydi. Bitiş kırık noktası olarak ise en sık etkilenen intron 7 (%15,8) olup onu intron 2 (%13,2) ve intron 9 (%10,5) izliyordu. Duplikasyonların intronik kırık noktalarının dağılımı Grafik 4'te gösterilmiştir.



Grafik 3. *DMD* genindeki delesyonların intronik kırılma noktalarının dağılımı. Her bir introndaki başlangıç kırılma noktası (5' kırılma noktası) ve bitiş kırılma noktası (3' kırılma noktası) ayrı ayrı gösterilmiştir.



Grafik 4. DMD genindeki duplikasyonların intron kırılma noktalarının dağılımı. Her bir introndaki başlangıç kırılma noktası (5' kırılma noktası) ve bitiş kırılma noktası (3' kırılma noktası) ayrı ayrı gösterilmiştir

4.4. DMD Geni Sekans Analizi Sonuçları

On yedi olgumuzda nokta mutasyonu tespit ettik. Bunların 9 tanesi “novel” mutasyondur. Dur kodonu oluşturan mutasyon 7 olgumuzda saptanmış olup en sık nokta mutasyonuydu. Onu 6 olgumuzda çerçeve kayması mutasyonu ve 4 olguda kesim bölgesi mutasyonu izlemekteydi (Tablo 1). Olgularımızın 8’i DMD, 2’si BMD, 4’ü ise taşıyıcıydı.

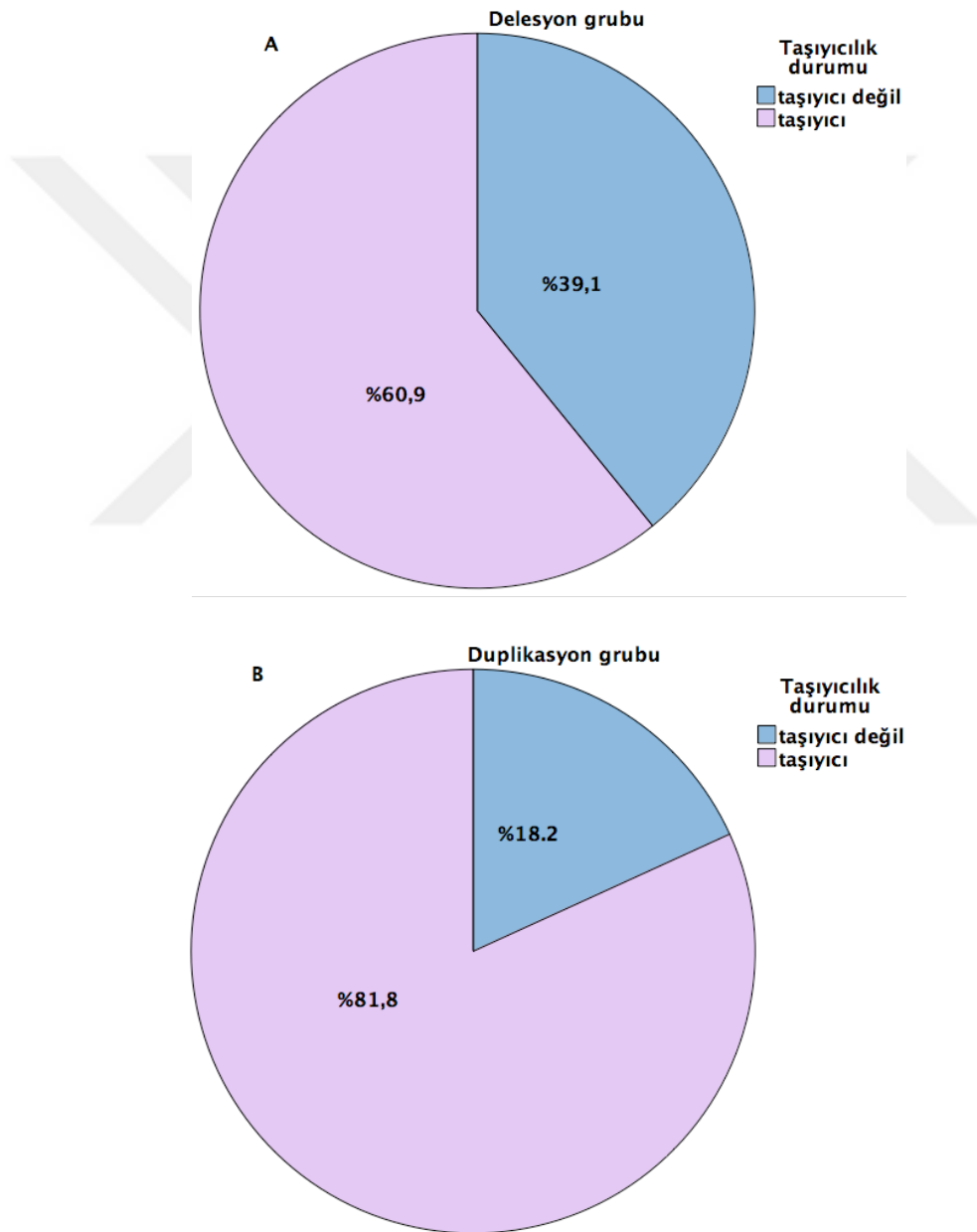
Tablo 1. Nokta mutasyonu tespit edilen olgular ve mutasyonları

Mutasyon	Ekzon/İntron	Fenotip
c.509dupA (novel)	6. ekzon	Taşıyıcı
c.903C>A (novel)	9. ekzon	?
c.1149+1G>T (novel)	10. intron	DMD
c.1150-1G>T (novel)	10. intron	Taşıyıcı
c.2632_2636delAACCGinsCTGT (novel)	21. ekzon	DMD
c.6083_6084delTT (novel)	42. ekzon	DMD
c.7660+1G>A (novel)	52. intron	DMD
c.8575G>T (novel)	58. ekzon	DMD
c.9401_9402delAC (novel)	65. ekzon	DMD
c.583C>T (rs398123999)	7. ekzon	Taşıyıcı
c.1886C>A (rs398123867)	16. ekzon	DMD
c.5009G>A	35. ekzon	BMD
c.8357G>A (rs863225012)	56. ekzon	Taşıyıcı
c.8608C>T (rs398124074)	58. ekzon	?
c.9204_9207delCAAA (rs863225015)	62. ekzon	?
c.10223+1G>A (rs398123834)	70. intron	DMD
c.10258dupT (rs398123835)	71. ekzon	BMD

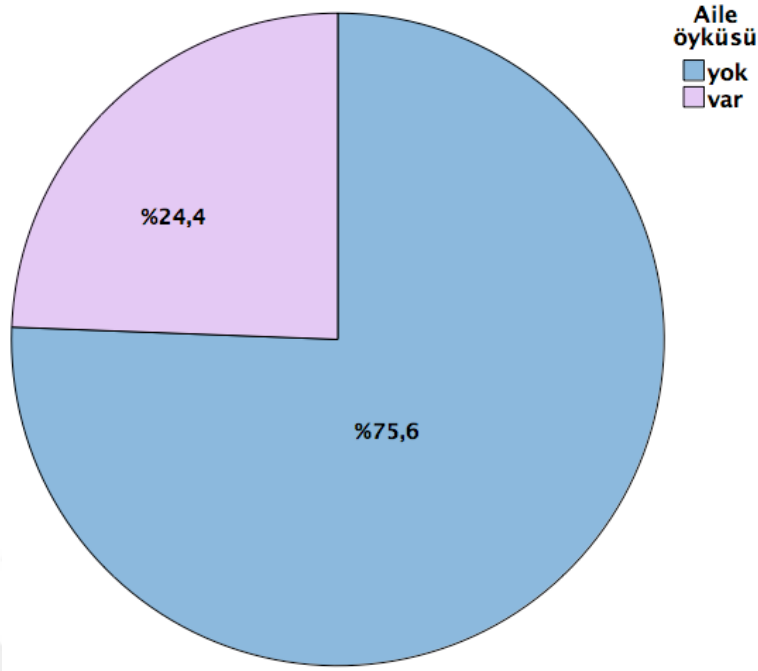
4.5. Aile Öyküsü Ve Taşıyıcılık Durumları

Toplam 258 olgunun taşıyıcılık durumu biliniyordu. Olguların 164’ünün (%63,6) annesinde taşıyıcılık mevcutken 94’ünde (%36,4) taşıyıcılık yoktu. Delesyon grubunda taşıyıcıların oranı %60,9 (137/225), duplikasyon grubunda ise taşıyıcıların oranı %81,8 (27/33) olarak tespit edildi (Grafik 5). Duplikasyon

olgularında taşıyıcılık delesyon olgularına göre daha sık görülmekteydi ($p<0.05$). Duchenne olgularında annenin taşıyıcılık oranı % 61,9 (78/126), BMD olgularında ise %76,3 (45/59) olarak tespit edildi. İki grup arasındaki taşıyıcılık oranları arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Olgular arasında sporadik vakaların oranı %75,6 (220/291) saptanırken, familyal vakaların oranı ise %24,4'tü (71/291) (Grafik 6). Duchenne musküler distrofi olgularının %79'unda aile öyküsü yokken, BMD olgularında sporadik vakaların oranı %63,2 idi. BMD olguları DMD olgularına göre daha fazla ailesellik gösteriyordu ($p<0.05$).



Grafik 5. A) Delesyonlu olgularda annenin taşıyıcılık durumu B) Duplikasyonlu olgularda annenin taşıyıcılık durumu



Grafik 6. Olgulardaki familyal ve sporadik vakaların dağılımı

4.6. Okuma Çerçevesi ve Fenotipler

Mutasyonların 323'ünün okuma çerçevesi üzerine etkisi değerlendirilebildi. Okuma çerçevesini bozan 228 (228/323, %70,6) mutasyon, okuma çerçevesinin korunduğu ise 95 (95/223, %29,4) mutasyonumuz mevcuttu. Duchenne ve Becker musküler distrofi olgularının %7,5'i okuma çerçevesi kuralına uymuyordu (17/225).

4.6.1. Okuma Çerçevesine Uymayan DMD Olguları

Yüz kırk yedi DMD olgusundan, yalnızca 9 olguda (%6,1) okuma çerçevesi korunmuştu. Bu mutasyonların 7'si delesyon, 2'si duplikasyondur. Bir olgumuzda kas biyopsisi distrofin negatif olup, 45-48 ekzon delesyonu mevcuttu. Üç olgumuzda NT domaininden rod domaine uzanım gösteren delesyonlar mevcuttu. İlk olgu 3-41 delesyonu olup, distrofin C ile soluk distrofin N ve R ile normal boyama paterni mevcuttu ve 4 yaşında bulguları başlamıştı. Diğer olgunun ise 5 yaşında yürüyememe şikayeti mevcut olup 4-44 delesyonu mevcuttu. Üçüncü olgunun ise 3 yaşında şikayetleri başlamış olup 8-21 delesyonu mevcuttu ve 13 yaşındayken tekerlekli sandalye kullanıyordu. Bir başka geniş delesyonlu olgumuzda rod domain etkilenmişti. Olgunun kas biyopsisinde distrofin ile diffuz negatif boyanma mevcuttu. Şikayetleri 3 yaşında başlayan olguda 10-44 delesyonu tespit edildi. Rod domainin etkilendiği daha küçük bir delesyon olan 10-12 delesyonlu bir olguda şikayetler 3 yaşında başlamış ve kas biyopsisinde distrofin diffuz negatifti. Olgularımızdan biri 63-73 delesyonuna sahip olup 8 yaşından beri tekerlekli sandalye kullanıyordu. Kas biyopsisi sonucunda ise distrofin boyaması pozitif idi.

Duplikasyonlu olgularımızın ikisinde de 2-7 duplikasyonu mevcut olup, her ikisinin kas biyopsisinde distrofin diffuz negatifti. Bir başka 2-7 duplikasyonlu olgumuzun kas biyopsisinde fokal distrofin defekti mevcut olup, 13 yaşındaki verisinde DKMP nedeni ile kardiyak transplantasyon planlandığı kaydedilmişti.

4.6.2. Okuma Çerçevesine Uymayan BMD Olguları

Toplam 78 BMD olgusundan 70 olguda (%89,7) okuma çerçevesi korunmuştu. Okuma çerçevesinin bozulduğu 8 olgu (%10,3) vardı. Bu mutasyonların 6'sı delesyon, 2'si duplikasyondur. İki olgumuzun 3-7 ekzon delesyonu olup, biri 17 yaşından itibaren tekerlekli sandelyeye bağımlı olmuştu ve bize başvuru yaşı 30 idi. Bir diğerinin ise bulguları 6 yaşında başlamış ve bize 12,5 yaşında Gowers pozitifliği ile başvurmuştu ve hiç ilaç kullanmamıştı. İki olgumuzda ekzon 45 delesyonu mevcuttu. Her ikisinin de kas biyopsisi distrofin boyamasında fokal defekt mevcuttu. Biri 9 yaşında ve zıplayabiliyordu. İki olgu 45-54 ekzon delesyonuna sahipti ve kas biyopsilerinde fokal distrofin defekti mevcuttu.

Duplikasyonlu olguların birinde 8-12 duplikasyonu olup, kas biyopsisinde fokal distrofin defekti mevcuttu, bir başka olguda ise 60- 74 duplikasyonu olup kas biyopsisinde fokal distrofin defekti mevcuttu. Okuma çerçevesine uymayan olgulara ait veriler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Okuma çerçevesi kuralına uymayan büyük yeniden düzenlenmeler

Mutasyon	Okuma çerçevesi	Fenotip
45-48 del	Korunmuş	DMD
3-41 del	Korunmuş	DMD
10-12 del	Korunmuş	DMD
8-21 del	Korunmuş	DMD
4-44 del	Korunmuş	DMD
63-73 del	Korunmuş	DMD
10-44 del	Korunmuş	DMD
2-7 dup (x2)	Korunmuş	DMD
45 del (x2)	Bozulmuş	BMD
45-54 del (x2)	Bozulmuş	BMD
3-7 del (x2)	Bozulmuş	BMD
60-74 dup	Bozulmuş	BMD
18-12 dup	Bozulmuş	BMD

4.7. Kardiyomyopati saptanan olgular

Olgularımızdan kardiyomyopatisi olduğunu öğrendiklerimiz Tablo 3'te gösterilmiştir. En erken bulgu veren olgunun ekzon 28-43 duplikasyonu mevcut olup, 14 aylıkken bulgusu mevcuttu. Olguların pek çoğunun tam olarak kaç yaşından itibaren bulguları olduğuna ulaşamadık. Ancak ekzon 50-54, 50-51, 10-12 delesyonlu olgularımızın 8 yaşındayken bulguları olduğunu ifade edebiliriz.

Tablo 3. Kardiyomyopati olguları ve genotipleri

Mutasyon	Fenotip	Tanısı	Tanı alma yaşı/ veri yaşı
2-7 dup	BMD	Dilate KMP; EF: %27	?/13 yaş
5-7 dup	?	Dilate KMP	14 yaş
3-16 dup	BMD	LV global hipokinetik	?/32 yaş
8, 9, 11 dup	DMD	Kalp yetmezliği	?/15 yaş
28-43 dup	?	Dilate KMP	?/14 ay
3-4 del	BMD	EF: %45	?/23 yaş
8-13 del	DMD	Kalp yetmezliği	?/13 yaş
8-21 del	DMD	Dilate KMP	?/10 yaş
10-12 del	DMD	Ace inhibitörü kullanıyor	?/8 yaş
18-21 del	DMD	LV hafif dilatasyon	12 yaş
45-47 del	BMD	Dilate KMP	22 yaş
45-47 del	BMD	LV lokal duvar hareket kusuru	?/21 y
45-52 del	DMD	LV Hipertrofik, EF:%32	?/25 yaş
45-52 del	DMD	Kardiyak etkilenme	12 yaş
45-53 del	BMD	Sol ventrikül diyastolik disfonksiyon	?/32 yaş
45-55 del	BMD	LV diastolik disfonksiyonu	?/57 yaş
50-54 del	?	LV dilatasyonu	8 yaş
51-54 del	DMD	Kalp tutulumu	?/13 yaş
51-54 del	DMD	LV hafif dilate	?/8 yaş

4.8. “Manifest” Taşıyıcılar

Altı kadın olgumuzda klinik olarak bulgular mevcuttu (Tablo 4). İki olgumuzun bulguları daha erken yaşlarda ortaya çıkmıştı. Şikayetleri 14 aylıkken başlamış olan olgunun ekzon 45-48 ve 58 delesyonu mevcuttu, diğer olgumuzda ise bulgular 3 yaşında başlamıştı ve olgu ekzon 41 delesyonuna sahipti. Kas biyopsisi ile distrofin boyaması iki olgumuzda mevcuttu ve bir olguda bazı kas liflerinde sarkolemmal distrofin kaybı, diğerinde belirgin soluk boyanma vardı. Olgulardan ikisinin karyotip analizi mevcuttu ve 46,XX ile uyumluydu.

Tablo 4. “Manifest” taşıyıcı olgular

Mutasyon	Şikayet	Başvuru/ Şikayet yaşı	Kas biyopsisi	CK düzeyi (U/L)
8-12 del	Yorulma, ayaklarda güçsüzlük	39/29	Distrofin boyaması uygulanmamış	445
41 del	Oturduğu yerden kalkarken zorlanma	3	?	?
45-48 ve 58 del	Sık düşme	1,5/14 ay	Distrofin 1,2,3, ile belirgin soluk boyanma	?
51 del	Sık düşme	27/23	?	2988
8,9 dup	Parmak ucunda yürüme	26/7	Bazı kas liflerinde sarkolemmal distrofin kaybı	887
55-59 dup	Merdiven çıkarken kas ağrıları	19/?	Distrofin boyama yapılmamış	2789

4.9. Gonadal Mozaiklik Tespit Edilen Aileler

Toplamda 5 ailede gonadal mozaiklik tespit edildi. Bu ailelerdeki mutasyonların biri nokta mutasyonu diğerleri delesyondur. Mutasyonlar şöyledir: ekzon 45 delesyonu, 45-47 delesyonu, 47-50 delesyonu ve 50 delesyonu ve ekzon 56’da saptanan dur kodonu oluşturan c.8357G>A (rs863225012) mutasyonu. Ekzon 56’da saptanan nokta mutasyonunu olgumuz %7 oranında mozaik olarak taşıyordu.

4.10. Psikiyatrik Değerlendirme

4.10.1. IQ ölçümleri

Yirmi DMD (%69), 9 BMD (%21) olmak üzere 29 olgunun WISC-R testi ile

IQ değerleri ölçüldü. Olguların sözel IQ puan ortalamaları 80,48, performans IQ puan ortalamaları 89,82, total IQ puan ortalamaları ise 84,54 olarak tespit edildi. Duchenne musküler distrofi olgularının ortalama IQ puanı 79,9, BMD olgularının 94,2 saptandı DMD grubunda sözel IQ 75, performans IQ ise 86,6 tespit edildi. Olgulardan 7'sinde zihinsel yetersizlik (%24,1) tespit edildi. Becker musküler distrofi olgularının hiçbirinde zihinsel yetersizliğe rastlanmadı. Olgulardan 6'sı hafif zihinsel yetersizlik tanısı alırken, yalnızca 61-79 delesyona sahip olgunun orta zihinsel yetersizliği vardı. Olguların fenotipine göre IQ puan ortalamalarını karşılaştırdığımızda DMD grubunun sözel ve total IQ puanlarının BMD grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulduk ($p<0.05$). Duchenne musküler distrofi olgularını beyinde eksprese olan Dp140 izoformunun etkilenme durumuna göre iki gruba ayırdık. İki grubun IQ değerlerini karşılaştırdık, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık ($p>0.05$) (Tablo 5). Ayrıca zihinsel yetersizlik bulunması ile Dp140 izoformunun etkilenmesi arasındaki ilişkiyi inceledik ama anlamlı bir fark bulamadık. Zihinsel yetersizlik Dp140 izoformu korunmuş grupta 1(1/5, %20) olguda saptanırken etkilenmiş grupta 6 (6/24, %25) olguda tespit edildi.

Tablo 5. Dp140 izoform ekspresyonuna göre DMD olgularının IQ puan ortalamaları

IQ	Dp140 izoformu	Kişi sayısı	Ortalama	SD
Sözel IQ	Korunmuş	5	71,6	10,383
	Etkilenmiş	15	76,13	21,233
Performans IQ	Korunmuş	5	85,6	11,261
	Etkilenmiş	14	87	14,946
Toplam IQ	Korunmuş	5	76,6	9,397
	Etkilenmiş	14	81,14	18,455

4.10.2. Saptanan Psikopatolojiler

Yirmi sekiz olguya ise eşlik edebilen ek psikiyatrik hastalıklar açısından SCID uygulandı. Olguların 12'sinde (12/28, %42,9) majör depresif bozukluk (MDB), 5'inde DEHB (5/28, %17,9), 3'ünde (3/28, %10,7) yaygın anksiyete bozukluğu (YAB) saptandı. Birer olguda ise OKB ve özgül fobi vardı. Ayrıca 5 olgu birden fazla tanıya sahipti (Tablo 6). Duchenne musküler distrofi grubunda DEHB oranı %26,3 olarak tespit edildi. Becker musküler distrofi olgularında DEHB gözlenmedi. Dp140 ekspresyonunun etkilenme durumuna göre gruplara ayırdığımız DMD olgularını DEHB açısından karşılaştırdık ama anlamlı bir fark bulamadık. Dp140 izoformunun korunduğu grupta 5 olgudan 1'inde DEHB saptanırken, etkilenmiş grupta 4 (4/14) olguda saptadık.

Tablo 6. Psikiyatrik değerlendirmeye alınan olguların mutasyonları, ek tanıları ve zihinsel durumları

Mutasyon	Fenotip	Psikiyatrik Hastalık	Zihinsel durum
51-55 del	DMD	DEHB	
50-54 del	DMD	DEHB/MDB	
46-49 del	DMD	DEHB/YAB	
18-21 del	DMD	DEHB	Hafif zihinsel yetersizlik
45-52 del	DMD	DEHB/MDB	Hafif zihinsel yetersizlik
45-47 del	BMD	MDB	
45-48 del	BMD	MDB/YAB	
45-54 del	DMD	MDB	
45-47 del	BMD	MDB	
45-54 del	DMD	MDB	Hafif zihinsel yetersizlik
45-54 del	DMD	MDB	Hafif zihinsel yetersizlik
45 del	DMD	MDB	
45 del	BMD	MDB	
8-34 del	DMD	MDB	
45-47 del	BMD	MDB	
45-55 del	BMD	YAB/Özgöl Fobi	
46-47 del	DMD	OKB	
10-12 del	DMD	-	
50-52 del	DMD	-	
48-49 del	BMD	-	
8-16 del	DMD	-	
45-48 del	BMD	-	
48-55 del	BMD	-	
49-52 del	DMD	-	
49-52 del	DMD	-	
3-41 del	DMD	-	
50-54 del	DMD	-	Hafif zihinsel yetersizlik
45-52 del	DMD	?	Hafif zihinsel yetersizlik
61-79 del	DMD	-	Orta zihinsel yetersizlik

5. TARTIŞMA

Bu çalışmamızda MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon tespit ettiğimiz birbirinden bağımsız 334 distrofinopatili olguya ait verileri paylaştık. Bir ya da daha fazla ekzon içeren 293 delesyon, 41 duplikasyon saptadık. Delesyon oranımızı %87,7, duplikasyon oranımızı ise %12,3 olarak bulduk. Literatürde özellikle delesyonlar için ekzon 44-53 ve ekzon 2-20 sıcak bölge olarak adlandırılmaktadır. Bizde de ekzon 45-54 bölgesi delesyonlarda sıcak bölgeydi. Ancak, Yang ve ark., tarafından yapılan çalışmayla uyumlu (18) olarak, proksimal sıcak nokta tespit edemedik. Ekzon 45 öncesinde homojene yakın bir dağılım göstermekteydiler. *DMD* geninin bilinen allelik heterojenitesiyle paralel olarak 96 farklı delesyon paterni tespit ettik. Literatürle uyumlu olarak, delesyonlar içinde en sık tek ekzon delesyonları tespit ettik. İki farklı yayında delesyonların %24 oranında tek ekzon delesyonu olduğu bildirilmişti (18, 160), bizde de bu oranı %18,4 olarak bulduk. Tek ekzon delesyonları içinde en sık ekzon 45 delesyonu (13/54, %24,1) saptadık. Onu sırasıyla ekzon 44 (12/54, %22,2), ekzon 51 (9/54, %16,7) izliyordu. Başka çalışmalarda ekzon 45 (160), ekzon 51 (18) en sık tek ekzon delesyonu olarak bildirilmişti.

Duchenne musküler distrofi olgularındaki en sık delesyon paternleri ekzon 45-50 (n=9), ekzon 44 (n=7), ekzon 48-50 (n=6) ve ekzon 51 (n=6) delesyonlarıydı. Başka bir çalışmada ekzon 45 delesyonu en sık *DMD* delesyon paternini oluşturmuyordu (161). Becker musküler distrofide ise 45-48 (n=20), 45-47 (n=19), 45-55 (n=6) delesyonları en sıklıkta ve delesyonlu *BMD* olgularının %60'ını oluşturmaktaydı. Bu oranda literatürle uyumluydu (161). Duchenne musküler distrofi olgularımızda delesyon oranı %83,3 tespit edilirken *BMD* olgularımızda bu oran %94,9 olarak saptandı. İkisi arasındaki fark literatürle uyumlu olarak (17, 161) istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,013).

Duplikasyona uğrayan ekzonların %45,8'i ekzon 2-20 arasındaydı. Bu bölge duplikasyonlar için sıcak nokta olup literatürle uyumluydu (17, 161). Büyük yeniden düzenlenmeler içerisinde duplikasyon oranımız %12,3 olarak tespit edildi. Bir başka 317 Hint asıllı olgunun değerlendirildiği yayında bu oran %8,2 olarak bulunmuştu (160). "Universal Mutation Database" (UMD)-*DMD* veritabanında ise büyük değişimler arasında duplikasyonların oranı %15 (334/2235), "Leiden Open Variant Database" (LOVD) veritabanında ise %16,6 (1855/11177) olarak bildirilmişti. Olgularımızda 30 farklı duplikasyon paterni gözlemledik. Bunların %63,4'ü yalnızca bir kere gösterilmişti. En sık ekzon 2 duplikasyon paternine (%12,2) rastladık. Literatürdeki büyük serilerdeki sonuçlarla uyumluydu (18, 161). Duchenne musküler distrofi olgularında duplikasyonlar içinde en sık 8-9 duplikasyon paternini gördük (n=4). Becker musküler distrofi olgularındaki her bir duplikasyon paterni farklıydı.

İnsan genomundaki instabilite temelde homolog veya homolog olmayan rekombinasyon olaylarından kaynaklanmaktadır. Tekrarlayan sekanslar ise homolog rekombinasyon için önemli hedef bölgelerini oluşturmaktadır. Guo ve ark. tarafından yapılan çalışmada *DMD* geninin her bir intronunun ortalama %28.27 oranında tekrar elemanları içerdiği bildirilmiş, özellikle de uzun dağılmış nükleer elemanlar (LINEs) olarak adlandırılan yapıların *DMD* gen intronlarındaki anahtar yapılar olduğu vurgulanmıştır (16). Ayrıca mikrohomoji ilişkili replikasyon bağımlı rekombinasyon, homolog olmayan uç birleştirme de olası mekanizmalar olarak düşünülmektedir (162).

Monaco ve ark., 1988 yılında ilk kez çerçeve-kayması hipotezini ortaya atmışlardır. Bu hipoteze göre, fenotip açık okuma çerçevesindeki değişimlerden etkilenmektedir. Bu kurala göre, çerçeve kaymasına yol açıp güdük protein üretimine sebep olan mutasyonlar ağır bir klinik olan DMD ile seyrederken, okuma çerçevesini değiştirmeyen mutasyonlar ise daha hafif olan BMD kliniği ile ilişkilidir (13). Ancak bu hipoteze ters düşecek şekilde, çerçeve kayması delesyonları/duplikasyonları ile giden BMD ya da çerçeve-içi delesyon/duplikasyonları olan DMD olguları mevcuttur. Bizim serimizde DMD olgularının %93,9'u (9/147) okuma çerçevesi kuramına uyarken, BMD olgularında bu oran %89,7 (70/78) olarak tespit edildi. Bu kuralın daha önceden olguların %92'sinde geçerli olduğu bildirilmiş (14), bizim serimizde de bu oranla uyumlu çıkmıştır (%92.5).

Olgularımızdan ikisi ekzon 2-7 duplikasyonuna sahipti. Ekzon 5 delesyonunda kesim mekanizmalarında bozulmalar olduğu, yalnızca ekzon 5'in olmadığı bir RNA yapısından ziyade farklı ekzon atlama mekanizmalarıyla oluşmuş çerçeve kaymasına uğramış transkriptler saptanmıştır (163). Bu olgulardaki mekanizma da kesim mekanizmalarının bozulması olabilir. Bir başka çalışmada da ekzon 2-7 duplikasyonu bildirilen 2 DMD olgusuna rastlanıldı (18). Amino terminal uçtan başlayıp santral rod domaine uzanım gösteren mutasyonlar da DMD kliniği ile ilişkili olabilmektedir. Şayet 3-41, 4-44, 8-21 delesyonu olan olgularımızdaki DMD fenotipi de bu veriyi destekler niteliktedir. Otuz altı ekzonu aşan çerçeve içi delesyonlar ağır bir klinik tablo ile ilişkili bulunmuştur. Çok kısa distrofin molekülünün distrofin ağının yanlış dizilimine sebep olabileceği fikri ortaya atılmıştır (144). Ekzon 10-44 delesyonuna sahip olgumuzda proteinin R1-17 bölgeleri delesyona uğramış olup 35 ekzon etkilenmiştir. Bir başka olgumuzda ise 63-73 delesyonu saptanmıştır. Bu olgumuzda da β -distroglikan yapıya bağlanmada etkili sistein zengin domain ve karboksi terminal domain etkilenimi mevcuttur. Sistein zengin domain etkilenimi olan delesyonlar her zaman DMD ile ilişkili bulunmuştur. Bu domainin distrofin proteinindeki önemini vurgular niteliktedir (142). Ekzon 10-12 delesyonu ve ekzon 10-13 delesyonu için UMD veritabanında iki BMD olgusu bildirilmiştir. Ayrıca ekzon 10-13 delesyonu olup, DMD tanısı olan olgular da literatürde bulunmaktadır (16, 164). Bizim DMD olgularımızdan birinde de ekzon 10-12 delesyonu tespit edildi. Olgunun kas biyopsisinde diffuz distrofin

defekti mevcuttu ve 3 yaşında bulguları vardı. Ekzon 45-48 delesyonu olan bir olgumuzun kas biyopsisinde diffuz distrofin defekti mevcuttu. Olgu rastgele saptanan CK enzim yüksekliği ile 23 aylıkken bize başvurmuştu. Serimizdeki diğer ekzon 45-48 delesyonu olan olguların hepsinde BMD fenotipi mevcuttu. Çin'de yapılan 743 olgunun değerlendirildiği bir başka çalışmada ekzon 45-48 delesyonu 9 DMD ve 2 BMD olgusunda tespit edilmişti (18). UMD veritabanında ise bu delesyon için tanımlanan 152 olgunun hiç birinde DMD fenotipi yoktu.

Ekzon 44'ü çevreleyen delesyonlar geniş bir klinik spektrumla karşımıza çıkabilmektedir (151). Ekzon 44'ün spontan olarak atlandığı bu olgularda gösterilmiş olup, bir miktar çerçeve içi distrofin üretimi sağlamaktadır (152). Becker musküler distrofi olgularımızdan iki olgu ekzon 45-54 delesyonuna sahipti ve iki olguda da ekzon 45 delesyonu mevcuttu. Bu olgularda görülen klinik ekzon 44 atlanmasına sekonder olabilir. Ayrıca IMD fenotipindeki olguların üçünde ekzon 44, 45-52, 45-54 delesyonu tespit edildi.

Ekzon 3-7 delesyonu BMD ya da DMD fenotipiyle sonuçlanabilmektedir. Ekzon 3-7 delesyonu olan bir grup hastada yapılan çalışmada amino terminal uca ve ekzon 8'in 5' ucuna spesifik antikörlerle distrofin saptanamazken, 3' bitimine spesifik antikörlerle distrofin tespit edilmiştir. Bu duruma ekzon 8'de yer alan bir alternatif translasyon başlangıç bölgesinin sebep olduğu ifade edilmiştir (145). İki ekzon 3-7 delesyonlu olgumuzdaki BMD fenotipinde bu mekanizma etkili olmuş olabilir. Olgulardan biri 17 yaşından beri tekerlekli sandalyedeydi, diğer olgumuz ise 13 yaşında hala mobildi ve iki dayısının 20'li yaşlardan sonra yürüyemediği öğrenildi. Bu iki olguya ek olarak iki olgumuzda daha ekzon 3-7 delesyonu mevcuttu. Bu olgulardan biri 10 yaşından beri tekerlekli sandalyedeydi ve diğeri de 10 yaşından beri merdiven çıkamıyordu. Bir başka olgumuzda da 8-12 duplikasyonu mevcuttu ve kas biyopsisinde D1, D2, D3 antikörleri ile fibriller kısmen olumlu boyanmıştı. UMD-DMD veritabanına baktığımızda aynı duplikasyon dört DMD olgusunda tanımlanmıştı. Ekzon 8-13 duplikasyonu olan ise 2 DMD ve 1 IMD olgusu tanımlanmıştı.

Ekzon 74'te ya da daha distalinde ortaya çıkan mutasyonlara hem DMD hem de BMD olgularında rastlanmıştır. Buradaki temel süreçlerden birinin nonsens aracılı mRNA yıkımı (NMD) mekanizmasından kurtulma olabileceği düşünülmektedir. Nitekim ekzon 74'te nokta mutasyonu olan bir BMD olgusundaki olası mekanizmalar üzerinde çalışan araştırmacılar kas biyopsisinde D2 antikörleri ile çok nadir boyanma, D3 antikörleri ile iyi bir boyanma gözlemişlerdir. Normalde yıkımla giden bir mutasyondan beklenmedik bir protein boyanma paterniyle karşılaşmışlar ve D2 ile de hemen hemen boyanma tespit etmedikleri için bunun bir ekzon atlama olayından ziyade NMD mekanizmasından kurtulma olduğunu belirtmişlerdir (165). Nitekim bizim ekzon 60-74 duplikasyonu mevcut olup, kas biyopsisi fokal distrofin defekti ile uyumlu olan olgumuzda da aynı mekanizma bu boyanma paternine neden olmuş olabilir. Olgumuz 19 aylıkken yürüyememe nedeniyle başvurmuştu, ancak takip verilerine sahip değildik. Yukarıda da

bahsedildiği üzere fenotipik değişkenliklerde pek çok mekanizma rol alabilmektedir. Son dönemlerde ayrıca yalnızca intronik kırıkların olmayıp, ekzonik kırıkların da olabildiği gösterilmiştir (166). Ekzon 14-22 çerçeve-içi mutasyonlu bir DMD olgusu, çerçeve dışı mutasyonu olan ekzon 2 ve ekzon 51-55 duplikasyonlu BMD olgularıyla yapılan RNA çalışmalarında genomik profilden bir sapma saptanmaması, tam olarak tanımlanamayan post-transkripsiyonel mekanizmaların protein fonksiyonu üzerine etkisi olduğunu düşündürmektedir (167, 168). Pek çok mekanizma aydınlatılmış olmakla beraber farklı moleküler mekanizmalar zamanla aydınlığa kavuşacaktır. Bu anlamda genotip-fenotip çalışmaları önem arz etmektedir.

Olgularımızdan 5 ailemizde gonadal mozaiklik tespit ettik. Bu oran %5,3 olup, literatürde bildirilen oranla hemen hemen aynıydı (56).

Merkezimizde 2007 yılından itibaren MLPA tekniği uygulanırken , *DMD* geni dizi analizi 2018 yılından itibaren yapılmaktadır. Bu yüzden MLPA negatif tüm olgularımıza dizi analizi yapamadık. Yaptıklarımız arasında ise küçük nokta mutasyonuna sahip 13 olgu tespit ettik. Nokta mutasyonu tespit ettiğimiz olgulardan yalnızca ikisi BMD fenotipine sahipti. Bunlardan biri ekzon 35'te dur kodonu oluşturan mutasyona sahipti, diğerinde ekzon 71'de çerçeve kaymasına neden olan c.10258dupT mutasyonu tespit edildi. Ekzon 71 mutasyonlu olgunun kas biyopsisinde fokal distrofin defekti mevcuttu. Olgu 6,5 yaşında rastgele saptanan CK enzim yüksekliği nedeniyle başvurmuştu. Sekiz yaşında Gowers bulgusu negatifti. Bu değişim LOVD sisteminde ve ClinVar'da kayıtlıydı. Olguların fenotipi ile ilgili bilgilere ulaşılamadı. Diğer olgumuzda 35. ekzonda dur kodonu oluşturan c.5009G>A (p.Trp1670Ter) mutasyonu tespit edildi. Olgumuz 33 yaşında başlayan merdiven çıkamama, oturduğu yerden kalkarken zorlanma şikayetleriyle 35 yaşında başvurmuştu. Aynı mutasyon literatürde 17 yaşında tekerlekli sandalye kullanmaya başlayan bir BMD olgusunda da tanımlanmıştı (169). Ayrıca UMD veritabanında 35. ekzonda p.Arg1666X mutasyonu 6 DMD olgusunda bildirilmekteydi. Ekzon 31'de dur kodonu mutasyonuna sahip bir olguda mutasyonun bir susturucu protein olan hnRNPA1 için yüksek düzeyde spesifik bağlanma bölgesi oluşturarak ekzonik kırılma susturucusu meydana getirdiği gösterilmiş ve distrofin geninde ekzon atlamanın moleküler mekanizması ilk defa gösterilmiştir (148). Bizim olgumuzdaki moleküler mekanizma da bu olabilir. Olgudan kas biyopsisi ile cDNA çalışması bunu aydınlatmamıza yardımcı olabilir.

Yirmi DMD, 9 BMD olgumuza WISC-R testi uyguladık. Duchenne musküler distrofi olgularından 7'sinde zihinsel yetersizlik (%35) tespit ettik. Yapılan farklı çalışmalarda DMD olgularında %23'ten %36.2'ye kadar değişen mental retardasyon sıklığı tespit edilmiştir (6-9). Bizim sonucumuz da bu verilerle benzerlik göstermektedir. Yedi yüz yirmi bir DMD olgusunun değerlendirildiği bir metaanalizde ortalama IQ değeri 82 olarak bulunmuş olup, %20'sinin skoru 70'in altında, %3'ünün ise 50'nin altında saptanmıştır (6). Bizim çalışmamızda DMD olgularının ortalama IQ değeri 79,95 olarak tespit edildi. Bu değer literatürle

uyumluydu. Duchenne musküler distrofi olgularımızın sözel IQ'larının performans IQ'larına göre daha fazla etkilendiği gözleldik (Sözel IQ:75; PIQ:86,6). Bu durum literatürdeki verilerle paraleldi (6). Becker musküler distrofi olgularımızın hiçbirinde zihinsel yetersizliğe rastlamadık ve ortalama IQ değerleri 94,2 olarak saptandı. Daha önce 23 BMD olgusunda yapılan çalışmayla benzer ortalama gösterdi, ancak o çalışmada %13 zihinsel yetersizlik tespit edilmişti (170). Ayrıca Daoud ve ark., tarafından yapılan çalışmada tüm distrofin izoformlarının etkileneş olduğu 12 BMD olgusunun 5'inde zihinsel yetersizlik tespit edilmişti, bu noktada Dp71 etkileniminin BMD olgularındaki zihinsel yetersizlikte rolünü vurgulamışlardı (154). Duchenne musküler distrofide Dp140 izoformu etkilenenlerde IQ puanlarını daha düşük saptayan pek çok çalışma mevcuttu (7, 8, 153). Bu olguları beyin izoformu etkilenenler ve etkilenmeyenler olarak iki gruba ayırdığımızda gruplardaki IQ ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulamadık ($p>0.05$). Bu sonucumuz literatürle uyumsuzdu. Ayrıca Dp71 etkileniminin bilişsel yetersizliği ağırlaştırdığı ve IQ skorunu 2 SD aşağı çektiği bulunmuştur (154). Olgularımızdan yalnız bir tanesinde Dp71 izoformu etkilenmiş olup, ekzon 61-79 delesyonu mevcuttu. Zihinsel yetersizliği olan olguların diğerlerinin etkilenimi hafif düzeydeyken sadece o olgumuzda orta düzeyde etkilenim saptadık. İstatistiksel anlamlılık ifade edemesek de bu olgumuz literatürdeki veriyle uyumluydu.

Ayrıca zihinsel yetersizliğe ek olarak DMD olgularında DEHB, OSB, OKB sıklığı da topluma göre artmış olarak bulunmuştur. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu için %11.7'den %32'ye kadar değişen sıklıklar bulunmuştur (9, 10). Otizm spektrum bozukluğu için sıklıklar ise %3.1'den %21'e kadar değişmektedir (7, 8, 10, 11). Obsesif kompulsif bozukluk sıklığı ise bir çalışmada %4.8 olarak saptanmıştır (10). Dünya genelinde DEHB sıklığı %6.4 (171) olarak bildirilmekle beraber, ülkemizde %8.1 (172), %8.6 (173), %13 (174) oranları tespit edilmiştir.

Duchenne musküler distrofi olgularından 5'inde DEHB tespit ettik (%26,3). Bir olgumuza yalnızca WISC-R uygulanabildiği için onun verilerine sahip değildik. Seksen yedi DMD olgusunun değerlendirmeye alındığı çok merkezli bir çalışmada olguların %26'sında hiperaktivite, %44'ünde dikkat eksikliği tespit edilmiştir. Ayrıca bu seride olguların %21'ine OSB tanısı konmuştur (8). Bizim serimizde OSB tanısı hiç konmamıştır. Pane ve ark., tarafından 103 DMD olgusunda yapılan çalışmada ise DEHB tanısı olguların %24.6'sında tespit edilmiştir, bizim serimizdeki sonuçlar bu çalışmayla oldukça benzerdi ve ülkemizdeki ve dünya genelindeki genel popülasyon çalışmalarına oranla DMD gurubunda DEHB sıklığını daha fazla tespit ettik.

Duchenne musküler distrofide prenatal tanı ya da preimplantasyon genetik tanı mümkündür. Bizim serimizde olgularımızın %21'inde ailede DMD öyküsü mevcuttu. Bu vakalardan bir kısmının genetik danışmanlık hizmetlerinden yeterince faydalanamaması ailesel vakaları görmemizde etkili oluyor olabilir. Ülkemizde terminasyon fikrine sıcak bakmayıp, preimplantasyon genetik tanıya ekonomik koşullardan dolayı ulaşamayan bir grup olguyla da danışmanlık

sürecinde sıkça karşılaşmaktayız. Bu noktada resmi kurumlarca preimplantasyon genetik tanının bu ailelere sağlık sigortası dahilinde bir seçenek olarak sunulması pek çok aile için yüz güldürücü olabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) Bu çalışma Türk popülasyonunda D/BMD olgularına ait MLPA yöntemi ile elde edilen genotip verilerinin incelendiği en büyük olgu grubunu içermektedir.
- 2) Delesyon oranımız %87,7, duplikasyon oranımız ise %12,3 olarak tespit edilmiştir.
- 3) Olguların 164'ünün (%63,6) annesinde taşıyıcılık mevcutken 94'ünde (%36,4) taşıyıcılık yoktu. Saptanan mutasyonların üçte biri yeni mutasyondur ve bu veri literatürle uyumluydu.
- 4) Delesyon grubunda taşıyıcıların oranı %60,9 (137/225), duplikasyon grubunda ise taşıyıcıların oranı %81,8 (27/33) olarak tespit edildi. Duplikasyon olgularında taşıyıcılık delesyon olgularına göre daha sık görülmekteydi ($p<0.05$).
- 5) On üç distrofinopatili olgumuzda 7'si novel olmak üzere 13 mutasyon tespit edildi. Mutasyonlardan 5'i dur kodonu oluşturan mutasyon, 5'i çerçeve kayması mutasyonu, 3'ü de kesim bölgesi mutasyonuydu.
- 6) Duchenne musküler distrofi olgularının %79'u sporadikken, BMD olgularında sporadik vakaların oranı %63,2 idi. BMD olguları DMD olgularına göre daha fazla ailesellik gösteriyordu ($p<0.05$).
- 7) Olgularımızın %21'inde ailede DMD öyküsü mevcuttu. Bu vakalardan bir kısmının genetik danışmanlık hizmetlerinden yeterince faydalanamamasının ailesel vakaların tekrar görülmesinde etkili olabileceği düşünüldü.
- 8) Toplamda 5 ailede (%5,3) gonadal mozaiklik tespit edildi. Bu bulgu literatürle paraleldi (56).
- 9) Altı kadın olgumuzda klinik olarak bulgular mevcuttu.
- 10) Tanı konan 156 DMD (%65,85), 78 BMD (%32,8), 4 IMD (%1,7) olgusu vardı.
- 11) Duchenne ve Becker musküler distrofi olgularının %7,5'i okuma çerçevesi kuralına uymuyordu. Bu veri literatürle uyumluydu.
- 12) Yirmi DMD (%69), 9 BMD (%21) olmak üzere 29 olgunun WICR-IV testi ile IQ değerleri ölçüldü. Olgulardan 7'sinde zihinsel yetersizlik (%24,1) tespit edildi. Bu oran DMD olgularında %35 olarak bulundu. Becker musküler distrofi olgularının hiçbirinde zihinsel yetersizliğe rastlanmadı.
- 13) Olgulardan 6'sı hafif zihinsel yetersizlik tanısı alırken, yalnızca 61-79 delesyona sahip olgunun orta zihinsel yetersizliği vardı. Olgumuzdaki durum literatürde Dp71 izoformu etkilenen olgularda IQ etkileniminin daha ağır olduğu verisiyle uyumluydu.

- 14) Duchenne musküler distrofide olgularını Dp140 izoformu etkilenenler ve etkilenmeyenler olarak iki gruba ayırdığımızda gruptaki IQ ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0.05$). Bu verimiz literatürle uyumlu değildi. Dp140 izoformu korunan grubun sayısının çok az olması istatistiksel anlamlılığa etki etmiş olabileceği düşünüldü.
- 15) Ülkemizdeki ve dünya genelindeki genel popülasyon çalışmalarına oranla DMD olgu grubunda literatürle uyumlu olarak DEHB sıklığı daha fazla tespit edildi (%26,3).
- 16) Olguların %42,9'unda majör depresif bozukluk tespit edildi. Olgularda depresyon oranının bu denli yüksek olması biz hekimleri bu konuda uyarıcı olmalıdır. Olguların gerekli psikiyatrik destek ve tedaviye ulaşmaları sağlanmalıdır.
- 17) Son olarak vurgulamak isteriz ki henüz tedavisi olmayan, böylesine yıkıcı giden bir hastalıkta prenatal tanı ve genetik danışmanlık ailelere sağlanması gereken olmazsa olmaz hizmetlerdir .

7. KAYNAKLAR

1. Flanigan KM. The muscular dystrophies. *Semin Neurol.* 2012;32(3):255-63.
2. Brandsema JF, Darras BT. Dystrophinopathies. *Semin Neurol.* 2015;35(4):369-84.
3. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE ve ark. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93.
4. Tsuda T. Clinical Manifestations and Overall Management Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol.* 2018;1687:19-28.
5. Ricotti V, Roberts RG, Muntoni F. Dystrophin and the brain. *Dev Med Child Neurol.* 2011;53(1):12.
6. Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM. Involvement of tissues other than skeletal muscle. In: Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM, editors. *Duchenne Muscular Dystrophy.* Fourth ed: Oxford University Press; 2015.
7. Colombo P, Nobile M, Tesei A, Civati F ve ark. Assessing mental health in boys with Duchenne muscular dystrophy: Emotional, behavioural and neurodevelopmental profile in an Italian clinical sample. *Eur J Paediatr Neurol.* 2017;21(4):639-47.
8. Ricotti V, Mandy WP, Scoto M, Pane M ve ark. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol.* 2016;58(1):77-84.
9. Pane M, Lombardo ME, Alfieri P, D'Amico A ve ark. Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in Duchenne muscular dystrophy: phenotype-genotype correlation. *J Pediatr.* 2012;161(4):705-9 e1.
10. Hendriksen JG, Vles JS. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *J Child Neurol.* 2008;23(5):477-81.
11. Wu JY, Kuban KC, Allred E, Shapiro F ve ark. Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder. *J Child Neurol.* 2005;20(10):790-5.
12. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002;359(9307):687-95.
13. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H ve ark. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics.* 1988;2(1):90-5.
14. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S ve ark. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):498-506.
15. Santos R, Goncalves A, Oliveira J, Vieira E ve ark. New variants, challenges and pitfalls in DMD genotyping: implications in diagnosis, prognosis and therapy. *J Hum Genet.* 2014;59(8):454-64.
16. Guo R, Zhu G, Zhu H, Ma R ve ark. DMD mutation spectrum analysis in 613 Chinese patients with dystrophinopathy. *J Hum Genet.* 2015;60(8):435-42.
17. Juan-Mateu J, Gonzalez-Quereda L, Rodriguez MJ, Baena M ve ark. DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135189.

18. Yang J, Li SY, Li YQ, Cao JQ ve ark. MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Med Genet*. 2013;14:29.
19. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP ve ark. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(11):1231-4.
20. Flanigan KM. Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol Clin*. 2014;32(3):671-88, viii.
21. Warburg M, Moller HU. Dystrophy: a revised definition. *J Med Genet*. 1989;26(12):769-71.
22. Meryon E. On fatty degeneration of the voluntary muscles. *Lancet*. 1851;2:588-89.
23. Meryon E. On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles. *Med Chir Trans*. 1852;35:73-84 1.
24. Duchenne GBA. De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérotique. *Archives Générales de Médecine* 1868;11:5-25, 179-209, 305-21, 421-43, 552-88 .
25. Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, Flanigan KM ve ark. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2012;71(3):304-13.
26. Darras BT M-SC, Hinton V, Kunkel LM. Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood and Adolescence: A Clinician's Approach. In: Darras BT JHJ, Ryan MM, De Vivo DC editor. *Dystrophinopathies*. 2nd ed. ed. San Diego, CA: Academic Press; 2015.
27. Bushby KM. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*. 1999;8(10):1875-82.
28. Wein N, Alfano L, Flanigan KM. Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(3):723-42.
29. Becker PE KF. Eine neue X-chromosomale Muskeldystrophie. *Arch Psychiatr Nervenkrank*. 1955(193):427-48.
30. Worton RG TM. Genetics Of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Genet*. 1988;22:601-29.
31. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP ve ark. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50(3):509-17.
32. Romitti PA, Zhu Y, Puzhankara S, James KA ve ark. Prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophies in the United States. *Pediatrics*. 2015;135(3):513-21.
33. Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Koyama J ve ark. Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years. *Eur Neurol*. 1999;42(3):145-9.
34. Heald A, Anderson LV, Bushby KM, Shaw PJ. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*. 1994;44(12):2388-90.
35. Sunohara N, Arahata K, Hoffman EP, Yamada H ve ark. Quadriceps myopathy: forme fruste of Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 1990;28(5):634-9.
36. Minetti C, Tanji K, Chang HW, Medori R ve ark. Dystrophinopathy in two young boys with exercise-induced cramps and myoglobinuria. *Eur J Pediatr*. 1993;152(10):848-51.

37. Melis MA, Cau M, Muntoni F, Mateddu A ve ark. Elevation of serum creatine kinase as the only manifestation of an intragenic deletion of the dystrophin gene in three unrelated families. *Eur J Paediatr Neurol*. 1998;2(5):255-61.
38. McCaffrey T, Guglieri M, Murphy AP, Bushby K ve ark. Cardiac involvement in female carriers of duchenne or becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2017;55(6):810-8.
39. Mercier S, Toutain A, Toussaint A, Raynaud M ve ark. Genetic and clinical specificity of 26 symptomatic carriers for dystrophinopathies at pediatric age. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(8):855-63.
40. Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM. Confirmation of the diagnosis. In: Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM, editors. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Fourth ed: Oxford University Press; 2015. p. 54.
41. Hoogerwaard EM, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC ve ark. Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study. *Lancet*. 1999;353(9170):2116-9.
42. Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM. Differential diagnosis. In: Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM, editors. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Fourth ed: Oxford University Press; 2015. p. 89-90.
43. Viggiano E, Ergoli M, Picillo E, Politano L. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet*. 2016;135(7):685-98.
44. Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR ve ark. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci*. 1991;102(2):190-6.
45. Moat SJ, Bradley DM, Salmon R, Clarke A ve ark. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur J Hum Genet*. 2013;21(10):1049-53.
46. McMillan HJ, Gregas M, Darras BT, Kang PB. Serum transaminase levels in boys with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2011;127(1):e132-6.
47. Rosales XQ, Chu ML, Shilling C, Wall C ve ark. Fidelity of gamma-glutamyl transferase (GGT) in differentiating skeletal muscle from liver damage. *J Child Neurol*. 2008;23(7):748-51.
48. Falzarano MS, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules*. 2015;20(10):18168-84.
49. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D ve ark. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
50. Okizuka Y, Takeshima Y, Awano H, Zhang Z ve ark. Small mutations detected by multiplex ligation-dependent probe amplification of the dystrophin gene. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009;13(3):427-31.
51. del Gaudio D, Yang Y, Boggs BA, Schmitt ES ve ark. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy: enhanced detection of dystrophin gene rearrangements by oligonucleotide array-comparative genomic hybridization. *Hum Mutat*. 2008;29(9):1100-7.

52. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002;82(2):291-329.
53. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731-40.
54. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 1990;86(1):45-8.
55. Zhang K, Yang X, Lin G, Han Y ve ark. Molecular genetic testing and diagnosis strategies for dystrophinopathies in the era of next generation sequencing. *Clin Chim Acta.* 2019;491:66-73.
56. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2016;53(3):145-51.
57. Haldane JB. The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935. *J Genet.* 2004;83(3):235-44.
58. Helderma-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, Houwing-Duistermaat JJ ve ark. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2009;75(5):465-72.
59. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers AL, Takata RI ve ark. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet.* 1992;51(5):1150-5.
60. Echigoya Y, Lee J, Rodrigues M, Nagata T ve ark. Mutation types and aging differently affect revertant fiber expansion in dystrophic mdx and mdx52 mice. *PLoS One.* 2013;8(7):e69194.
61. Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A ve ark. Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. *Neurology.* 1989;39(8):1011-7.
62. Lindenbaum RH, Clarke G, Patel C, Moncrieff M ve ark. Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *J Med Genet.* 1979;16(5):389-92.
63. Davies KE, Forrest S, Smith T, Kenwick S ve ark. Molecular analysis of human muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 1987;10(3):191-9.
64. Brown CS, Pearson PL, Thomas NS, Sarfarazi M ve ark. Linkage analysis of a DNA polymorphism proximal to the Duchenne and Becker muscular dystrophy loci on the short arm of the X chromosome. *J Med Genet.* 1985;22(3):179-81.
65. Davies KE, Pearson PL, Harper PS, Murray JM ve ark. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(8):2303-12.
66. Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L ve ark. Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1982;300(5887):69-71.
67. Hodgson S, Hart K, Walker A, Cole C ve ark. DNA deletion in boy with Becker muscular dystrophy. *Lancet.* 1986;1(8486):918.
68. Kingston HM, Thomas NS, Pearson PL, Sarfarazi M ve ark. Genetic linkage between Becker muscular dystrophy and a polymorphic DNA sequence on the short arm of the X chromosome. *J Med Genet.* 1983;20(4):255-8.

69. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Determination of the exon structure of the distal portion of the dystrophin gene by vectorette PCR. *Genomics*. 1992;13(4):942-50.
70. Monaco AP, Walker AP, Millwood I, Larin Z ve ark. A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*. 1992;12(3):465-73.
71. Coffey AJ, Roberts RG, Green ED, Cole CG ve ark. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics*. 1992;12(3):474-84.
72. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53(2):219-28.
73. Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1992;117(5):997-1005.
74. Ervasti JM. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13591-4.
75. Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(4):1008-12.
76. Broderick MJ, Winder SJ. Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin. *Adv Protein Chem*. 2005;70:203-46.
77. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*. 1990;265(8):4560-6.
78. Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol*. 1996;135(3):661-72.
79. Hemmings L, Kuhlman PA, Critchley DR. Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *J Cell Biol*. 1992;116(6):1369-80.
80. Yamashita K, Suzuki A, Satoh Y, Ide M ve ark. The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):812-7.
81. Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT ve ark. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2009;119(3):624-35.
82. Adams ME, Odom GL, Kim MJ, Chamberlain JS ve ark. Syntrophin binds directly to multiple spectrin-like repeats in dystrophin and mediates binding of nNOS to repeats 16-17. *Hum Mol Genet*. 2018;27(17):2978-85.
83. Stone MR, O'Neill A, Catino D, Bloch RJ. Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol Biol Cell*. 2005;16(9):4280-93.
84. Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM ve ark. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(15):5723-8.
85. Le Rumeur E, Fichou Y, Pottier S, Gaboriau F ve ark. Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids. Evidence of a close

- proximity between tryptophan residues and lipids. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5993-6001.
86. Le Rumeur E, Winder SJ, Hubert JF. Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(9):1713-22.
 87. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS ve ark. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27305-10.
 88. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 1989;338(6212):259-62.
 89. Ilsley JL, Sudol M, Winder SJ. The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal*. 2002;14(3):183-9.
 90. Rentschler S, Linn H, Deininger K, Bedford MT ve ark. The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem*. 1999;380(4):431-42.
 91. Zhao J, Kodippili K, Yue Y, Hakim CH ve ark. Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Hum Mol Genet*. 2016;25(17):3647-53.
 92. Ponting CP, Blake DJ, Davies KE, Kendrick-Jones J ve ark. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(1):11-3.
 93. Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6605-10.
 94. Ayalon G, Davis JQ, Scotland PB, Bennett V. An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell*. 2008;135(7):1189-200.
 95. Ayalon G, Hostettler JD, Hoffman J, Kizhatil K ve ark. Ankyrin-B interactions with spectrin and dynactin-4 are required for dystrophin-based protection of skeletal muscle from exercise injury. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7370-8.
 96. Bhosle RC, Michele DE, Campbell KP, Li Z ve ark. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346(3):768-77.
 97. Rezniczek GA, Konieczny P, Nikolic B, Reipert S ve ark. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan. *J Cell Biol*. 2007;176(7):965-77.
 98. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE ve ark. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(4):133-5.
 99. Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS ve ark. Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem*. 1995;270(10):4975-8.
 100. Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12413-8.
 101. Ervasti JM. Structure and function of the dystrophin-glycoprotein complex. Georgetown, TX: Landes Bioscience; 2006.
 102. Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*. 1993;122(4):809-23.
 103. Talts JF, Andac Z, Gohring W, Brancaccio A ve ark. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides,

- alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J*. 1999;18(4):863-70.
104. Bowe MA, Deyst KA, Leszyk JD, Fallon JR. Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron*. 1994;12(5):1173-80.
 105. Wright KM, Lyon KA, Leung H, Leahy DJ ve ark. Dystroglycan organizes axon guidance cue localization and axonal pathfinding. *Neuron*. 2012;76(5):931-44.
 106. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA ve ark. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 1992;355(6362):696-702.
 107. Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J ve ark. A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*. 2001;154(2):435-45.
 108. Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M ve ark. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci*. 2008;11(8):923-31.
 109. Di Stasio E, Sciandra F, Maras B, Di Tommaso F ve ark. Structural and functional analysis of the N-terminal extracellular region of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;266(1):274-8.
 110. Brown SC, Winder SJ. Dystroglycan and dystroglycanopathies: report of the 187th ENMC Workshop 11-13 November 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(7):659-68.
 111. Holt KH, Campbell KP. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem*. 1998;273(52):34667-70.
 112. Crosbie RH, Lebakken CS, Holt KH, Venzke DP ve ark. Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol*. 1999;145(1):153-65.
 113. Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC ve ark. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31221-4.
 114. Peter AK, Marshall JL, Crosbie RH. Sarcospan reduces dystrophic pathology: stabilization of the utrophin-glycoprotein complex. *J Cell Biol*. 2008;183(3):419-27.
 115. Marshall JL, Chou E, Oh J, Kwok A ve ark. Dystrophin and utrophin expression require sarcospan: loss of alpha7 integrin exacerbates a newly discovered muscle phenotype in sarcospan-null mice. *Hum Mol Genet*. 2012;21(20):4378-93.
 116. Bhat HF, Adams ME, Khanday FA. Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(14):2533-54.
 117. Wagner KR, Cohen JB, Haganir RL. The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. *Neuron*. 1993;10(3):511-22.
 118. Nakamori M, Takahashi MP. The role of alpha-dystrobrevin in striated muscle. *Int J Mol Sci*. 2011;12(3):1660-71.
 119. Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M ve ark. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet*. 2000;9(7):1033-40.

120. Nakamori M, Kimura T, Kubota T, Matsumura T ve ark. Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology*. 2008;70(9):677-85.
121. Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*. 1975;25(12):1111-20.
122. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM ve ark. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3710-4.
123. Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem*. 1995;118(5):959-64.
124. Cullen MJ, Fulthorpe JJ. Stages in fibre breakdown in Duchenne muscular dystrophy. An electron-microscopic study. *J Neurol Sci*. 1975;24(2):179-200.
125. Vallejo-Illarramendi A, Toral-Ojeda I, Aldanondo G, Lopez de Munain A. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med*. 2014;16:e16.
126. Bodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology*. 1978;28(5):439-46.
127. Allen DG, Whitehead NP. Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(3):290-4.
128. Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(1):1-5.
129. Niebroj-Dobosz I, Kornguth S, Schutta HS, Siegel FL. Elevated calmodulin levels and reduced calmodulin-stimulated calcium-ATPase in Duchenne progressive muscular dystrophy. *Neurology*. 1989;39(12):1610-4.
130. Kyrychenko V, Polakova E, Janicek R, Shirokova N. Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy. *Cell Calcium*. 2015;58(2):186-95.
131. Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(7):657-62.
132. Kumar A, Boriek AM. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J*. 2003;17(3):386-96.
133. Reid MB, Li YP. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2001;171(3):225-32.
134. Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*. 2004;18(6):676-82.
135. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53.
136. Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol*. 2001;155(1):123-31.
137. Ieronimakis N, Hays A, Prasad A, Janebodin K ve ark. PDGFRalpha signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol*. 2016;240(4):410-24.

138. Rebolledo DL, Kim MJ, Whitehead NP, Adams ME ve ark. Sarcolemmal targeting of nNOSmu improves contractile function of mdx muscle. *Hum Mol Genet.* 2016;25(1):158-66.
139. Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM. Pathogenesis. In: Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM, editors. *Duchenne Muscular Dystrophy*: Oxford University Press; 2015. p. 181-2.
140. Chang NC, Chevalier FP, Rudnicki MA. Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends Mol Med.* 2016;22(6):479-96.
141. Angelini C, Fanin M, Freda MP, Martinello F ve ark. Prognostic factors in mild dystrophinopathies. *J Neurol Sci.* 1996;142(1-2):70-8.
142. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ ve ark. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve.* 2006;34(2):135-44.
143. Matsumura K, Burghes AH, Mora M, Tome FM ve ark. Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J Clin Invest.* 1994;93(1):99-105.
144. Fanin M, Freda MP, Vitiello L, Danieli GA ve ark. Duchenne phenotype with in-frame deletion removing major portion of dystrophin rod: threshold effect for deletion size? *Muscle Nerve.* 1996;19(9):1154-60.
145. Winnard AV, Mendell JR, Prior TW, Florence J ve ark. Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant fibers in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms of dystrophin production. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):158-66.
146. Gurvich OL, Maiti B, Weiss RB, Aggarwal G ve ark. DMD exon 1 truncating point mutations: amelioration of phenotype by alternative translation initiation in exon 6. *Hum Mutat.* 2009;30(4):633-40.
147. Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC ve ark. Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Hum Mutat.* 2007;28(2):183-95.
148. Disset A, Bourgeois CF, Benmalek N, Claustres M ve ark. An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Hum Mol Genet.* 2006;15(6):999-1013.
149. Rafael JA, Cox GA, Corrado K, Jung D ve ark. Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations. *J Cell Biol.* 1996;134(1):93-102.
150. Bies RD, Caskey CT, Fenwick R. An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *J Clin Invest.* 1992;90(2):666-72.
151. Pane M, Mazzone ES, Sormani MP, Messina S ve ark. 6 Minute walk test in Duchenne MD patients with different mutations: 12 month changes. *PLoS One.* 2014;9(1):e83400.
152. van den Bergen JC, Ginjaar HB, Niks EH, Aartsma-Rus A ve ark. Prolonged Ambulation in Duchenne Patients with a Mutation Amenable to Exon 44 Skipping. *J Neuromuscul Dis.* 2014;1(1):91-4.
153. Wingeier K, Giger E, Strozzi S, Kreis R ve ark. Neuropsychological impairments and the impact of dystrophin mutations on general cognitive

- functioning of patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Neurosci.* 2011;18(1):90-5.
154. Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I ve ark. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 2009;18(20):3779-94.
 155. Mercuri E, Quinlivan, R.C., Tuffery-Giraud, S., editor Early Diagnosis and Treatment – The Use of Ataluren in the Effective Management of Duchenne Muscular Dystrophy.2018.
 156. Mah JK. An Overview of Recent Therapeutics Advances for Duchenne Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol.* 2018;1687:3-17.
 157. McNally EM, Wyatt EJ. Mutation-Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: Antisense Treatment Arrives in the Clinic. *Circulation.* 2017;136(11):979-81.
 158. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research. Geneva: World Health Organization 1993 1993.
 159. Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U ve ark. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1997;36(7):980-8.
 160. Vengalil S, Preethish-Kumar V, Polavarapu K, Mahadevappa M ve ark. Duchenne Muscular Dystrophy and Becker Muscular Dystrophy Confirmed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification: Genotype-Phenotype Correlation in a Large Cohort. *J Clin Neurol.* 2017;13(1):91-7.
 161. Tuffery-Giraud S, Beroud C, Leturcq F, Yaou RB ve ark. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat.* 2009;30(6):934-45.
 162. Marey I, Ben Yaou R, Deburgrave N, Vasson A ve ark. Non Random Distribution of DMD Deletion Breakpoints and Implication of Double Strand Breaks Repair and Replication Error Repair Mechanisms. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3(2):227-45.
 163. Gualandi F, Trabanelli C, Rimessi P, Calzolari E ve ark. Multiple exon skipping and RNA circularisation contribute to the severe phenotypic expression of exon 5 dystrophin deletion. *J Med Genet.* 2003;40(8):e100.
 164. Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D ve ark. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1. Trends across the clinical groups. *J Med Genet.* 1993;30(9):728-36.
 165. Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet.* 2001;109(4):402-7.
 166. Wei X, Dai Y, Yu P, Qu N ve ark. Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):110-8.
 167. Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, McIntyre O ve ark. Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Hum Mutat.* 2008;29(5):728-37.

168. Gualandi F, Neri M, Bovolenta M, Martoni E ve ark. Transcriptional behavior of DMD gene duplications in DMD/BMD males. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E310-9.
169. Flanigan KM, Ceco E, Lamar KM, Kaminoh Y ve ark. LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013;73(4):481-8.
170. Young HK, Barton BA, Waisbren S, Portales Dale L ve ark. Cognitive and psychological profile of males with Becker muscular dystrophy. *J Child Neurol.* 2008;23(2):155-62.
171. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J ve ark. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry.* 2007;164(6):942-8.
172. Ersan EE, Dogan O, Dogan S, Sumer H. The distribution of symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder in school age children in Turkey. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2004;13(6):354-61.
173. Gul N, Tiryaki, A., Kultur, S. E. C., Topbas, M., Ak, I. . Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder and comorbid disruptive behavior disorders among school age children in Trabzon. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology.* 2010;20(1):50-6.
174. Ercan ES, Kandulu R, Uslu E, Ardic UA ve ark. Prevalence and diagnostic stability of ADHD and ODD in Turkish children: a 4-year longitudinal study. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health.* 2013;7(1):30.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3666-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Distrofinopatili Ailelerde Genotip ve Fenotip İlişkisinin Ayrıntılandırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Ayfer ÜLGENALP Tıbbi Genetik A.D.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/28-32	Tarih:07.12.2017
	Prof.Dr.Ayfer ÜLGENALP'in sorumlusu olduğu "Distrofinopatili Ailelerde Genotip ve Fenotip İlişkisinin Ayrıtlandırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

EK 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Projenin adı:

Distrofinopatili Ailelerde Genotip ve Fenotip İlişkisinin Ayrıntılandırılması

Araştırmayı destekleyen kurum:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Araştırmacıların adı:

Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP (Sorumlu araştırmacı)

Araş. Gör. Dr. Hande ÖZKALAYCI

Prof. Dr. Uluç YİŞ

Prof. Dr. Aynur AKAY

Prof. Dr. Özlem GİRAY BOZKAYA

Doç. Dr. Elçin BORA

Araş. Gör. Dr. Cemre RANDA

Adresi:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı İnciraltı/İzmir

İlgili doktorun e-mail adresi:

handeozkalayci@gmail.com

İlgili doktorun telefonu:

0536 291 38 68 / 0232 412 2573

Duchenne musküler distrofi (DMD) ve Becker musküler distrofi (BMD) X kromozomu üzerinde yer alan distrofin genindeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal kas hastalıklarıdır. Distrofinopati olarak da adlandırılan bu hastalıklar çocukluk çağının en sık nöromusküler hastalıklarıdır. Olguların yaklaşık 1/3'ünde mental gerilip olmakla beraber dikkat eksikliği /hiperaktivite, obsesif kompulsif hastalık, otizm, emosyonel sorunlar distrofinopatili olgularda daha yüksek oranlarda gözlenmektedir. Distrofin üretimine engel olan mutasyonlar DMD hastalığına yol açarken, azalmış miktarda ya da değişen büyüklükte distrofin proteini üretimine neden olan mutasyonlar BMD ile sonuçlanır.

Genelde DMD tanısı klinik tablo ve kas biyopsisinde immunohistokimyasal boyama ile distrofin ekspresyonunun olmaması ile konulabilir. Ancak, uluslararası rehberlerde genomik düzeyde sorumlu olan mutasyonun tam olarak belirlenmesinin aileye genetik danışmanlık verme, genotip-fenotip korelasyonu, prognoz, yeni tedavilerin geliştirilmesi ve tedavilere uygunluğun saptanması açısından oldukça önem taşıdığı belirtilmektedir.

Bu hastaların moleküler karakterizasyonları, farklı bir tanı oluşturma, uygun klinik izlem sağlama, hasta yönetimi, yeni tedavilere ışık tutması ve genetik danışmanlık açısından oldukça önem

taşımaktadır. Mutasyon karakterizasyonu ve genotip-fenotip korelasyon çalışmaları pek çok ülkede yapılmıştır. Bu çalışmamızda, kendi verilerimizle diğer çalışmalardaki verileri karşılaştırarak literatüre katkı sağlamayı amaçlamaktayız.

Bu çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “**Distrofinopatili Ailelerde Genotip ve Fenotip İlişkisinin Ayrıntılandırılması**”dır. Kabul etmeniz dahilinde Becker/Duchenne musküler distrofi genetik tanısı olan kendinize / çocuğunuza ait Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Pediatrik Nöroloji Bilim Dalı’nda dosya ve kayıt sisteminde mevcut olan veriler kullanılacaktır.

Araştırmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Araştırmacı çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle, bilginiz dâhilinde ya da isteğiniz dışında, sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmaya katılan gönüllü, istediği takdirde araştırma ekibinden, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda görev yapan Dr. Hande Özkalaycı ile araştırma kapsamındaki konulara yönelik ilişki kurabilir. Araştırma giderleri, hastanın kendisine veya sosyal güvenlik kurumlarına hiçbir şekilde yüklenmeyecektir. Araştırmadan elde edilen verilerde gönüllünün kimliği gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacaktır. Araştırma sonuçlarının bilimsel bir dergide yayımlanması halinde dahi, gönüllünün kimliği gizli tutulacaktır. Yukarıda yazılı olan, gönüllüye (bana) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Gerek duyduğum konularda sorular yöneltmeme izin verilerek, bu araştırma hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜNÜN (EBEVEYN)

Adı Soyadı:

Adresi:

Telefonu:

Tarih:

İmzası:

AÇIKLAMAYI YAPAN ARAŞTIRMACININ

Adı Soyadı: Dr. Hande Özkalaycı

Tel: 0536 291 3868 /0 232 412 2573

Tarih:

İmzası:

Ek-3. Etik Kurul Onayı (Psikiyatri)

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/01-192	Tarih:18.01.2019				
	Prof.Dr.Aynur PEKCANLAR AKAY'ın sorumlusu olduğu "Duchenne/Becker Muskuler Distrofi Olguların Aile İşlevselliği ve Davranış Problemleri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ÇALIŞMA ESASI	ETİK KURUL BİLGİLERİ					
	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Can SEVİNÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pinar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	KATILMADI
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK 4. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Psikiyatri)

Ebeveyn İçin

Kronik hastalık neden olduğu psikolojik, sosyal sonuçları ile hem çocuğu hem de aileyi etkilemektedir. Aile bakışında ebeveyn ve çocuklar arasında ortak ilişkiyi göz önüne almak zorunludur. Bir yanda çocuğun sağlık durumu ebeveynin psikolojik durumuna bağlı iken, diğer yanda ebeveynin işlevleri ve sağlıklı olması çocuğun sağlıklı olmasını etkilemektedir. Bu araştırmada, Becker/Duchenne Musküler Distrofin tanılı çocukları olan annelerinin uzun dönemde yaşadıkları stresin etkilerini görmek ve normal data ile karşılaştırarak; nörolojik etkilenmenin, fizik tedavinin, özel eğitimlerin çocuk yetiştirme üzerine annelerde fark yaratıp yaratmadığını ortaya koymak ve anne çocuk ilişkisi işlevselliğini değerlendirmeyi amaçlanmıştır.

Bu araştırmada çocuğunuzla ve sizinle bir görüşme yapılacaktır; hem çocuğunuzdan hem de sizde, size verilen ölçekleri doldurmanız istenecektir. Bu araştırmada yer almanız için öngörülen toplam süre 2 saat kadardır. Araştırmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer araştırmaya katılmaya karar vererseniz imzalamanız için size bu 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' verilecektir. Araştırmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Araştırmacı çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle, bilginiz dâhilinde ya da isteğiniz dışında, sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmaya katılan gönüllü, istediği takdirde araştırma ekibinden, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görev yapan Dr. Serkan TURAN ile araştırma kapsamındaki konulara yönelik ilişki kurabilir. Araştırma giderleri, hastanın kendisine veya sosyal güvenlik kurumlarına hiçbir şekilde yüklenmeyecektir. Araştırmadan elde edilen verilerde gönüllünün kimliği gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacaktır. Araştırma sonuçlarının bilimsel bir dergide yayımlanması halinde dahi, gönüllünün kimliği gizli tutulacaktır. Yukarıda yazılı olan, gönüllüye (bana) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Gerek duyduğum konularda sorular yöneltmeme izin verilerek, bu araştırma hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜNÜN (EBEVEYN)
ARAŞTIRMACININ

AÇIKLAMAYI YAPAN

Adı Soyadı:

Adı Soyadı: Dr. Serkan TURAN

Adresi:

Tel: 232 412 35 51

Telefonu:

Tarih:

Tarih:

İmzası:

İmzası:

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (ÇOCUK VE ERGEN)

Kronik hastalık neden olduğu psikolojik, sosyal sonuçları ile hem çocuğu hem de aileyi etkilemektedir. Aile bakışında ebeveyn ve çocuklar arasında ortak ilişkiyi göz önüne almak zorunludur. Bir yanda çocuğun sağlık durumu ebeveynin psikolojik durumuna bağlı iken, diğer yanda ebeveynin işlevleri ve sağlıklı olması çocuğun sağlıklı olmasını etkilemektedir. Bu araştırmada, Becker/Duchenne Musküler Distrofin tanılı çocukları olan annelerinin uzun dönemde yaşadıkları stresin etkilerini görmek ve normal data ile karşılaştırarak; nörolojik etkilenmenin, fizik tedavinin, özel eğitimlerin çocuk yetiştirme üzerine annelerde fark yaratıp yaratmadığını ortaya koymak ve anne çocuk ilişkisi işlevselliğini değerlendirmeyi amaçlanmıştır.

Bu araştırmada annenle ve seninle bir görüşme yapılacaktır; hem annenden hem de senden size verilen ölçekleri doldurmanız istenecektir.

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen toplam süre 2 saat kadardır. Araştırmaya katılıp katılmama kararı tamamen sana aittir. Eğer araştırmaya katılmaya karar verirsen imzalaman için sana bu 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' verilecektir. Araştırmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsün. Araştırmacı çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle, bilgin dâhilinde ya da isteğin dışında, seni araştırmadan çıkarabilir. Araştırmaya katılan gönüllü, istediği takdirde araştırma ekibinden, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görev yapan Dr. Serkan TURAN ile araştırma kapsamındaki konulara yönelik ilişki kurabilir. Araştırma giderleri, hastanın kendisine veya sosyal güvenlik kurumlarına hiçbir şekilde yüklenmeyecektir. Araştırmadan elde edilen verilerde gönüllünün kimliği gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacaktır. Araştırma sonuçlarının bilimsel bir dergide yayımlanması halinde dahi, gönüllünün kimliği gizli tutulacaktır. Yukarıda yazılı olan, gönüllüye (bana) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Gerek duyduğum konularda sorular yöneltmeme izin verilerek, bu araştırma hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜNÜN (çocuk ve ergen)
ARAŞTIRMACININ

AÇIKLAMAYI YAPAN

Adı Soyadı:

Adı Soyadı: Dr. Serkan TURAN

Adresi:

Tel: 232 412 35 51

Telefonu:

Tarih:

Tarih:

İmzası:

İmzası:

Ek 5. Veri Kayıt Formu

Duchenne/Becker Musküler Distrofi Veri Kayıt Formu

Adı-Soyadı:

Hasta No:

Doğum Tarihi:

T.C Kimlik No:

MLPA analiz sonucu:

Kas biyopsisi sonucu:

Kreatin kinaz enzim düzeyi:

Şikayet başlangıç yaşı:

Başvuru anındaki yaşı:

Başvuru şikayeti:

Gelişim basamakları:

Mental retardasyon/Gelişim testi :

Tekerlekli sandalye bağımlılık yaşı:

Dilate Kardiyomyopati/EKG/EKO:

Konjenital Kalp hastalığı:

Solunum durumu:

Kırık/Skolyoz/Osteoporoz/Ortopedik Komplikasyon:

Malign Hipertermi Öyküsü:

Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu/Otizm/Obsesif Kompulsif
Bozukluk/Emosyonel Sorunlar:

Ek hastalık:

Annenin *DMD* gen analizi: