

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

**DOĞUMSAL KALP ANOMALİLİ ÇOCUKLUK YAŞ GRUBU
HASTALARININ KLİNİK VE GENETİK ANALİZ
SONUÇLARININ RETROSPEKTİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZ
Dr. SERDAR MERMER**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞUZ**

**ANKARA
MART 2018**

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

**DOĞUMSAL KALP ANOMALİLİ ÇOCUKLUK YAŞ GRUBU
HASTALARININ KLİNİK VE GENETİK ANALİZ
SONUÇLARININ RETROSPEKTİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZ
Dr. SERDAR MERMER**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞUZ**

**ANKARA
MART 2018**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

11/04/2018

Adı ve Soyadı	Serdar Mermer
Baba Adı	İbrahim
Doğum Yeri/Tarihi	Ankara/16.05.1971
Diploma Tarihi/Diploma No	30.06.1997/97-011-086
Mezun Olduğu Fakülte	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	4 yıl 6 ay
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "Doğumsal Kalp Anomalili Çocukluk Yaş Grubu Hastalarının Klinik ve Genetik Analiz Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi "

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:

BAŞKAN

Prof.Dr.Meral Yirmibeş Karaoğuz

ÜYE

Prof.Dr.Mehmet Ali Ergün

ÜYE

Doç.Dr.Beyhan Durak Aras

TEŞEKKÜR

2013 yılında asistan doktor olarak başladığım Tıbbi Genetik Anabilim Dalından Uzman doktor olarak ayrılıyorum. Bu yolculukta bana yol gösteren hocalarıma ve yolumda yoldaş olan çalışma arkadaşlarıma tek tek teşekkürü bir borç biliyorum:

Tez hocam ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr Meral Yirmibeş Karaoğuz hocam saatlerce beni preparat bakarken sağ yanına alarak, sabırla bana sitogenetiğin tüm inceliklerini öğretmiştir. Tezimin fikir ve yorumlanmasında dahası her aşamasında beni yalnız bırakmamış ve hep yanımda yer almıştır. Üstün hocalık ve yöneticilik vasıflarının yanında bana ve diğer arkadaşlarıma her zaman bir abla gibi davranmış her zaman bilgeliğini bizlerle paylaşmıştır. Hayata bakışı, Ali-Cenap'lığı, nezaketi ve zerafeti ile hepimize örnek olmuştur. Kendisine çok teşekkür ediyor, hayat enerjisinin hep böyle yüksek kalmasını diliyorum.

Öğretme ilminin filozofisine varmış, bilim insanı ve bir anne olarak hocam olmasından gurur duyduğum Prof. Dr. Ferda E. Perçin hocam 20 yıllık hekimlik hayatımda gördüğüm en iyi hocalardan biridir. Bir sendroma ismini vermiş olan bu değerli hocadan dismofrolojiyi öğrenmiş olmak bana tarifsiz bir onur vermiştir. Kendisi saatlerce hiç bıkmadan büyük bir sabır göstererek dismorfolojinin en ince noktalarına varıncaya kadar öğretmiş ve bana genetik nosyonu kazandırmıştır. Disiplin, dürüstlük, saygının anlamını bana yeniden öğreten, hocalık yanında abla gibi davranmasını da bilen Ferda hocama teşekkür ediyorum

Bölümümüzün bir diğer saygı değer hocası olan Prof Dr Mehmet Ali Ergün hocam tanıştığımız ilk günden itibaren her zaman moral kaynağım olmuştur. Her olumsuzluğa bir çözüm bulan pozitif duruşu ile bana örnek olmuştur. Elllerinden moleküler genetik ve tüm egzom dizileme öğrenmiş olmaktan ve SELIM projesine şahit olmaktan gurur duyuyorum. Çok cömert ve eli bol bir insan, bir hoca ve bir ağabeyimiz olan Mehmet Ali hocaya, değerli eşi ve arkadaşımız olan Sezen Güntekin Ergün'e, Selim ve doğacak bebekleri ile mutlu ve sağlıklı bir ömür sürmesini diliyor, teşekkürlerimi sunuyorum.

Hocalarımdan Doç. Dr. Esra Tuğ hocamdan sitogenetik konusunda çok yardım aldım ve birçok şey öğrendim. Kendisi, ben ve diğer asistan arkadaşlarıma moleküler genetiğin teorik kısmını haftalık yaptığı dersler ile anlatarak bu konudaki eksikliğimizin giderilmesini sağlamıştır. Ayrıca birçok seminerimde ve özellikle de tez sunumumun düzenlenmesinde kendisinden çok büyük ve kıymetli yardımlar aldım. Bizlere her zaman ve her konuda sıkıştığımızda yardım elini uzatmaktan çekinmeyen hocama yardımları ve öğrettikleri için şükranlarımı sunuyor, ailesi ile birlikte uzun ve sağlıklı bir ömür diliyorum.

Öğretim görevlisi Dr Gülsüm Kayhan'a tüm asistanlığım boyunca ve tezimin yazımı ve düzenlenmesinde yaptığı yardımlar nedeniyle sonsuz şükranlarımı sunuyorum. Kendisinden moleküler sitogenetik ve poliklinikte gördüğüm kompleks genetik hastaların değerlendirilmesi konularında çok kıymetli bilgiler aldım. Tüm asistan arkadaşlarıma ve bana karşı her zaman örnek olan Gülsüm hocama müteşekkirim.

Sevgili asistan arkadaşlarım Dr. Bayram Taşkın, Dr. Taha Bahsi, Dr. Nihal Dilek, Dr. Hanife Saat, Dr. Pelin Özyavuz Çubuk, Dr. Abdullah Sezer, Dr. Mustafa Hakan Demirbaş ve Dr. Ayşe Savaş'a arkadaşlıkları, anlayışları ve yardımları için çok teşekkür ediyorum

Moleküler Biyolog Hasan Hüseyin Kazan dostuma tezim ve moleküler genetik eğitimim için verdiği destek ve yakın dostluğu için teşekkürlerimi sunuyorum.

Sitogenetik ve moleküler genetik laboratuvarlarının değerli biyologları olan Işıl Küçün Kiraz, Ebru Aytekin, Derya Karaer, Esra Küçük, Neslihan Kuş, Melek Keskin ve Elif Nihan Çetin kardeşlerime eğitimim boyunca verdikleri destek ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Bölüm sekreterlerimiz Mehtap Tırpan ve Ayşe Erdoğan'a yardımları ve dostlukları için teşekkür ederim

Biricik eşim Meltem Mermer'e hayat arkadaşlığı, anlayışı, tezim için yaptığı yardımlar ve gösterdiği sonsuz sevgisi için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar	iv
Genlerin Açık İsimleri	vii
Tablolar Dizini	xi
Şekiller Dizini	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp Damar Sistemi Embriyolojisi	3
2.1.1 Birincil ve İkincil Kalp Alanlarının Oluşumu	3
2.1.2 Kalp Tüpü Oluşumu	4
2.1.3 Kardiyak Ark Formasyonu	4
2.1.4 Kardiyak Septaların Oluşumu	6
2.1.5 Atriyal Septum Oluşumu	6
2.1.6 Atriyoventriküler Septum Oluşumu	7
2.1.7 Trunkus Arteriosus ve Konus Kordiste Septum Oluşumu	8
2.1.8 İnterventriküler Septum Oluşumu	8
2.1.9 Semilunar Kapakların Oluşumu	9
2.2. Konjenital Kalp Hastalıklarının Genetik Tarihçesi	9
2.3. Konjenital Kalp Hastalıkları	11
2.3.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyolojisi	11
2.3.1.1 Sayısal Kromozomal Anomaliler ve Konjenital Kalp Hastalıkları	12

2.3.1.2 Mikrodelesyon ve Duplikasyon Sendromlarında Konjenital Kalp Hastalıkları	14
2.3.1.2.1 DiGeorge (22q11.2 delesyon) Sendromu	16
2.3.1.2.2 Yirmiiki q11.2 Duplikasyon Sendromu	17
2.3.1.2.3 Williams Sendromu	18
2.3.1.3 Tek Gen Hastalıklarında Konjenital Kalp Hastalıkları	19
2.3.1.3.1 Sendromik Tek Gen Hastalıklarında Konjenital Kalp Hastalıkları	19
2.3.1.3.1.1 Alagille Sendromu	19
2.3.1.3.1.2 Noonan Sendromu	19
2.3.1.3.1.3 Holt-Oram Sendromu	20
2.3.1.3.1.4 CHARGE Sendromu	21
2.3.1.3.2 Sendromik Olmayan Tek Gen Hastalıklarında Konjenital Kalp Hastalıkları	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 Hastalara Uygulanan Tanısal İşlemler ve Yöntemler	30
3.1.1 Giemza Tripsin Giemza Karyotip Analizi İçin Uygulanan Yöntem	30
3.1.2 High Resolution Banding Düzeyinde Karyotip Analizi İçin Kullanılan Yöntem	31
3.1.3 Giemza Tripsin Giemza Bantlama Tekniği	32
3.1.4 Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği	32
3.2 Array-CGH Uygulaması	36
3.2.1 Array-CGH’de Kullanılacak DNA’nın Eldesi	36

3.2.2 Elde Edilmiş DNA’nın Konsantrasyonunun Ölçümü ve Kalitesinin	
Değerlendirilmesi	38
3.2.3 Tüm Genom Amplifikasyonu	38
3.2.4. Pürifikasyon	40
3.2.5 Fragmantasyon- İşaretleme	42
3.2.6 Hibridizasyon	43
3.2.7 Yıkama, Boyama ve Arraylerin Taranması	44
3.2.8 Sonuçların Değerlendirilmesi	46
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	69
7. KAYNAKLAR	70
8. ÖZET	86
9. SUMMARY	88
10.ÖZGEÇMİŞ	90
11.EKLER	91

KISALTMALAR

µg: Mikro Gram

µl: Mikro Litre

A.D: Anlamalı değil

Array-CGH: Array Komperatif Genomik Hibridizasyon

AS: aort stenozu

ASD: Atriyal Septal Defekt

AV: Atriyovenriküler

BrDU: Bromo-2'-deoksiüridin

ChAS: Chromosome Analysis Suite

Cm: Santimetre

CMA: Kromozomal mikroarray

CNM: Copy Number Mutation

CNV: Copy Number Variation

CoA: aort koarktasyonu

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DECIPHER: Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using

Ensemble Resources

del: Delesyon

DGV: Database of Genomic Variants

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DORV: Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül

DS: Denatürasyon Solüsyonu

dup: Duplikasyon

ECARUCA: European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations

EDTA: Etilendiamin Tetra Asetik Asit

FISH: Floresan in situ Hibridizasyon

g: Gram

GHTM: Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi

GTG: Giemza-Tripsin-Giemza

HCL: Hidroklorik Asit

HRB: High Resolution Banding

ISCA: The International Standards for Cytogenomic Arrays

Kb: Kilo Baz

KCL: Potasyum Klorür

LCR: Low Copy Repeats

M: Molar

Mb: Megabaz

MIM: Mendelian Inheritance in Man

ml: Mili Litre

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

mM: Mili Mol

MTX: Metotreksat

NaOH: Sodyum Hidroksit

NCBI: National Center For Biotechnology Information

ng: Nano Gram

NS: Nötralizasyon Solüsyonu

°C: Santigrat derece

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PBS: Phosphate Buffered Saline

PD: Pulmoner Darlık

PubMed: the U.S. National Library of Medicine

rpm: Rotation Per Minute

SD: Standart Deviation

SNP-array: Single Nucleotide Polymorphism array

SSC: Saline Sodium Citrate

TGA: Büyük Arterlerin Transpozisyonu

TOF: Fallot Tetralojisi

Tris: Hidroksimetil Amino Metan

VSD: Ventriküler Septal Defekt

WES: Tüm Egzom Dizileme

GENLERİN AÇIK İSİMLERİ

ABCC8: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8

ABCC9: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 9

ACTC1: Actin, Alpha, Cardiac Muscle 1

ACVR1: Activin A Receptor Type 1

ALDH1A2: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2

ANKRD1: Ankyrin Repeat Domain 1

B3GALT5: Beta-1,3-Galactosyltransferase 5

BACE2: Beta-Site APP-Cleaving Enzyme 2

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

CD99P1: CD99 Molecule Pseudogene 1

CFC1: Cryptic protein

CHD7: Chromodomain helicase DNA binding protein 7

CITED2: Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2

CMAS: Cytidine Monophosphate N-Acetylneuraminic Acid Synthetase

COL6A: Collagen type VI alpha

CRELD1: Cysteine Rich With EGF Like Domains 1

DHR SX: Dehydrogenase/Reductase X-Linked

DSCAM: Down Syndrome Cell Adhesion Molecule

DSCR4: Down Syndrome Critical Region 4

DYRK1A: Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A

ELN: Elastin

ERG: ERG, ETS Transcription Factor

ETS2: ETS Proto-Oncogene 2, Transcription Factor

FANCA: Fanconi Anemia Complementation Group A

FLNA: Filamin A

FOXH1: Forkhead Box H1

GATA4: GATA-binding protein 4

GATA5: GATA binding protein 5

GATA6: GATA binding protein 6

GDF1: Growth Differentiation Factor 1

GJA1: Gap Junction Protein Alpha 1

GYS2: Glycogen Synthase 2

HAND1: Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1

HAND2: Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2

HEY2: Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2

IAPP: Islet Amyloid Polypeptide

IRX4: Iroquois Homeobox 4

JAG1: Jagged 1

KCNJ15: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 15

KCNJ6: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 6

KCNJ8: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 8

KRAS: KRAS proto-oncogene, GTPase

LDHB: Lactate Dehydrogenase B

MED13L: Mediator Complex Subunit 13 Like

MEF2: Mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide A

MX2: MX Dynamin Like GTPase 2

MYBPC3: Myosin Binding Protein C, Cardiac

MYH11: Myosin Heavy Chain 11

MYH6: Myosin Heavy Chain 6

MYH7: Myosin Heavy Chain 7

NKX2-5: NK2 Homeobox 5

NKX2-6: NK2 Homeobox 6

NODAL: Nodal Growth Differentiation Factor

NOTCH1: Notch 1

NOTCH2: Notch 2

NRAS: NRAS proto-oncogene, GTPase

PCP4: Purkinje Cell Protein 4

PDGFRA: Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha

PSMG1: Proteasome Assembly Chaperone 1

PTPN11: Protein-Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor-Type, 11

PYROXD1: Pyridine Nucleotide-Disulphide Oxidoreductase Domain 1

RAF1: V-RAF-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1

RECQL: RecQ Like Helicase

RIT1: Ras-like protein without CAAX motif 1

SH3BGR: SH3 Domain Binding Glutamate Rich Protein

SLCO1A2: Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1A2

SMAD6: SMAD Family Member 6

SMYD1: SET And MYND Domain Containing 1

SOS1: Son of sevenless, drosophila, homolog 1

SPIRE2: Spire Type Actin Nucleation Factor 2

ST8SIA1: ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 1

TAB2: TGF-Beta Activated Kinase 1/MAP3K7 Binding Protein 2

TBX1: T-BOX 1

TBX20: T-BOX 20

TBX5: T-BOX 5

TDGF1: Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1

TFAP2B: Transcription Factor AP-2 Beta

USH1C: USH1 Protein Network Component Harmonin

WRB: Tryptophan Rich Basic Protein

ZBED1: Zinc Finger BED-Type Containing 1

ZFPM2: Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2

ZIC3: Zic Family Member 3

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	İzole Kalp Hastalığına Neden Olan Genler	26
Tablo 2.	Konjenital Kalp Anomalisi Olan Hastalarda Genetik Değerlendirme Endikasyonları	29
Tablo 3.	Isı Döngüleyicide Uygulanan Amplifikasyon Programı	40
Tablo 4.	Isı Döngüleyicinin Fragmentasyon ve İşaretleme İşlemi Sırasındaki Programı	42
Tablo 5.	Isı Döngüleyicide Uygulanan Denatürasyon Programı	43
Tablo 6.	Yıkama ve Holding Bufferlerin Tüplere Bölünmesi	45
Tablo 7.	Çalışmaya Alınan Hastaların Sayı, Cinsiyet ve Konjenital Kalp Anomalisi Dağılımları	50
Tablo 8.	Array-CGH Analizi Yapılan Hastaların Sonuçları	56
Tablo 9.	Array-CGH Analizinde Delesyon Ve Duplikasyon Saptanan Bölgeler Ve İlgili Genleri	57
Tablo 10.	Array-CGH Analizi Sonucunda Konjenital Kalp Hastalıkları Açısından Anlamlı Olabileceği Düşünülen Delesyon/Duplikasyon Bölgeleri Ve Hastaların Dismorfik Bulguları İle Eşlik Eden Organ Anomalileri	58
Tablo 11.	Kardiyak anomaliler ve FISH analiz sonuçları arasındaki ilişki	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Hastaların Kardiyak Anomalilerinin Detayları Ve Dağılım Sıklığı	48
Şekil 2.	5 numaralı hastanın array CGH analizi ile saptanan 21. kromozomdaki delesyon	59

1. GİRİŞ

Konjenital Kalp Hastalıkları infant mortalite ve morbiditesinin en önemli sebebidir (1). Her 1000 canlı doğumun sekizinde konjenital kalp hastalıkları görülürken, bu sekiz hastanın üçüne de kardiyak invaziv girişim gerekmektedir (2). Spontan abortuslarda görülen sık konjenital kalp hastalıkları ve subklinik kalp hastalığı olan hastalar da göz önünde bulundurulduğunda konjenital kalp hastalıklarının frekansının çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir (3). Altta yatan etiyolojinin kesin olarak ortaya konulması, hastanın takip ve tedavisi yanında bu hastalığın gelecek kuşaklarda tekrarlayabilme olasılığının belirlenmesi ve doğru genetik danışmanın verilebilmesi açısından önem arz etmektedir.

En sık görülen doğumsal defekt olan konjenital kalp hastalıkları, kalpte önemsiz ya da kendiliğinden düzelebilen malformasyonlar şeklinde görülebildiği gibi, çok kompleks ve yaşamla bağdaşmayacak kadar ağır klinik tablolar olmak üzere pekçok farklı tipte görülebilmektedir. Günümüzde bu gibi hastalar için kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinde önemli ilerlemeler sağlanmış olsa da, hastalığın etiyolojisinin altında yatan nedenlerin daha iyi anlaşılabilmesi, ileride daha iyi önleyici ve tedavi edici yöntemlerin geliştirilebilmesi açısından yol gösterici olabilecektir (4).

Kromozomal anomaliler, konjenital kalp hastalıklarının sık nedenlerinden biri olmakla birlikte konvansiyonel sitogenetik tekniklerle bu gruptaki hastaların küçük bir kısmına tanı konulabilmektedir. Bu durum, standart karyotiplemenin, ancak 5-10 Mb (megabaz) üzerindeki kayıp ya da kazançları saptayabilmesi ile açıklanabilir.

Kromozomal mikroarray (CMA) veya Array Komperatif Genomik Hibridizasyon (Array-CGH) yüksek resolüsyon ile genomdaki submikroskopik kayıp ya da kazançların (Copy Number Variation; CNV) gösterilebilmesine olanak sağlayan ve günümüzde giderek artan sıklıkta kullanılmakta olan bir genetik tanı yöntemidir (5). Yapılan çalışmalarda izole konjenital kalp hastalıklarının %3-10'unda CNV saptanırken, ekstrakardiyak bulgularla birliktelik gösteren hastalarda %3-25 oranında CNV saptanmış olması, bu grup hastalarda mikroarray yöntemi ile önemli tanısal bilgilere ulaşılabileceği bilgisini desteklemektedir. Mikroarray analizinin kullanıma girmesinden önce, izole konjenital kalp hastalığı olan hastalarda floresan işaretli proplar kullanılarak 22q11.2 delesyon sendromları için Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) tekniği ile kritik bölgelerin analizi yapılmaktaydı. O nedenle günümüzde FISH analizlerinin yanısıra, kromozomal mikroarray analizi uygulamasının bu hastalarda daha fazla tanı konulmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir (6).

Bu amaçla çalışmamızda, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezimize 2005-2016 yılları arasında başvurmuş, çocukluk yaş grubundaki sendromik olmayan konjenital kalp hastalıkları olan hastaların retrospektif olarak sitogenetik, FISH ve mikroarray analizlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi yapılmış ve tüm veriler ışığında klinik ve laboratuvar bulgularının detaylı olarak karşılaştırılması ve yorumlanması gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Damar Sistemi Embriyolojisi

2.1.1 Birincil ve ikincil kalp alanlarının oluşumu

İnsan kalp damar sisteminin ilk oluşumu gestasyonu takiben üçüncü haftanın ortasında başlamaktadır. İlk önce primitif çizginin kranial ucuna bitişik epiblast hücrelerinin içerisinde progenitor kalp hücreleri oluşmaktadır. Daha sonra bu hücreler primitif çizgi boyunca lateral mezoderm yaprağının splanknik katmanına doğru göç ederek nöral katlantının kranialinde “at nalı” şekli oluşturacak şekilde *birincil kalp alanını* oluşturmaktadır. Bu hücrelerden atriumlar, sol ventrikül ve sağ ventrikülün bir kısmı gelişir. Sağ ventrikülün kalan diğer kısmı ve kalbin çıkım yolunu oluşturan konus kordis ve trunkus arteriosus, *ikincil kalp alanından* köken almaktadır.

Primitif kalp alanını oluşturan hücre grubundan, medialden laterale doğru sırası ile trunkus arteriosus, konus kordis, sağ ventrikül, sol ventrikül ve atriumlar köken almaktadır. Hücrelerin değişime uğramaları sırasında, aynı zamanda embriyonun tümünde görülen lateralizasyon, yani sağ-sol taraflılık oluşur ve bu normal kalp gelişimi için gereklidir. Bu lateralizasyonun gelişebilmesi için gereken sinyal yolağı lateral mezoderm plakasında eksprese olmaktadır ve sinyalizasyonda birçok molekül rol almaktadır.

Embriyolojik dönemde yer alan lateralizasyon sürecindeki duraksamalar heterotaksi olarak şeklinde karşımıza çıkabilmektedir. Heterotaksi içerisinde birçok doğumsal kalp anomalileri ki, bunlara örnek olarak dekstroardi, ventriküler septal defekt (VSD), atriyal septal defekt (ASD), çift çıkımlı sağ ventrikül (DORV), büyük

arterlerin transpozisyonu (TGA) ve pulmoner darlık (PD) gibi, çıkım yolu defektleri gösterilebilir.

2.1.2 Kalp tüpü oluşumu

Embriyo büyüdükçe, sefalokaudal bükülme ve lateral katlantı belirginleşir ve sonunda kalp tüpünün kaudal bölgelerinin en uçta kalan kısımları hariç, birleşerek tek bir tüp halini alır. Eş zamanlı olarak, at nalı şeklindeki tüp, gelecekteki kalp çıkım yolu ve ventrikülleri oluşturmak üzere genişler ve bu şekilde iç kısımda endotel hücreleri ve dışarda miyositlerin oluşturduğu katmanlara sahip tüp şeklinde bir oluşum halini alır. Bu süreç devam ederken bir taraftan da miyokardium kalınlaşır ve hiyaluronik asitten zengin “kardiyak jöle” adı da verilen ekstraselüler matriks üretir ve bu şekilde miyokardium endotelyumdan ayrılır. Dorsal mezokardiumun kaudal sınırında lokalize mezenkimal hücrelerden proepikardial organ oluşur ve bu bölgeden köken alan hücreler epikardiyum ya da visseral perikardiumu oluştururlar. Oluşan bu katmandan daha sonra da koroner arterler gelişirler.

2.1.3 Kardiyak ark formasyonu

Kalp tüpü geliştikçe boyu giderek uzar ve kendi üzerine katlanarak bir ark şeklini alır. Bu sırada ikincil kalp alanından hücreler uzamakta olan kalp tüpünün kranial bölgesine katılırlar. Uzama süreci konus kordis ve trunkus arteriosusun oluşmasına olanak sağlar. Uzamanın baskılanması durumunda klinikte DORV, VSD,

Fallot Tetralojisi (TOF), pulmoner atrezi ve pulmoner stenoz gibi kalp anomalileri ile karşılaşılabilir.

Embriyonun 23. günü kalp tüpü kıvrılmaya başlar ve sefalik kısmı ventrale, kaudale ve sağa doğru bükülme gösterirken, atriyal yani kaudal parça, dorsokraniale ve sola doğru bükülür ve bu şekilde kardiyak ark oluşmuş olur. Kıvrılma, 28. gün tamamlanır ve oluşan tüpün içinde, lokal genişleme bölgeleri gözle görülür hale gelir. Atriyal kısım, ilk başlarda dış kısmından perikardial boşlukla bağlantılı durumdadır ve perikardial kese içerisinde gömülü tek bir odacık şeklindedir. Atriyoventriküler bileşke dar olarak kalır ve bu kısım, atriyoventriküler kanalı oluşturur. Bulbus kordisin proksimal 2/3 kısmı haricindeki kısımlar, sağ ventrikülün trabeküler kısmını oluşturur. Orta kısım, yani konus kordis, sağ ve sol ventrikülün çıkım yollarını oluşturur. Bulbusun distal kısmı, trunkus arteriosus, aort kökü ve proksimal aortayı oluşturur. Ventrikül-bulbus kordis bileşkesinin dış kısmında bulbo-ventriküler sulkus belirir ve dar olarak kalır. Bu bölgeye primer interventriküler foramen adı verilir. Bu şekilde, kalp tüpü kraniokaudal aks boyunca sırasıyla konotrunkus, sağ ventrikül, sol ventrikül ve atriyal bölgelere ayrılmış olur. Kardiyak ark tamamlandığında, primer interventriküler foramen gelişerek primitif sağ ve sol ventrikülü birbirinden ayırmaya başlar. Kardiyak arkus oluşumundaki bozukluk, klinikte karşımıza hastalarda heterotaksi grubundan dekstrocardi olarak çıkabilmektedir.

2.1.4 Kardiyak septaların oluşumu

Kalbin majör septalarının gelişimi embriyogenezin 27. ve 37. günleri arasında gerçekleşmektedir ve septasyonu oluşturan yapılara endokardiyal yastık adı verilir. Endokardiyal yastıklar, endokardium ile miyokardium arasında ekstraselüler matriksin birikmesi ve hücre proliferasyonu ile birlikte migrasyonu sonucunda gelişen çıkıntı şeklindeki yapılardır. Konotrunkal yastıklar ise kranial nöral katlantılardan köken alan hücrelerin çıkım yoluna migrasyonu sonucu oluşurlar. Atriyoventriküler ve konotrunkal bölgelerde oluşan endokardiyal yastık, bu bölgelerde atriyal ve ventriküler septumu, atriyoventriküler kanalları ve kapakları ile aortik ve pulmoner kanalları oluştururlar. Endokardiyal ve konotrunkal yastık oluşumundaki anormallikler ASD, VSD, TGA, trunkus arteriosus ve TOF'a neden olurlar.

2.1.5 Atriyal septum oluşumu

Atriyal septum dördüncü haftanın sonunda hilal şeklinde bir yapı ortak atriyumun çatısında belirir ve septum primumun ilk parçasını oluşturur. Hilalin iki ucu atriyoventriküler kanala kadar ilerler. İki uç ve atriyoventriküler kanal arasında kalan açıklığa ostium primum adı verilir. İlerleyen günlerde bu açıklık giderek kapanırsa da tam kapanma olmadan önce septumun üst kesimlerindeki hücrelerin apoptozu sonucunda yeni bir açıklık oluşur ve ostium sekundum adını alır. Daha sonra, sinüs boynuzunun sağ atriya birleştiği bölgeden, hemen septum primumun bitişiğinden yeni bir hilal şeklinde çıkıntı belirir. Septum sekundum'u oluşturacak

olan bu yapı, septum primumda da olduğu gibi giderek atriyoventriküler kanal doğrultusunda ve septum primuma paralel şekilde bir duvar oluşturur ancak tamamen kapanmayarak sağdan sola kan akımına izin verecek şekilde foramen ovale adında bir açıklık olarak kalır. Doğumdan sonraki alınan ilk nefesle birlikte sağ ventrikül ön yükündeki azalmaya bağlı olarak sağ kalp basıncı azalır ve septum primum ve sekundum birbirine yapışır. İlerleyen günlerde iki septum birbiri ile tamamen kaynaşarak iki atriyum arasındaki geçiş sona erer.

2.1.6 Atriyoventriküler septum oluşumu

Dördüncü haftanın sonunda, dorsal, ventral, sağ ve sol olmak üzere dört atriyoventriküler endokardial yastık belirir. Daha sonra, dorsal ve ventral yastıklar lümene doğru ilerleyerek birleşirler ve beşinci haftanın sonunda atriyoventriküler kanalın girişini, sağ ve sol olarak iki kısma ayırırlar. Atriyoventriküler endokardial yastıkların birbirleri ile birleşmesi sonrasında, her bir giriş bölgesinin kenarlarında lokal mezenkimal doku proliferasyonu başlar. Kan akımı nedeniyle dokuda oluşan oyulma ve incelme nedeniyle bu bölgenin dokusu fibroz doku haline gelir ve atriyoventriküler (AV) kapaklar bu şekilde oluşur. Endokardial yastık defekti sonucunda ASD, VSD, hipoplastik sağ ve sol kalp, AV kanal defekti, Ebstein anomalisi, triküspit atrezi gibi anomaliler oluşmaktadır.

2.1.7 Trunkus arteriosus ve konus kordiste septum oluşumu

Beşinci hafta içinde trunkusun iç yüzünde karşılıklı olarak ve lümen boyunca uzanan bir çift kabarıklık gelişir. Her iki kabarıklık spiral şeklinde ve birbirlerine karşılık gelecek şekilde büyürler ve sonunda trunkus arteriyosusu iki lümen haline getirerek aortik ve pulmoner kanalları oluştururlar. Benzer şekilde, konus kordiste de iki kabarıklık belirir ve karşılıklı olarak büyüyerek kaynaşırlar ve bu şekilde sağ ve sol ventrikül çıkım yolları oluşur.

Kalp nöral krest hücreleri arka beyin (hindbrain) bölgesindeki nöral katlantıların kenarlarından köken alırlar ve 3, 4 ve 6. faringeal arklar boyunca göç ederek kalbin çıkım yoluna ulaşırlar. Bu bölgede hem konus kordis hem de trunkus arteriosustaki endokardial yastıkların oluşumunu sağlarlar. Kardiyak nöral krest hücrelerinin göç ve migrasyonunun bozulması, fallot tetralojisi, pulmoner stenoz, persistan trunkus arteriosus ve büyük arter transpozisyonuna yol açmaktadır. Nöral krest hücreleri kraniofasial gelişimde de yer aldıklarından kardiyak anomaliler ile birlikte hastalarda yüz anomalileri de görülebilmektedir.

2.1.8 İnterventriküler septum oluşumu

Dördüncü haftanın sonunda primitif ventriküller genişlemeye başlar. Her iki ventrikül giderek genişlerken medial duvar belirmeye başlar ve ön ile arka duvardan kaynaklanan ve giderek büyüyen septal çıkıntılar haline gelirler ve ortada birleşirler. Septumun çıkım yoluna yakın kısmında son olarak kapanacak olan açıklığa interventriküler foramen adı verilir ve konus septumun kapanmasını takiben kapanır.

İnterventriküler foramen kapandıktan sonra interventriküler septumun membranöz parçası olarak anılır.

2.1.9 Semilunar kapakların oluşumu

Trunkus arteriosus'un iki kısma ayrılması sonrasında ana trunkusun proksimal kısmında ileride semilunar kapakları oluşturacak tüberküller görülmeye başlar. Nöral krest hücreleri burada da etki ederek semilunar kapakların oluşumunda görev alırlar. Tüberküller giderek büyüyerek pulmoner ve aortik semilunar kapaklar olarak son şekillerini alırlar (7).

2.2. Konjenital Kalp Hastalıklarının Genetik Açıdan Tarihçesi

Thomas Bevill Peacock 1858 yılında “On Malformations of the Human Heart” isimli eseri ile ilk defa konjenital kalp hastalıklarını gruplandırmıştır. Peacock bu kitabında, konjenital kalp hastalıklarını kalbin embriyoloji ve anatomisini de içine alarak; yanlış yerleşimli kalp, perikardial anormallikler, kardiyak malformasyonlar ve büyük damarlardaki düzensizlikler şeklinde dört ana gruba ayırmış ve bu hastalıkların çevresel etmenlerin yanısıra kalıtsal nedenlere bağlı olarak da gelişebileceğinden ilk defa bahsetmiştir. Gregor Mendel'in o tarihte kalıtım tipleri ile ilgili temel eserinin henüz yazılmamış olması da, bu eserin önemini ayrıca arttırmaktadır (8, 9). Konjenital kalp hastalıkları ve genetik kavramı ise ilk olarak 1949 yılında Dr. John Maurice Hardman Campbell tarafından ifade edilmiştir. Campbell 1965 yılında, 1200 kişilik bir kohort çalışmasında, konjenital kalp hastalıklarının etiyolojisinde genetik

faktörlerin de etkili olabileceği görüşünü bildirmiştir. Nora da yazısında konjenital kalp hastalıklarının submikroskopik kromozomal anomaliler sonucunda oluşabileceği hipotezini de ifade etmiştir (8, 10, 11).

Stuart Orkin'in 1986 yılında kronik granülomatoz hastalık ile ilişkili geni keşfetmesi ile moleküler genetik çağı başlamıştır (12). *Pozisyonel klonlama* adı verilen yöntemle, Mendeliyen hastalıklara ait mutasyonların saptanabilmesi mümkün hale gelmiş ve insan genomunun dizilenmesi ile birlikte çok sayıda Mendeliyen geçiş gösteren konjenital hastalıklara ilişkili genler belirlenebilmiştir (10). Ailesel geçiş gösteren konjenital kalp hastalığı olanlarda yapılan bağlantı analizi ve aday genlerin analizi çalışmaları, yeni bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır. konjenital kalp hastalıkları ile ilişkisi iyi tanımlanmış *NKX2.5* (NK2 homeobox 5), *GATA4* (GATA-binding protein 4), *TBX5* (T-BOX 5), *NOTCH1* (NK2 Homeobox 5) ve *TBX20* (T-Box 20) gibi genlerin birçoğu bu erken dönemde belirlenmişlerdir (13-17).

Yirmi ikinci kromozomun uzun kolundaki (q11.2) delesyonun, DiGeorge sendromu (22q11.2 delesyon sendromu) ve velokardiyofasial sendromu ile ilişkisinin bulunması, konjenital kalp hastalıklarının genetik etiyolojisinin açıklanabilmesi açısından önemli gelişmelerden birisidir. DiGeorge sendromlu vakalar ile bu kromozomal bölgenin ilişkisi, ilk olarak, translokasyonu olan bir ailedeki hastaların kromozom analizinde ilgili bölgenin kaybının tespiti ile belirlenmiştir (18). 1982 yılında FISH tekniği ile bu sendromlardan sorumlu kritik bölgelerin analizi ile hastalığın tanısı kolay ve etkin olarak konulmaya başlanmıştır (19, 20).

İkibinli yılların başlarında kromozomal mikroarray teknolojisinin geliştirilmesiyle, Array-CGH ve SNP-array (Single Nucleotide Polymorphism array) teknikleri de kullanıma girmiştir. Hastalıklarla ilişkili CNV'lerin ilk olarak nöropsikiatrik ve gelişimsel nörolojik hastalıklarla ilişkisi belirlenmiş, daha sonraları konjenital kalp hastalıkları ile de ilişkili oldukları görülmüştür (21). Genomun istenilen bölgelerinin analizinin sağlanabilmesine olanak veren masif paralel DNA dizileme yöntemi ile de gen kütüphaneleri oluşturulabilmiştir. Ayrıca, tüm egzom dizileme (WES) ve tüm genom dizilemenin de teknik ve ekonomik olarak yapılabilir hale gelmesiyle konjenital kalp hastalıkları'nın nokta mutasyonlarının tespiti mümkün hale gelmiştir (22).

2.3. Konjenital Kalp Hastalıkları

2.3.1. Konjenital kalp hastalıkları etiyolojisi

Daha sıklıkla multifaktöriyel kalıtım kalıbının etkin olduğu konjenital kalp hastalıklarının etiyolojisinde kromozomal anomaliler, tek gen hastalıkları, çevresel etmenler, ve epigenetik faktörler de rol almaktadır. Kromozomal anomaliler tüm canlı doğumlardaki kardiyovasküler malformasyonların %12-14'üne eşlik ederken, fetal dönemde saptanan kardiyovasküler anomalilerin %20-33'üne eşlik etmektedir (23, 24). Kardiyovasküler anomaliler izole şekilde ya da iyi tanımlanmış bir genetik sendromun komponenti olarak da görülebilmektedirler (25). Bir olguda saptanan kalp anomalisinin “izole” olarak tanımlanması, zaman içinde sonradan görünür hale gelebilen gelişimsel gerilik ve bazı dismorfik bulgular gibi değişkenler nedeniyle

oldukça zordur. Bunun sonucu olarak da kalp anomalileri, sendromik olgular içinde olduğundan daha az bildirilmektedir, ya da diğer bir deyişle sendromik konjenital kalp hastalığı sıklığı olduğundan daha az hesaplanmaktadır. Spontan abortuslarda kardiyovasküler malformasyonlar sık görülmekle birlikte biküspit aorta veya aortik dilatasyon gibi sessiz anomaliler bu malformasyonlara dahil edilmemektedirler. Bu gibi malformasyonlar da göz önünde bulundurulduğunda, kardiyovasküler malformasyonların insidansını %5 seviyesine yükselmektedir (26).

Epidemiyolojik çalışmalar konjenital kalp hastalıklarının en önemli nedeninin genetik faktörler olduğunu ortaya koymaktadır. Danimarka’da, ulusal veritabanı kullanılarak ve çok kapsamlı bir şekilde yapılmış bir çalışmada, aile bireylerinde konjenital kalp hastalıklarının herhangi bir tipi için, birinci derece akrabalarda görülmesinin görece riskinin 3,2 olduğu görülmüştür (27). Konjenital kalp hastalıklarının tekrarlama riski anomalinin tipine göre değişiklik göstermektedir. Kromozomal bozukluklar dışlandıktan sonra pozitif aile hikayesi olanlarda kalp anomalisinin bir sonraki jenerasyonda tekrarlama riskinin %4,2 civarında olduğu bildirilmiştir. Akriba evliliği konjenital kalp hastalığı riskini 2-3 kat kadar arttırdığı görülmüştür (28).

2.3.1.1 Sayısal kromozomal anomaliler ve konjenital kalp hastalıkları

Down sendromunda hastaların yaklaşık %40’ında konjenital kalp hastalıkları görülürken bu hastalıkların yarısını endokardial yastık defektleri oluşturmaktadır (29). Nadir segmental Trizomi 21 olgularından elde edilen verilerden *DSCAM* (Down

Syndrome Cell Adhesion Molecule) ve *COL6A* (Collagen type VI alpha) genlerinin Trizomi 21 ilişkili konjenital kalp hastalıklarından sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir (30).

Trizomi 18, Down sendromundan sonra en sık görülen sayısal kromozomal anomalilerden olup, yüksek mortalite ile seyretmektedir ve bu sendroma sahip hastaların kaybedilme sebeplerinin başında kalbe bağlı komplikasyonlar gelmektedir. (31).

Trizomi 13, ASD ve VSD'nin sık görüldüğü bir sayısal kromozomal anomali olup, sendromun görüldüğü bireylerde dektrokardinin görece sık görülmesi, lateralizasyonu da etkileyen genlerin 13. kromozom üzerinde olduğunu düşündürmektedir (32).

Turner sendromu, konjenital kalp anomalisi birlikteliği gösteren bir diğer kromozomal sayısal anomali olup 1850 canlı doğumda bir hastada görülmektedir. Ancak Turner sendromlu fetüslerin oldukça büyük bir kısmının kardiyak anomalilere, özellikle de hipoplastik sol kalp sendromuna bağlı olarak abortusla sonuçlandığı bildirilmiştir (33). Toplamda Turner sendromlu hastaların %10'unda klinik olarak önemi olan kalp anomalileri bildirilmiştir. Klinik bulgu vermeyen Turner sendromlu hastaların diğer bir %10'luk kesiminde ise, biküspit aorta gibi ekokardiyografik anomaliler izlenmektedir. Ayrıca bu hastalarda, kardiyak anomaliler içinde %16 sıklıkta biküspit aorta en sık görülen anomali olup, onu %11 sıklık ile aort koarktasyonu izlemektedir. Bunların yanında Turner sendromuna parsiyel anormal

pulmoner venöz dönüş, VSD gibi yapısal kalp anomalileri de eşlik edebilmektedirler (34).

2.3.1.2 Mikrodelesyon ve duplikasyon sendromlarında konjenital kalp hastalıkları

Moleküler sitogenetik tekniklerin gelişmesi ile birlikte, konvansiyonel sitogenetik analiz ile belirlenemeyen kromozomal dengesizliklerin tespit edilebilmesi mümkün olabilmektedir. Önceleri FISH tekniği, daha sonra da Array-CGH tekniği konjenital kalp hastalıklarına eşlik eden kromozomal dengesizliklerin tanısında giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (35).

Genetik hastalıklar bir genin tamamını kapsamayıp sadece genin bir egzonunda, başka bir deyişle intragenik delesyon ve duplikasyonlar şeklinde de karşımıza çıkabilmektedir. Kopya sayısı mutasyonu (Copy Number Mutation-CNM) terimi genetik hastalıkların oluş nedenini daha uygun açıklayabilmesi açısından bu durumlarda kullanılmaktadır (36). CNM'ler de novo (ilk defa o bireyde oluşmuş) veya parental kaynaklı olabilmektedir Array-CGH metodundaki ilerlemeler sonucunda CNM'lerin tanınabilmesi ve bu şekilde birçok hastalığın tanısının konulabilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu yaklaşım ilk olarak genom içerisinde küme şeklinde bulunan (contiguous) genlerdeki büyük CNM'lerin tespiti için kullanıma girmiştir (37). Daha sonra oligonükleotid problemlerin mikroarray analizlerinde kullanıma girmesiyle birlikte ekzon boyutunda daha küçük CNM'lerin tespiti mümkün hale gelmiştir. Tek-lokus array analizi (single-locus array) ilk olarak

Duchenne müsküler distrofide ve kistik fibrosiste, egzon ve intron bölgelerindeki CNM'lerin gösterilmesinde kabul görmüştür (36, 38). Bu gelişmeyi takiben birden fazla gen için özel olarak tasarlanmış Array-CGH (custom array) analizi birçok hastalığa ait CNM'lerin tespitine olanak sağlamıştır (39). Günümüzde, custom oligonükleotid Array-CGH tekniği ile, önceden belirlenen yüzlerce gen içindeki CNM'ler yüksek znrlkte gösterilebilmektedir (40). Yakın dönemde Tüm Egzom Dizi Analizi (WES) ve Tüm Genom Dizi Analizi (WGS) ile de kopya sayısı değişiklikleri tespit edilebilir hale gelmiştir. Tek başına kullanıldıklarında iyi bir array platformu veya WES ile kopya sayısı değişikliklerinin yaklaşık %70 kadarının gösterilebildiği bildirilmiştir (41). Bu noktada belirtilmesi gereken diğer önemli bir nokta ise, mümkün olan en yüksek znrlkteki Array-CGH sisteminin kullanılmasının, her zaman her araştırma için en iyisi anlamına gelmeyeceğidir. Yüksek znrlkl array platformları daha yüksek maliyet sorununu da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle çalışmada araştırılan hipoteze uygun olabilecek optimum znrlk düzeyindeki platformların seçilmesi önerilmektedir (42). Array –CGH analizinin yaygınlaşması ve giderek klinikte standart uygulanan bir test haline gelmesi ile birlikte konjenital kalp hastalıklarının etiyolojisinde kopya sayısı değişikliklerinin yeri daha iyi anlaşılmıştır. Klinik ve araştırma amaçlı yapılan testlerde konjenital kalp hastalığı olanların %10-15'inden kopya sayısı değişikliklerinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (43).

2.3.1.2.1 DiGeorge (22q11.2 delesyon) sendromu

Yirmi ikinci kromozomun uzun kolundaki 11 nolu bant bölgesinin (22q11) delesyonu sonucu oluşan bu sendrom, her 4000-10000 canlı doğumda bir görülen en sık kromozomal mikrodelesyon sendromudur. Olguların yaklaşık %90'ında *de novo* delesyonlar oluşmaktadır (44). Sendromunun bulguları klinik olarak belirgin heterojenite göstermektedir ve etkilenen sistemlerin başında kardiyovasküler (hastaların %75'i) ve bağışıklık sistemi (hastaların %75'i) gelmektedir. Hipoparatiroidiye ikincil hipokalsemi (hastaların %50'si), gastrointestinal ve yutma problemleri (hastaların %30'u) ve genitoüriner anomaliler ile renal agenezi (hastaların %30'u) görülebilmektedir. Bunun dışında daha nadir olarak velofaringeal yetmezlik %12,5-30, yarı damak %10, gelişimsel bozukluklar %1-2 ve şizofreni %0.5-1 sıklıkta görülmektedir (45). DiGeorge sendromunda entelektüel yetersizlik ve anksiyete bozuklukları ve şizofreni gibi nöropsikiyatrik hastalıklar da görülebilmektedir. Bu bulgular bazı hastalarda çok ağır olabildiği gibi, bazılarında çok hafif olarak gözlemlenebilmektedir (46). Sendromun sıklıkla sebebi, 22q11.2 bölgesindeki 0,7-3 Mb boyutundaki delesyon olup, bu bölgede sendromun fenotipik özelliklerden sorumlu olan *TBX1* (T-BOX 1) geni bulunmaktadır. Fenotipik bulguları 22q11 delesyon sendromu ile uyumlu olan fakat FISH tekniği ile bu kritik bölgede delesyon saptanmayan olgularda, *TBX1* geninde patojenik mutasyon saptanabilmektedir. Konjenital kalp anomalisi olan bireylerde 22q11.2 delesyonu varlığında, cerrahi komplikasyonların daha fazla olduğu ve böbrek anomalileri ile

birlikte olası hipokalsemi nöbetlerinin de sendroma eşlik edebileceği bildirilmiştir (47).

Sendromun tanısında FISH, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Array-CGH kullanılabilmektedir. FISH tekniğinde 22q11.2 delesyon bölgesinin LCR22A ve B (LCR: Low Copy Repeats) arasındaki kısmı incelenebilirken, SNP array tüm lokusun incelenebilmesine olanak vermektedir (48, 49).

2.3.1.2.2 Yirmiiki q11.2 duplikasyon sendromu

Oluş mekanizması 22q11.2 delesyon sendromu ile aynı şekilde LCR22 bölgeleri üzerinde oluşan yeniden düzenlenmelerdir. Konjenital kalp hastalığı olanlarda %15-25 oranında görülmektedir (47,48). Bu sendroma sahip bireylerde hiçbir anormal fenotip izlenmeyebileceği gibi entellektüel yetersizlik, geçmiş psiko-motor gelişim, müsküler hipotoni ve büyüme geriliği gibi ağır bulgular görülebilir (50, 51). Klinik bulguların genellikle hafif ve belirgin derecede değişkenlik gösterdiği bu sendromda, duplikasyonun büyüklüğü ortalama olarak 1,5-6 Mb boyutlarında olabilmektedir (52). Bununla birlikte, literatürdeki mevcut verilerin sınırlı olması nedeniyle duplikasyonun büyüklüğü ile fenotip arasındaki ilişkinin ön görülemeyeceği rapor edilmiştir (53). Bu duplikasyon sendromundaki fenotipik değişikliklerin, *TBX1* geninin artmış ifadenmesi ile birlikte epigenetik değişiklikler ve diğer genlerin etkilerinin veya aşırı ifadenmesi sonucunda hedef genlerdeki down regülasyonu ile açıklanabileceği bildirilmiştir (54).

2.3.1.2.3 Williams sendromu

Williams sendromu, supravavüler aort stenozu, periferik pulmoner stenoza, hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklar ile genellikle hafif entelektüel yetersizlik, büyüme gelişme anormallikleri, hiperkalsemi, hiperkalsiüri, hipotiroidizm ve erken püberte gibi endokrinolojik bozukluklar ile karakterize bir sendromdur. Hipotoni ve eklem laksitesinin görülmesi hastaların motor gelişim basamaklarının geri kalmasına sebep olabilmektedir. Dismorfolojik olarak, hastalarda bitempotaral darlık, göz kapaklarında ödematöz görünüm, iriste merkezden periferik doğru uzanan yıldız şeklinde görünüm, strabismus, kısa burun, geniş burun ucu, malar düzleşme, dişlerde maloklüzyon, uzun filtrum, küçük çene, büyük kulak lobülleri, üst ve alt dudaklarda kalın vermilyon gözlenebilmektedir. Sendrom, 7q11.23 bölgesinin delesyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır, dolayısı ile klinik bulgular delesyona uğramış bölgenin içerdiği genler ile değişkenlik gösterebilmektedir. Delesyon bölgesinde bulunan tropoelastini kodlayan elastin (*ELN*) genindeki fonksiyon kaybı sonucunda supravavüler aort darlığı geliştiği bildirilmiştir. Williams sendromu tanısında, *ELN* genini içeren Williams-Beuren kritik bölgesine spesifik hazırlanmış floresan prob ile FISH analizi, veya MLPA ile Array-CGH analizleri kullanılmaktadır (55, 56).

2.3.1.3 Tek gen hastalıklarında konjenital kalp hastalıkları

2.3.1.3.1 Sendromik tek gen hastalıklarında konjenital kalp hastalıkları

2.3.1.3.1.1 Alagille sendromu

Alagille sendromu, intrahepatik safra yollarında hipoplazi ve kolestaz bulgularıyla karakterize bir hastalık olmakla birlikte, hastaların %67'sinde periferik pulmoner arter darlığı ve %7-16'sında TOF görülebilmesi nedeniyle konjenital kalp hastalıkları ile de ilişkili bir durumdur. Hastalarda kalp defektleri içinde en sık TOF, daha sonra azalan sıklıkta VSD, ASD, aort stenozu (AS) ve aort koarktasyonu (CoA) görülmektedir. Klinik olarak hastalarda; büyüme gelişme geriliği, prominent alın, derin yerleşimli gözler, hafif hipertelorizm, iriste arkus juvenilis denilen açık renkli halka, posteriyor embriyotokson, ince burun yapısı gözlemlenebilmektedir. Ayrıca bu hastalarda iskelet anomalileri özellikle de kelebek vertebra sıklıkla tespit edilebilmektedir. Hastaların yaklaşık %95'inde *JAG1* (Jagged 1) geninde, %1-2 kadarında ise *NOTCH2* (Notch 2) geninde patojenik varyasyonlar saptanırken geriye kalan gruptan delesyon ve duplikasyonların sorumlu olduğu görülmüştür (57).

2.3.1.3.1.2 Noonan sendromu

Noonan sendromu, karakteristik yüz görünümü, kısa boy, kardiyak anomaliler ve değişken derecelerde gelişim geriliği ile karakterize bir sendromdur. Hastalarda geniş yele boyun, göğüs ön duvarı üst kesiminde pektus karinatum, alt duvarında ekskavatum görülebilir. Ayrıca, değişen düzeylerde koagülasyon bozuklukları, lenfatik displaziler, oküler anomaliler ve kriptorşidizm görülebilmektedir. Hastaların

%50-80'inde konjenital kalp hastalıkları bildirilmiştir. En sık görülen kalp anomalisi, pulmoner kapak stenozu olup hastaların %20-50'sinde görülmektedir. Hipertrofik kardiyomiopati, Noonan sendromlu hastaların yaklaşık üçte birinde görülmektedir. Ayrıca diğer kalp bulguları arasında ASD, VSD, pulmoner arter dallarında stenoz ve TOF'da sayılabilir.

Hastalığın en sık sebebi **PTPN11** (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type, 11) genindeki patojenik varyantlar olmakla birlikte **SOS1** (son of sevenless, drosophila, homolog 1), **RAF1** (V-RAF-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1), **RIT1** (rşc-like protein without CAAX motif 1), **KRAS** (KRAS proto-oncogene, GTPase), **NRAS** (NRAS proto-oncogene, GTPase) ve **BRAF** (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) genlerinin de hastalıktan sorumlu oldukları bildirilmiştir (58).

2.3.1.3.1.3 Holt-Oram sendromu

Holt-Oram sendromu, **TBX5** (T-box 5) genindeki mutasyonlar sonucu oluşan el-kalp sendromlarının en iyi bilinen örneğidir. Hastalarda karakteristik olarak omuz kuşağında gelişim geriliği, trifalangeal başparmak ve ASD görülmektedir. Bu sendromda ekstremitte defektleri, fokomeli, sadece başparmak anomalisi gibi değişken klinik bulgular rapor edilmiştir. **TBX5** geninde mutasyon bulunan hastaların yaklaşık yarısında sekundum ASD görülürken, daha nadiren VSD, AVSD (Atriyoventriküler septal defekt), trunkus arteriyosus gibi kardiyak malformasyonlar izlenebilmektedir. Yapısal anomalilerin yanı sıra bu hastalarda AV blok ve çeşitli aritmilerin de görülebildiği rapor edilmiştir (59).

2.3.1.3.1.4 CHARGE sendromu

CHARGE, sendromu oluşturan bileşenlerin baş harflerinin ingilizce karşılıklarının bir araya gelmesiyle türetilmiş bir isimdir; **C**oloboma, **H**ear defects, **C**hoanal **A**tresia, **R**etarded growth and development, **G**enital abnormalities and **E**ar anomalies. Önceleri bir “asosiasyon” olarak kabul edilirken *CHD7* (chromodomain helicase DNA binding protein 7) genindeki patojenik mutasyonlar sonucu oluştuğunun bulunmasıyla birlikte bir “sendrom” olarak kabul edilmiştir. CHARGE sendromu tanısı almış hastaların %75’ine konjenital kalp hastalıklarının eşlik ettiği ve bunlar içinde de en sık TOF bulunduğu bildirilmiştir (60, 61).

2.3.1.3.2 Sendromik olmayan tek gen hastalıklarında konjenital kalp hastalıkları

Konjenital kalp hastalıkları, bir sendromun bileşeni olmaksızın, izole olarak tek gen mutasyonları sonucunda da görülebilmektedir (35). Bu genlerin birçoğunu kardiyak transkripsiyon faktörleri ailesinden olan *NKX2.5* (NK2 homeobox 5), *GATA* çinko-parmak protein ailesi ve T-box transkripsiyon faktörlerine dahil olan *TBX5*, *TBX1* ve *MEF2* (mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide A) genleri oluşturur (62). Kalp gelişiminde evrimsel olarak korunan bu transkripsiyon faktörleri kardiyak yapıların morfogenezi, kontraktıl proteinleri kodlayan genlerin regülasyonunu ve kardiyak hücrelerin gelişimindeki öncül hücrelerin oluşumunu kontrol etmektedir.

İnsanda konjenital kalp anomalilerine neden olduğu gösterilen ilk nokta mutasyonlardan biri *NKX2.5* geninde gösterilmiştir. (63). *NKX2.5* geni kardiyak gelişimden sorumlu olmasının yanı sıra, yaşam boyu AV nodun ve miyokardın normal fonksiyon görmesinden de sorumludur (64). Bu gen 5q34 bölgesinde iki ekzonu olan 324 aminoasitlik homeodomaini kodlamaktadır. Troponin T, connexin 43, beta-miyosin ağır zincir ve miyozin hafif zincir-2 gibi miyokardın yapısındaki hayati proteinler için önemli bir gendir (65). *NKX2.5* mutasyonlarının önceleri ASD ve ileti sistemi defektlerine yol açtığı düşünülmekte birlikte ancak daha sonraları heterotaksi ve TOF gibi oldukça belirgin fenotipik değişkenliğe neden olabildiği görülmüştür. Bu gende nokta mutasyonu olan bireylerde ani ölüm ve kalp bloğu gibi ciddi komplikasyonlar görülebilmektedir (66). Yine *NKX2.5* genindeki bazı nokta mutasyonların dilate kardiyomiyopatiye neden olduğu da bildirilmiştir (67).

GATA4 (GATA binding protein 4) çinko-parmak transkripsiyon faktörü olup, *NKX2.5* ile doğrudan ilişkili, kalp gelişiminden sorumlu bir gendir (68). *GATA* gen ailesinden olan *GATA4*, gelişmekte olan miyokardiyal, endokardiyal ve endodermal hücrelerde ifadelenmektedir (69). Bu genin delesyonu sonucunda ekstra-embriyonik ve foregut (ön barsak) malformasyonlarının oluştuğu ve kardiyomiyositlerin proliferasyonu ile regülasyonundan ve kalpte septasyonun gelişiminden de sorumlu olduğu görülmüştür (70, 71). *Gata4* heterozigot farelerde kardiyak hipoplazi ve basınç yüküne cevap olarak gelişen hipertrofik yanıtın azaldığı izlenmiştir (72).

Holt-Oram sendromundan sorumlu *TBX5* genindeki mutasyonlar sonucunda hastaların %30'unda ekstremité anomalisi olmaksızın, çoğunluğu septasyon defekti

olmakla birlikte, kompleks izole kardiyak anomaliler görülmektedir. *TBX5* gen mutasyonları komplet penetrans göstermekle beraber, aynı aile bireylerinde, veya farklı ailelerde değişken klinik ifadenme olabilmektedir (73). *TBX5*, diğer T-box proteinlerinin de özelliği olan hücrenin gelişimsel sürecinin kontrolünden sorumludur ve ekstremité tomurcuklarında ve kalpte ifadenmektedir (62).

MEF2, kalp hücrelerinin gelişimini belirleyen bir diğer transkripsiyon faktörüdür. *MEF2*'nin “a”, “b”, “c” ve “d” olmak üzere dört izoformu bulunmaktadır ve hepsi de kalpte ifadenmektedir. Ancak, bu alt tipler içinde kalp gelişimi ve farklılaşmasında rolü en iyi bilineni *MEF2C*'dir. Kalp gelişimi ve farklılaşmasının merkezinde “çekirdek” genler olarak sayılan *NKX*, *GATA*, *HAND* (heart and neural crest derivatives expressed), *TBX* genlerinin tam merkezinde yer aldığı görülmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinin diğer canlı türlerinde de korunmuş olduğu bilinmektedir (74).

Embriyonik dönemde, *HAND1* (Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1) ventriküllerin ve nöral krest orijinli arkus aorta ve brankial arkların gelişiminde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. *HAND1* mutasyonunun sağ ve sol ventrikül hipoplazisi ve septasyon anomalileri ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (75-77).

Embriyonik gelişim sürecinde Notch proteinleri hücrenin kaderini belirleyen transmembran proteinidir. Bunlar arasından *NOTCH1* geninde mutasyon görülen bireylerde, biküspid aort kapağı, konjenital aort stenozu, aort koarktasyonu,

hipoplastik sol ventrikül, çift çıkışlı sağ ventrikül, VSD, TOF ve mitral stenozu bildirilmiştir (78).

İzole KKH'nın oluşumunda aksiyel orta hat ve/veya sol-sağ paternizasyon sinyallerinin de rolü olduğu bildirilmiştir. Nodal sinyalizasyon yolağı, lateral mezoderm yaprağında sağ-sol lateralizasyonunun oluşumunda kilit rol oynarken bu sinyalizasyon yolağının merkezinde *FOXH1* (forkhead box H1) geninin transkripsiyonel indüksiyonu yer almaktadır. Bu yolaktaki diğer genler olan *GDF1* (Growth Differentiation Factor 1), *CFC1* (cryptic protein) ve *NODAL* (Nodal Growth Differentiation Factor) genlerindeki mutasyonlar sonucunda birçok tipte konjenital kalp anomalilerinin oluştuğu rapor edilmiştir (79).

Transkripsiyon faktörlerinin kalp gelişimindeki önemli rolü bilinmekle birlikte kromatin yapısını modifiye ederek genlerin aktivasyonu ve baskılanmasını sağlayan DNA fiberleri ve histon proteinlerinin, bir başka deyişle epigenetik değişikliklerin rolü hakkındaki bilgi daha kısıtlıdır. *BAF60C*, diğer adı ile *SMARCD*, Swi/Snf-like chromatin-remodelling complex BAF'ın bir alt ünitesi olup kardiyak transkripsiyon faktörlerinin *BAF* kompleksine bağlanmasından sorumlu bir proteindir. *BAFC60C*'deki disfonksiyon ya da miktarındaki azalma, ilişkili transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu engelleyerek ciddi kardiyak anomalilerin gelişimine sebep olmaktadır. *BAF60C* seviyesindeki kısmi düşüklüğün, çıkım yolu oluşum defekti gibi daha lokalize anomalilere sebep olması, kromatin remodelling komplekslerinin regülasyonunun normal kalp gelişimi için yaşamsal önemde olduğunu göstermektedir. *BAF60C* gibi bir histon metil transferaz olan *SMYD1* (SET

And MYND Domain Containing 1) , diğ er adıyla *BOP*, kalp dokusunda büyüme ve farklılaş ma açısından çok önemli bir kromatin regülatörüdür. Ayrıca hipertrofi üzerine etkileri ile öne çıkan histon deasetilazlar da (histon deasetilaz 1 ve 2) kalp gelişiminde önemi olan diğ er epigenetik unsurlardır (80). Kardiyak gelişimden sorumlu güncel NCBI Gene veritabanında sekiz yüz civarında gen bulunduğ u görölmektedir (81). Bu genlerden konjenital kalp hastalıkları ile sıklıkla ilişkilendirilenler, neden oldukları anomalilere göre Tablo 1’de sunulmuştur (82).

Tablo 1. İzole kalp hastalıklarına en sık neden olan genler.

Transkripsiyon Faktörleri		
Gen	Genin açık adı	Sebepl Olduğu Kardiyak Anomali
NKX2-5	NK2 homeobox 5	ASD Atrioventriküler blok TOF Hipoplastik Sol Kalp Interrupted Aortik Ark Heterotaksi TGA DORV VSD Aort koarktasyonu BAT
NKX2-6	NK2 homeobox 6	Trunkus Arteriozus
ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1	TAPVD
CITED2	Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2	VSD ASD
HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2	TOF
IRX4	Iroquois homeobox 4	VSD
GATA4	GATA binding protein 4	ASD AVSD VSD TOF Pulmoner darlık
GATA5	GATA binding protein 5	VSD Biküspit Aorta
GATA6	GATA binding protein 6	Trunkus Arteriozus ASD AVSD PDA TOF VSD

Tablo 1.'in devamı

Gen	Genin açık adı	Sebep Olduğu Kardiyak Anomali
<i>TBX1</i>	T-box 1	VSD Interrupted Aortic Arch
<i>TBX5</i>	T-box 5	ASD VSD AVSD
<i>TBX20</i>	T-box 20	ASD Aort koarktasyonu VSD PDA Hipoplastik Sol Ventrikül ASD
<i>ZFPM2</i>	zinc finger protein, FOG family member 2	TOF DORV
<i>ZIC3</i>	Zic family member 3	Heterotaksi TGA ASD DORV
<i>MED13L</i>	Mediator complex subunit 13 like	BAT
<i>TFAP2B</i>	Transcription factor AP-2 beta	PDA
<i>Sinyal İletim Proteinleri</i>		
Gen	Genin açık adı	Sebep Olduğu Kardiyak Anomali
<i>FOXH1</i>	Forkhead box H1	TOF TGA
<i>HEY2</i>	Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 2	Triküspit Kapak Atrezisi
<i>JAG1</i>	jagged 1	Pulmoner Arter Stenozu TOF
<i>NOTCH1</i>	notch 1	BAT TOF VSD Aort stenozu
<i>NODAL</i>	nodal growth differentiation factor	BAT Heterotaksi TOF AVSD DORV

Tablo 1.'in devamı

Gen	Genin açık adı	Sebepl Olduğu Kardiyak Anomali
ACVR1	Activin A receptor type 1	ASD BAT AVSD
ALDH1A2	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2	TOF
CRELD1	Cysteine rich with EGF like domains 1	ASD AVSD
GJA1	Gap junction protein alpha 1	ASD Sol Kalp Hipoplazisi
PDGFRA	Platelet derived growth factor receptor alpha	TAPVD
SMAD6	SMAD family member 2	Biküspit aorta Aort koarktasyonu Aort stenozu
TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	Çıkım yolu anomalileri
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1	TOF VSD
Yapısal Protein Genleri		
ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	ASD
ELN	Elastin	Supravalvüler Aort Stenozu Pulmoner Arter Stenozu Pulmoner Kapak Stenozu Aort Kapak Stenozu
FLNA	Filamin A	PDA Aort anevrizması
MYBPC3	Myosin binding protein C, cardiac	ASD VSD
MYH6	Myosin heavy chain 6	ASD Aort Kapak Stenozu BAT
MYH7	Myosin heavy chain 7	ASD
MYH11	Myosin heavy chain 11	PDA Aort anevrizması

Kardiyovasküler genetik, tıbbi genetiğin önemli bir konusudur. 1990 yılında kardiyak beta miyozin ağır zinciri kodlayan gendeki bir mutasyonun ailesel hipertrofik kardiyomiyopatiye sebep olduğunun anlaşılmasından sonra bu alanda önemli ilerlemeler sağlanmıştır (83, 84).

Kardiyovasküler genetikte sağlanan ilerlemeler sonucunda ortaya çıkarılan verilerin klinik kullanımının rasyonel kullanımı sorunu ortaya çıkmıştır. Hangi hastalara genetik test uygulanması gerektiğine dair Amerikan Kalp Derneği 2016 yılında bir bildiri yayınlarak bu konuya açıklık getirmiştir. Tablo 2’de hangi durumların kardiyovasküler genetik hastalık açısından araştırılması gerektiği görülmektedir (85).

Tablo 2. Konjenital kalp anomalisi olan hastalarda genetik değerlendirme endikasyonları.

Kardiyak anomaliye eşlik eden gelişme geriliği/entellektüel yetersizlik
Konjenital kalp anomalisi ile birlikte doğumsal anomaliler
Konjenital kalp anomalisi ile birlikte dismorfik bulguların olması
Aynı kardiyak anomalinin birden fazla yakın akrabada görülmesi
Kardiyak anomalisi olan bireyin ebeveynlerinin 3 ve üzerinde gebelik kaybı olması
Konotrunkal kalp defektleri, supravavüler aort stenozu, biküspit aorta, torasik anevrizma ve diseksiyon
Nedeni bulunamamış kardiyomiyopati
Aile hikayesinde ani ölüm öyküsü
Kalıtsal aritmiler ile uyumlu anormal elektrokardiyografik bulguların varlığı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu retrospektif çalışma için, 2005-2016 yılları arasında, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'mize (GHTM) refere edilen 6500 hasta taranmış ve bu hastalar içinden pediatrik yaş grubundaki 68'i erkek, 36'sı kız olmak üzere (ortama yaş:1,97 yıl, SD: $\pm 3,54$), ilk başvurdıkları tarihte detaylı klinik değerlendirmelerinde non-sendromik izole kardiyak bulgusu olan ve/veya konjenital kalp hastalığı olan toplam 104 hasta dahil edilmiştir. Klinik değerlendirmelerinin yanısıra kromozom analizlerinin, FISH ve/veya Array-CGH analizlerinin sonuçlarını kapsayan retrospektif veriler, hastane ve GHTM arşivlerinden elde edilmiştir. Kromozomal anomalileri olan hastalar, erişkin yaş grubundaki hastalar, klinik bulguları ile herhangi bir sendrom ile ilişkilendirilen ve/veya genetik analizler sonrası herhangi bir sendrom ile ilişkilendirilen hastalar çalışma dışı bırakılmışlardır.

3.1 Hastalara Uygulanan Tanısal İşlemler ve Yöntemler

3.1.1 Giemza-Tripsin-Giemza (GTG) karyotip analizi için uygulanan yöntem

Lenfosit doku kültürü için heparinli kan örneğinden yaklaşık 0,5 ml kan, içerisinde 5 ml, %20'lik fetal calf (dana) serumu, %1,5 fitohemaglutinin, %1 (200mM) L-Glutamin, ve 100 µg/ml penisilin/streptomisinden oluşan RPMI 1640 medyumunu bulunan 10 cc'lik steril polistiren tüplere konularak 72 saat süresince 37°C ısıdaki etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonunda ortama kromozomları metafazda durdurmak için 0,1 µg/ml kolşisin eklenmiştir. İki saatlik bekleme süresini tabiken, karışımı içeren tüp 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant

atıldıktan sonra elde edilen pellet üzerine, yavaş bir şekilde 0,075 M KCL solüsyonu vorteksleme esnasında eklenmiş ve yaklaşık 15-20 dk süre ile 37°C'lik etüvde hipotonik çözelti eklenerek bekletilmiştir. Sürenin sonunda tüp 10 dk 1200 rpm'de santrifüj edilerek süpernatanttan ayrılan pelletin üzerine yine vorteks ile karıştırılarak daha önceden hazırlanmış, 3:1 oranındaki metanol/asetik asit çözeltisi eklenerek fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem 3-5 defa pellet yeteri kadar yıkanana kadar tekrarlanmıştır. Yaklaşık beş defa bu yıkama işlemi yapıldıktan sonra tekrar tüpün içindeki süpernatant atılıp alttaki pellet pipet yardımı ile alınarak 50 cm yükseklikten daha önceden temizlenmiş lamlara damlatılarak metafaz yaymaları elde edilmiştir. Elde edilen yaymalar bir gece boyunca 80° C derecedeki kurutucuda bekletildikten sonra daha sonra anlatılacak GTG bantlama işlemi için hazır hale getirilmişlerdir.

3.1.2 High resolution banding (HRB) düzeyinde karyotip analizi için kullanılan yöntem

Prometafaz düzeyinde kromozomların elde edilmesi daha yüksek bant düzeyinde karyotipik incelemeye olanak sağlayacağından HRB tekniği, genetik hastalıklar tanı merkezimizde son yıllarda daha fazla sayıdaki hastada uygulanmıştır.

Bu teknikte 72 saatlik inkübasyon döneminin 48. saatinde yukarıda içeriği anlatılmış lenfosit doku kültürünün içerisine 10^{-2} M, 0,5 ml metotreksat (MTX) eklenmiştir. MTX eklenmesinden 17 saat sonra tüp 1200 rpm'de santrifüj edilip süpernatant atılarak geride kalan pellet üzerine 5 ml taze medyum ile birlikte 50 µl 5-

bromo-2'-deoksiüridin (BrDU, 10^{-3} M) eklenerek 37°C derecede inkübasyona devam edilmiştir.

Son işlemiden 5-6 saat sonra lenfosit kültürünün içine 0,1 µg/ml kolşisin eklenerek kromozomların prometafaz aşamasında kalmaları sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra, yukarıda GTG bantlama için izlenen yöntem ile aynı şekilde yapılarak preparatlar bir gece boyunca 80 °C derecedeki kurutucuda bekletildikten sonra GTG bantlama için hazır hale getirilmiştir.

3.1.3 GTG bantlama tekniği

Yaymaları yukarıdaki şekilde yapılmış preparatlar yeni hazırlanmış 0,04 g tripsin ve 80 ml PBS içeren şalede 3 dk kadar bir süre kromozomlar üzerinde bulunan non-histon proteinlerin lizise uğramaları amacıyla bekletilir. Sürenin sonunda sadece PBS solüsyonu içeren diğer bir şaleye batırılarak tripsini giderilir ve preparat içinde 13 cc 41 numaralı filtre kağıdı ile süzölmüş Giemza boyası ve 35'er cc A ve B solüsyonları bulunan üçüncü şalede 3-5 dk kadar bekletilir. Sürenin sonunda preparat distile su ile yıkanarak karyotipik inceleme için hazır hale getirilir.

3.1.4. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) tekniği

Lenfosit kültüründen FISH yapılırken kullanılacak preparat yayma yapıldıktan sonra aynı gün aşağıdaki işlemlerden geçirilmiştir.

Preparatların Ön Yıkama ve Denatürasyon İşlemi:

1. Preparat 1 dk süre ile sırasıyla %100-70-50-30'luk etanol serisinden geçirilerek dehidratasyon sağlanmıştır.
2. Dehidre edilen preparatlar 0.1xSSC çözeltisinde 1 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
3. Ardından preparat Benmari banyosunda 70°C derecedeki 2xSSC içinde 30 dakika bekletilmiştir.
4. Preparatlar 1 dakika oda ısısında 0,07 M'lık NaOH solüsyonunda bekletilerek denatürasyon yapılmıştır.
5. Denatürasyonu takiben preparat 1 dakika +4°C derecede 0,1xSSC ve yine 1 dakika +4°C derecede 2xSSC solüsyonlarında bekletilmiştir.
6. Preparatlar %30-50-70-100'lük alkol serisinden geçirilmiş ve kurumaya bırakılmıştır.

Kullanılan solüsyonlar ve içerikleri:

20xSSC Solüsyonu:

NaCl (3M)	175,3 gr
Tri-Sodyum Sitrat	88,2 gr
Distile su	1000 ml

0,1xSSC Solüsyonu:

20xSSC	3 ml
Distile su	1000 ml

Tüm solüsyonlar HCL ile Ph 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

0,07 M'lık NaOH solüsyonu:

1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

Hibridizasyon:

1. Preparata uygulanacak probun bulunduğu ependorf tüpleri kullanım öncesinde kısa süreli santrifüj uygulanarak tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır

2. Prob (22q11.2 lokusunda yer alan TUPLE ve/veya N25 bölgelerine spesifik) mikropipet yardımı ile tüpten çekilerek denatürasyonu yapılmış preparata mümkün olduğu kadar homojen bir şekilde uygulanmış ve üzeri altında hava kabarcığı kalmayacak şekilde bir lamel ile kapatılmıştır.

3. Lamel çevresi su girmesini önleyecek bir yalıtkan ile kapatılmıştır.

4. Preparat nemlendirilmiş hibridizasyon cihazına konularak 1 gece boyunca hibridizasyona bırakılmıştır. Hibridizasyon cihazı (Vysis-Hybrite™ Slide Stainers, Model 30102720) preparatı DNA denatürasyonu için 5 saniye 73°C dereceye çıkardıktan sonra 1 gece boyunca 37°C derecede tutacak şekilde programlanmıştır.

Hibridizasyon Sonrası Yıkama İşlemi:

1. Hibridizasyon işlemi tamamlanan preparatın üzerindeki lamelin su almasını engellemek amacıyla daha önce uygulanmış yalıtım maddesi dikkatlice çıkarılmıştır.

2. Preparat oda ısısındaki 2xSSC solüsyonunda hafifçe uygulanan çalkalama hareketi ile yıkanmıştır.

3. Preparat daha sonra benmari banyosunda 74 °C dereceye ısıtılmış 1xSSC solüsyonu içinde 5 dakika bekletilmiştir.

4. Daha sonra oda ısısındaki 2xSSC/T-20 solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir.

5. Yıkama işlemi bittikten sonra prob eklenmiş bölgeye homojen bir şekilde DAPI eklenerek üzeri lamel ile örtülmüştür. Preparat karanlık ortamda incelemesi yapılana kadar muhafaza edilmiştir.

Yıkama solüsyonlarının içeriği şu şekildedir;

1xSSC Solüsyonu:

20xSSC	10 ml
Distile su	190 ml

2xSSC Solüsyonu:

20xSSC	20 ml
Distile su	180 ml

2xSSC/Tween-20 Solüsyonu:

20xSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tüm solüsyonların Ph değerleri HCL ile 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Preparatın Analizi:

Preparat floresan mikroskop ile uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir. Her olgu için prob başına en az beşi metafaz plağı olmak üzere 30 hücre sitogenetik alanında deneyimli genetik uzmanları tarafından değerlendirilmiştir.

3.2 Array-CGH (Comperative Genomic Hybridization) Uygulaması

3.2.1 Array-CGH’de kullanılacak DNA’nın eldesi

Spin kolon yöntemi:

1. 1,5 ml’lik mikrofüj tüpüne 500  l buffer AP1 konulmuştur.
2. Buffer  zerine yaklaşık 250  l EDTA’lı kan  rneği eklenmiştir. Mikrofüj tüpünün kapağı kapatıldıktan sonra maksimum hızda vortekslenmiştir.
3. Karışımın  zerine 100  l buffer AP2 ilave edildikten sonra 10 saniye daha vortekslenmiştir. Spin kolonlara (Axygen Scientific, ABD) aktarılmıştır.
4. 12000 rpm’de 10 dakika ortam sıcaklığında santrifüj edilerek hücresel artıkların çökelmesi sağlanmıştır.
5. 2 ml mikrofüj tüpü içerisine miniprep kolon yerleştirilmiştir. Bir  nceki adımdaki işlemden sonra belirginleşen süpernatant miniprep kolonlara aktarılmıştır. 12000 rpm’de bir dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
6. 2 ml mikrofüj tüpünün altındaki s z lm ş sıvı boşaltıldıktan sonra miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. Önceden etanol eklenmiş 700  l W1A miniprep kolonların üzerine eklenmiş ve 2 dakika kadar oda ısısında bekletilmiştir. Sonrasında yine 12000 rpm’de 1 dakika kadar santrifüj uygulanmıştır.
7. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltılmış ve miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. 800  l buffer W2 miniprep kolonun üzerine eklenerek 12000 rpm’de tekrar santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

8. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltıldıktan sonra miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne yeniden yerleştirilmiştir. 500 µl buffer W2 miniprep kolonun üzerine eklenerek 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece buffer W2 ile iki kez yıkanmış ve tuzların arındırılması sağlanarak enzimatik reaksiyonlar sırasında bu nedenle oluşabilecek problemler elimine edilmiştir.

9. Mikrofüj tüpünün altına süzülen sıvı boşaltıldı. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirildikten sonra 12000 rpm’de santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

10. Miniprep kolon 1,5 ml’lik mikrofüj tüpüne yerleştirilmiştir. Önceden 65 °C dereceye ısıtılmış 80-200 µl buffer TE eklenmiştir. Bir dakika oda ısısında bekletildikten sonra 12000 rpm’de bir dakika süre ile santrifüj edilerek genomik DNA elde edilmiştir.

Tuzda çöktürme yöntemi ile DNA eldesi:

1. EDTA’lı tüpe alınmış 5 ml kan örneği üzerine 10 ml soğuk steril bidistile su eklenerek çalkalandıktan sonra 2200 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

2. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra pelletin üzerine 1500 µl lysis buffer (10 Mm TrisCl, 400 Mm NaCl, 2 Mm Na₂EDTA Ph:8.2), 35µL proteinaz K, 1000µl SDS (%10) eklenerek bir gece 37°C derecede bekletilmiştir.

3. Ertesi gün 1000µl 10 Mm amonyum asetat karışıma eklendikten sonra vortekslenmiş ve 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Başka bir tüpe aktarılan süpernatantın üzerine iki katı oranında soğuk absolü etanol eklenmiştir.

5. Belirginleşen DNA 250 µl TE (10 Nm Tris-HCL, 1 Mm Na₂EDTA pH:7,5) içeren ependorfa alınmış, 1 gün oda ısısında çözündükten sonra -20°C derecede saklanmıştır.

3.2.2 Elde edilmiş DNA'nın konsantrasyonunun ölçümü ve kalitesinin değerlendirilmesi

Elde edilen DNA konsantrasyonu spektrofotometre (Nanodrop ND-1000, ABD) cihazı ile ölçülmüştür. DNA'nın analiz için uygunluğu 260/280 değerine (1,6-1,9) ve optik densitesine göre (30-70 ng/µl) göre değerlendirilmiştir. Ayrıca DNA %1'lik agaroz jelde yürütülerek degrade olmadığından emin olunmuştur. Moleküler karyotiplemede 33 ng/µl DNA kullanılacağından, bu miktardaki DNA'ya elde edilmiş olan DNA'nın 1xTE (TrisEDTA) buffer ile dilüsyonu ile ulaşılmıştır.

3.2.3 Tüm genom amplifikasyonu

Bu basamakta ve sonraki basamaklarda kullanılacak olan malzemeler sağlayıcı firma tarafından tedarik edilmiştir.

Gerekli malzemeler:

- Cyto 10x Denatürasyon Solüsyonu (DS)(-20 °C)
- Cyto 10x Nötralizasyon Solüsyonu (NS)(-20 °C)

- Cyto Amplifikasyon reaksiyon Bufferi (-20 °C)
- Cyto Amplifikasyon enzimi (-20 °C)
- Cyto Water (oda ısısı)
- 1,5 ml'lik efendorf

Yöntem:

1. DS, NS ve Amplifikasyon bufferi -20 °C dereceden oda ısısına çıkarılarak çözünmesi beklenmiştir. Amplifikasyon bufferi çözündükten sonra iyice vortekslendikten sonra maksimum hızda spin yapıp buzda bekletilmiştir. DS ve NS ise oda ısısında bekletilmiştir.

2. 10x DS ve 10x NS, 1x haline dilüsyon yapılarak getirilmiş olup, işlemten sonra vorteks ve spin uygulanmıştır.

3. 1,5 ml'lik ependorflara 33 ng/μl'ye dilüe edilmiş genomik DNA'dan üç μl konulur ve bu şekilde ependorfa yaklaşık olarak 100 ng DNA konulmuş olur.

4. İçinde 100 ng DNA bulunan bu efendorfun içine 1xDS 'den 3 μl eklenmiş ve vortekslenmiştir.

5. 3 dakika oda ısısında bekletildikten sonra örneğin üzerine 1xNS'den 6 μl eklenip vortekslendikten sonra buz içinde konulmuştur.

6. Buz içinde bulunan amplifikasyon bufferdan 50 μl ve -20 °C derecedeki amplifikasyon enziminden 2,5 μl eklenerek elde edilmiş toplam 64,5 μl'lik örnek vortekslenmiştir.

7. Hazırlanan örnek amplifikasyon için 30 °C dereceye ısıtılmış döngüleyiciye (thermal cycler) yerleştirilmiştir. Döngüleyici programı Tablo 3’te sunulmuştur.

Tablo 3. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Cyto Amplifikasyon Programı

<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>
30 °C	16 saat
65 °C	3 dakika
4 °C	Bekleme

3.2.4 Pürifikasyon

Gerekli Malzemeler:

- Cyto Elution Buffer (oda ısısında)
- Cyto Pürifikasyon Yıkama Buffer (oda ısısında)
- Cyto Magnetic Bead (+4 °C)

Yöntem:

1. Kit açıldıktan sonra Cyto pürifikasyon yıkama buffer solüsyonuna %100 saflıkta etanolden 10,5 ml eklenmiştir
2. +4 °C dereceden çıkarılan Cyto Magnetic Bead vortekslenerek homojenize edilmiştir.
3. 64,5 µl’lik amplifiye edilmiş örnekler, tabanı düz, 2 ml’lik ependorflara konularak üzerlerine 90 µl Magnetic Bead eklenmiştir.

4. Karışım 10 defa pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra manyetik alan üzerine alınmıştır. Karışım tamamen şeffaflaştıktan sonra (yaklaşık 5 dakika) işleme devam edilmiştir.

5. Magnetic beadlara bağlanan ve ependorfun manyetik alan tarafında kalan DNA'ya dokunulmadan şeffaf süpernatant pipet ile ortamdan uzaklaştırılmıştır.

6. Manyetik alandan çıkarılan ependorf üzerine daha önceden absolü etanol eklenmiş halde bulunan Cyto pürifikasyon yıkama bufferinden 200 µl eklenmiştir. 1 dakika kadar oda ısısında bekletildikten sonra yine manyetik alana alınarak şeffaflaşana kadar (yaklaşık 1 dakika) bekletilmiş ve karışımın üzerinde oluşan şeffaf süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem aynı şekilde 2 kez daha tekrarlanmıştır.

7. Ependorf içindeki çökeltinin kurumasına izin vermeden 50 µl Cyto elution buffer ilave edilmiş ve 10-30 dakika içerik homojenize olana kadar en yüksek hızda vorteksleme yapılmıştır.

8. 1500 rpm'de 1 dakika kadar spin yapıldıktan sonra, manyetik alan üzerinde 15 dakika ependorfun kapağı kapalı, 15 dakika kadar da kapak açık şekilde bekletilmiş ve karışımın üzerinde biriken şeffaf süpernatant (yaklaşık 45 µl) başka bir ependorfa alınmıştır.

9. Vorteksleme yapıldıktan sonra spektrofotometrede ölçüm yapılmadan önce örnek 1:10 oranında dilüe edilmiştir. Ölçümde dansitenin 1-2 µg/ml, optik dansite 260/280 oranının 1,6-1,9 olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.5 Fragmentasyon- işaretleme

Bu aşamada amplifiye edilmiş ve saflaştırılmış genomik DNA parçalara ayrılarak işaretleme yapılmıştır.

Gerekli Malzemeler:

1. Cyto Frag-Label Buffer (-20 °C)
2. Cyto Frag-Label Enzimi (-20 °C)

Yöntem:

1. Cyto Frag-Label Buffer oda ısısında çözündürüldükten ve vortex-spin yapıldıktan sonra, Cyto Frag-Label enzimi ise doğrudan buz üzerine yerleştirilmiştir.

2. Buz üzerine yeni bir ependorfa saflaştırılmış DNA örneğinden 37 µl konulduktan sonra üzerine 10 µl Frag-Label Buffer, 3 µl Frag-Label enzimi eklenerek elde edilmiş olan toplam 50 µl'lik karışım vorteks ve spin işlemlerini takiben Tablo 4'de verilen programa göre ısı döngüleyiciye yerleştirilmiştir.

Tablo 4. Isı döngüleyicinin fragmentasyon ve işaretleme işlemi sırasındaki programı
Cyto Frag-Label Programı

<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>
37°C	2 saat
95°C	10 dakika
4°C	Bekleme

Reaksiyon sırasında örnek, fragmentasyon kontrolü için %4 konsantrasyondaki agaroz jelde yürütülmüştür. 2,5 µl örnek, 2,5 µl orange dye ile

boyanarak marker eşliğinde jele yüklenmiş, 140 voltta 20 dk yürütülmüştür. Bant yoğunluğu 50-200 bp arasında görülerek fragmantasyonun gerçekleştiği kontrol edilmiştir.

3.2.6 Hibridizasyon

Hibridizasyon aşaması için array çiplerini sağlayan firmaya ait hibridizasyon fırını kullanılmıştır.

Gerekli Malzemeler:

1. Cyto Hibridizasyon Buffer (-20 °C)
2. Array çipi
3. Hibridizasyon fırını

Yöntem:

Hibridizasyon bufferi kullanılmadan önce 15 dk buzda bekletilmiştir. Sonrasında buz üzerindeki her bir örnek 100 µl hibridizasyon bufferi eklenerek elde edilen 147,5 µl hacmindeki örnek vorteks-spin yapıldıktan sonra denatüre edilmek üzere tablo 5'teki programa göre ısı döngüleyiciye yüklenmiştir.

Tablo 5. Isı döngüleyicide uygulanan denatürasyon programı

Cyto Frag-Label Programı

<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>
37°C	2 saat
95°C	10 dakika
4°C	Bekleme

1. Denatüre edilmiş örnekten 130 µl mikropipet ile alınıp array çipinin üzerindeki bölmeye dikkatlice yüklenmiştir.

2. Yükleme sonrasında bölmeler kapatılarak 50 °C dereceye ısıtılmış hibridizasyon fırınında 60 rpm'de çevrilecek şekilde 16-19 saat süreyle inkübe edilmiştir.

3.2.7 Yıkama, boyama ve arraylerin taranması

Bu aşamada arraylere yıkama ve boyama işlemi yapılır ve sonrasında analiz edilmesi için tarama yapılmıştır. Bu aşamada da sağlayıcı firmaya ait cihazlar kullanılarak yıkama, boyama ve tarama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Gerekli Malzemeler:

1. Sıvı istasyonu
2. Tarayıcı
3. 1,5 ml ependorf (doğal, mavi ve kırmızı)
4. Sitogenetik Reagent kiti:
 - a. Cyto Boyama Buffer 1 (4 °C-amber)
 - b. Cyto Boyama Buffer 2 (4 °C-amber)
 - c. Cyto Holding Buffer (4 °C-amber)
 - d. Cyto Yıkama Buffer A (oda sıcaklığı-turuncu)
 - e. Cyto Yıkama Buffer B (oda sıcaklığı-turuncu)

Yöntem:

1. Yıkama istasyonunda bulunan boş şişelere 500 ml Cyto Yıkama Buffer A ve B eklenmiştir. Su şişesi doldurulmuş, çöp şişesi boşaltıldıktan sonra sistem ön yıkama yapması için çalıştırılmıştır.

2. Bu sırada 4 °C derecede bulunan Cyto Boyama Buffer 1 ve 2 ile Holding Buffer oda ısısında bekletilmiş ve 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır.

3. 1,5 ml'lik renkli tüplerde bulunan Cyto Boyama Buffer 1 ve 2 ile Holding Buffer yıkama istasyonuna yerleştirilmiştir. Cihaz uygun protokolde çalıştırılmıştır. Sonra kartuş kartları array çiplerini yerleştirmek üzere açılmıştır.

4. Hibridizasyon fırınından alınan çipin üzerindeki etiket açıldıktan sonra yıkama istasyonunda yıkama ve boyama işlemi yapılmıştır.

5. Program sonlandığında array çipi çıkarılarak bölgelerin üzeri tekrar etiket ile kapatılmıştır. Tarama yapılacak bilgisayara barkodları okutturularak array çipi tarayıcıya yüklenmesi sonrasında sistem çalıştırılarak tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bufferların hangi tüpe konulacağı ve tüpün içereceği sıvı hacmi tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Yıkama ve holding bufferlerin tüplere bölünmesi

<u>Reagent</u>	<u>Tüp rengi</u>	<u>Tüpe konulan sıvı hacmi</u>
Cyto Boyama Buffer 1	Amber	500 µl
Cyto Boyama Buffer 2	Mavi	500 µl
Cyto Holding Buffer	Natural	800 µl

3.2.8 Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmada Array-CGH, 8x60K ISCA yöntemi ile yapılmıştır. Sonuçlar “Chromosome Analysis Suite (ChAS) v1.2.1 Software (Affymetrix)” ve “Agilent® CytoGenomics 3.0.6.6” programları ile analiz edilmiştir. Olgulara ait veriler “CEL” dosyasına dönüştürülmüş ve analiz edilmek üzere taramaların gerçekleştirildiği sistemin yüklü olduğu bilgisayardan analizlerin gerçekleştirileceği Anabilim dalımızdaki bir bilgisayara taşınmıştır. Analizlerin yapılacağı bilgisayara;

- Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS) v1.2.1,
- Agilent® CytoGenomics 3.0.6.6,
- Cytogenetics Array NetAffix® Analysis fileset NA32 (hg19)

programları firma tarafından yüklenmiştir.

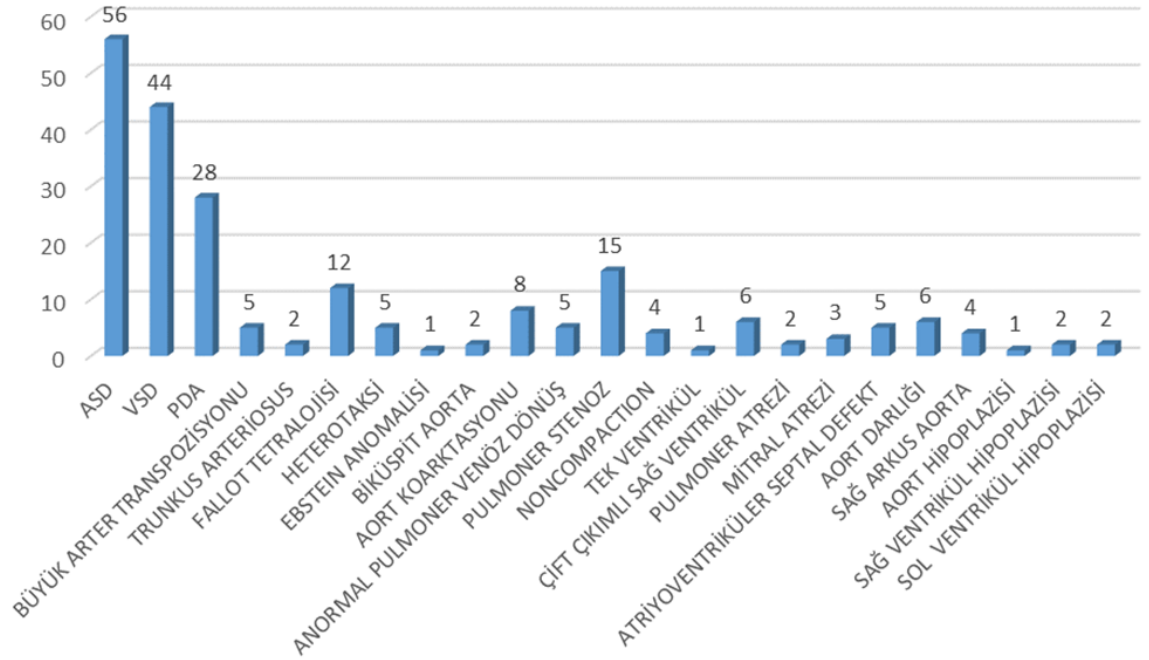
Bu programlar yüksek çözünürlükte bir “CytoScan Array” ile kullanıldığında submikroskopik yeniden düzenlemelerin tespitine ve analizine olanak sağlamaktadır. Kromozomal anomaliler açısından araştırılan hastaların verilerinin yorumlanmasına, bulunan değişikliklerin karyogram üzerinde ve bazı grafiklerde gösterilmesine, değişikliğin içerdiği genleri ve bu genleri veri tabanında araştırmayı sağlayan bağlantıları içermesi nedeniyle sitogenetik araştırmalara imkan vermektedir (86).

Çalışmada araştırılan olgularda tespit edilen kayıp ve kazançlar için 100 Kb’lik sınır belirlenmiştir. Daha küçük değişiklikler, gen içerip içermeme durumuna göre değerlendirilmiştir.

Sonuçlarda belirlenmiş değişiklikler DECIPHER (Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using Ensemble Resources), Ensemble (Genome Browser), DGV (Database of Genomic Variants) ve ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations) gibi internet veri tabanları ile OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) ve PubMed (the U.S. National Library of Medicine) gibi online kütüphaneler kullanılarak değerlendirilmiştir (87-92).

4. BULGULAR

Detaylı klinik değerlendirmelerinde non-sendromik izole kardiyak bulgusu olan ve/veya konjenital kalp hastalığı (Şekil 1’de sunulmaktadır) olan 104 çocuk hastanın 68’i erkek (%65,4), 36’sı kızdır (%34,6) ve yaş ortalamaları da 1,97 yaştır ($\pm$ 3,54 SD).



Şekil 1: Hastaların kardiyak anomalilerinin detayları ve dağılım sıklığı.

Hastaların yaşları, cinsiyet dağılımları, dismorfik bulguları ve kalp anomalileri ile FISH ve Array-CGH analizlerinin sonuçları tablolar halinde sunulmaktadır (Tablo 7-10). Yüzdört hastanın 96’sına 22q11.2 delesyon sendromları

açısından ilgili kritik bögenin kayıplarını gösterebilmek amacıyla FISH analizi yapılmış, 14 hastada delesyon belirlenmiştir (Tablo7). Delesyon saptanan bu 14 hastanın 10'unda displastik kulak, beş hastada retro ya da mikrognati, dört hastada parrot-like (papağan) şeklinde burun yapısı, dördünde derin yerleşimli gözler, dördünde tek palmar transvers çizgi tespit edilmiştir (Tablo 7). Brakisefalik kafa yapısı üç hastada görülürken, yüksek damak ve hipertelorizm üç hastada mevcuttu. Daha nadir olarak pes ekinovarus, hipertelorizm, üstten yerleşimli ayak parmakları, çürük dişler ve abdominal herni iki hastada görülmüştür. Mikrosefali, frontal bossing, upslanted palpebral fissürler, yarık damak, kriptorşid testisler, epilepsi, entelektüel yetersizlik ve sublingual tirod dokusu nadir görülen anomalierdir. Erişkin yaştaki 22q11.2 delesyon sendromu olan hastalarda görülen skolyoz, bir hastamızda tespit edilmiştir. Hastalardan 85 ve 87 numaralı hastaların postoperatif dönemde eksitus oldukları öğrenilmiştir (Tablo 7). Delesyon saptanmayan altı hasta ile klinik değerlendirme sonrası direk moleküler sitogenetik analize yönlendirilen sekiz hasta olmak üzere, on dört hastada yapılan Array-CGH analizlerinin sonuçları Tablo 8, 9 ve 10'da sunulmaktadır

Tablo 7. Hastaların yaşları, cinsiyet dağılımları, kardiyak anomalileri ve belirgin dismorfik bulguları ile yapılmış olan tanısal testleri.

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KALP ANOMALİSİ	22q11.2 FISH	ARRAY	DİSMORFİK ÖZELLİKLER
1	18 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt	Normal		Skolyoz, İnguinal Herni
2	2 gün	Erkek	Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Stenoz, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Hipospadias
3	16ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül	Normal		Pektus Carinatum, Skolyoz
4	12 gün	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Pulmoner Atrezi	Normal		
5	1 yaş	Kadın	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal	Yapılmış	Hipotelorizm, gelişimsel gerilik, derin yerleşimli gözler
6	5 gün	Erkek	Ventriküler Septal Defekt	Normal		Tek Palmar Transvers Çizgi, Down Slant Palpebral Fissür , Velofaringeal Yetmezlik
7	2 ay	Kadın	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Atriyoventriküler Septal Defekt, Sağ Ventrikül Hipoplazisi	Normal		Sakral Agenezi, Doğuştan Kalça Çikiği
8	3 ay	Erkek	Aort Stenozu	Normal		Kriptorşidizm, Hipertelorizm
9	9 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Biküspit Aorta, Pulmoner Stenoz	Normal		
10	3 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		
11	2 gün	Kadın	Atrial Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Biküspit Aorta, Pulmoner Stenoz	Normal		
12	16 gün	Erkek	Büyük Arterlerin Transpozisyonu	Normal		Retrognati
13	2 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Büyük Arterlerin Transpozisyonu, Pulmoner Atrezi	Normal		
14	3 gün	Erkek	Pulmoner Atrezi, Sağ Ventrikül Hipoplazisi	Normal		
15	1.5 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Noncompaction, Pulmoner Stenoz	Normal		Kriptorşidizm
16	6 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt	Normal		Tek Palmar Transvers Çizgi
17	11 ay	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Klinodaktili, Hemivertebral
18	6 ay	Erkek	Atriyoventriküler Septal Defekt	Normal	Yapılmış	
19	1 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt	Normal		Preauriküler Skin Tag
20	18 ay	Kadın	Atrial Septal Defekt, Fallot Tetralojisi	Normal		

Tablo 7'nin devamı

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KALP ANOMALİSİ	22q11.2 FISH	ARRAY	DİSMORFİK ÖZELLİKLER
21	3 ay	Kadın	Atriyoventriküler Septal Defekt	Normal		Klinodaktili
22	1 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Aort Koarktasyonu	Normal		
23	2 gün	Kadın	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi	Normal		
24	18 ay	Erkek	Ventriküler Septal Defekt	Normal	Yapılmış	Yarık Damak Dudak, Hipospadias
25	10 yaş	Erkek	Ventriküler Septal Defekt	Normal		
26	1 gün	Erkek	Fallot Tetralojisi	Normal		Omfalosele, İnguinal Herni
27	8 yaş	Erkek	Ventriküler Septal Defekt	Normal		Polidaktili
28	6 ay	Kadın	Patent Duktus Arteriyosus	Normal		
29	12 ay	Kadın	Fallot Tetralojisi	Normal		
30	6 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt	Normal		Hipertelorizm
31	10 gün	Kadın	Atriyal Septal Defekt	Normal		Tek Palmar Transvers Çizgi
32	2 gün	Erkek	Fallot Tetralojisi	Normal		
33	2 yaş	Kadın	Ventriküler Septal Defekt	Normal		Trakeo-özofagial Fistül
34	3 gün	Erkek	Mitral Atrezi, Aort Koarktasyonu	Normal	Yapılmış	
35	3 ay	Kadın	Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Mikroretrognati, Kolobom
36	10 yaş	Kadın	Atriyoventriküler Septal Defekt	Normal		Blefarofimozis
37	9 yaş	Erkek	Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Skin Tag
38	11 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Çift Çıkımlı Sağ Venrikül	Normal		Down Slant Palpebral Fissür ,Yarık Damak Dudak
39	19 gün	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt	Normal		Mikrognati
40	3 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt	Normal		Umbilikal Herni

Tablo 7'nin devamı

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KALP ANOMALİSİ	22q11.2 FISH	ARRAY	DİSMORFİK ÖZELLİKLER
41	7 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Büyük Arterlerin Transpozisyonu	Normal		
42	40 gün	Erkek	Patent Duktus Arteriyosus, Aort Koarktasyonu	Normal	Yapılmış	Hipertelorizm
43	12 ay	Erkek	Fallot Tetralojisi	Normal		
44	1 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Aort Koarktasyonu, Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi	Normal		Sığ Orbita
45	9 ay	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Klinodaktili
46	4.5 yaş	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Stenoz, Noncompaction	Normal		Displastik Kulaklar
47	3 ay	Kadın	Fallot Tetralojisi	Normal		Hipertelorizm
48	19 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt	Normal		Nistagmus
49	4 gün	Erkek	Büyük Arterlerin Transpozisyonu, Pulmoner Stenoz, Tek Ventrikül	Normal		
50	10 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt	Normal		
51	7 ay	Kadın	Heterotaksi	Normal		Hipertelorizm, Skolyoz
52	3 ay	Kadın	Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Umbilikal Herni
53	2.5 ay	Kadın	Atrial Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		Upslanted Palpebral Fissürler
54	15gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		
55	15 gün	Erkek	Fallot Tetralojisi	Normal		Hemivertebra
56	20 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt	Normal		Kriptorşidizm, Mikrosefali
57	21 ay	Kadın	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Biküspit Aorta	Normal		
58	7,5 yaş	Erkek	Heterotaksi	Normal		
59	13 yaş	Erkek	Atrial Septal Defekt	Normal		Entelektüel Yetersizlik, İşitme Kaybı
60	1 gün	Erkek	Trunkus Arteriosus	Normal		

Tablo 7'nin devamı

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KALP ANOMALİSİ	22q11.2 FISH	ARRAY	DİSMORFİK ÖZELLİKLER
61	7,5 yaş	Erkek	Aort Darlığı	Normal		İşitme Kaybı
62	1 ay	Erkek	Ventriküler Septal Defekt, Aort Koarktasyonu	Normal		
63	5 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt	Normal		Diyafram Hernisi
64	5.5 yaş	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt	Normal		
65	4 ay	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Stenoz, Mitral Atrezi, Sol Ventrikül Hipoplazisi	Normal		
66	2 ay	Kadın	Atriyal Septal Defekt	Normal		
67	2 gün	Kadın	Heterotaksi, Çift Çıkımlı Sağ Venrikül, Atriyoventriküler Septal Defekt	Normal		Hipertelorizm,Rocker-Botton Feet
68	1.5 yaş	Erkek	Atriyal Septal Defekt	Normal		İnguinal Herni, Klinodaktili
69	11 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi	Normal		Yarık Damak Dudak
70	1 yaş	Erkek	Noncompaction	Normal		
71	14 gün	Erkek	Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Pulmoner Stenoz	Normal		Hipotoni
72	3 ay	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		
73	1 ay	Kadın	Atriyal Septal Defekt	Normal		
74	1 gün	Erkek	Sol Ventrikül Hipoplazisi	Normal		Tek Umbilikal Arter
75	1 gün	Kadın	Atriyal Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Normal		
76	16 yaş	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Stenozi, Çift Çıkımlı Sağ Venrikül	Normal		Pektus Karinatum, Skolyoz
77	2 gün	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Büyük Arterlerin Transpozisyonu	Normal		
78	5 yaş	Erkek	Aort Darlığı	Normal		
79	8 yaş	Erkek	Atriyal Septal Defekt	Normal		Tek Palmar Transvers Çizgi, Klinodaktili
80	27 ay	Kadın	Atriyal Septal Defekt, Pulmoner Stenoz, Noncompaction	Normal		

Tablo 7'nin devamı

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KALP ANOMALİSİ	22q11.2 FISH	ARRAY	DİSMORFİK ÖZELLİKLER
81	7.5 yaş	Erkek	Aort Darlığı	Normal		
82	15 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Aort Koarktasyonu, Sağ Arkus Aorta	Delesyon		Hipertelorizm, Brakisefali, Displastik Kulak, Kubbe Damak, Motor Gelişim Geri
83	2 ay	Kadın	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Delesyon		Yarık Damak Dudak, Parrot Like Burun, Retrogati, Displastik Kulaklar
84	7 yaş	Erkek	Fallot Tetralojisi	Delesyon		Hipertelorizm, Tek Palmar Transvers Çizgi, Burun Kökü Geniş, Çürük Dişler
85	3 ay	Erkek	Ventriküler Septal Defekt, Sağ Arkus Aorta	Delesyon		Displastik Kulaklar, Retrognati, Exitus
86	3 ay	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Sağ Arkus Aorta	Delesyon		Parrot-Like Burun, Retrognati,
87	2 ay	Erkek	Fallot Tetralojisi	Delesyon		Umbilikal Herni, Brakisefali, Displastik Kulaklar, Küçük Ağız, Retrognati, Exitus
88	10.5 yaş	Erkek	Fallot Tetralojisi	Delesyon		Skolyoz, Motor Gerilik, Entelektüel Yetersizlik, Displastik Kulaklar, Çürük Dişler, Down Slant Palpebral Fissür , Konuşma Gecikmesi
89	16 yaş	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Stenoz, Sağ Arkus Aorta	Delesyon		Brakisefali, Derin Yerleşimli Gözler, Parrot-Like Burun, Ağızda Asimetri
90	3 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Delesyon		Pes ekinovarus, Tek Palmar Transvers Çizgi, Düşük Yerleşimlive Posterior Rotated Kulaklar,
91	1 gün	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Çift Çıkımlı Sağ Venrikül, Aort Darlığı	Delesyon, Maternal		Hipertelorizm, Mikroti, Mikrognati, Kubbe Damak, Anteverte Nostril
92	3 yaş	Kadın	Atrial Septal Defekt, Pulmoner Stenoz	Delesyon		Mikrosefali, Yutma Güçlüğü, Konuşma Gecikmesi, Yüksek Damak, Derin Yerleşimli Gözler
93	9.5 yaş	Kadın	Aort Koarktasyonu	Delesyon		Upslanted Palpebral Fissürler, Tek Palmar Transvers Çizgi, Derin Yerleşimli Gözler, Displastik Kulaklar, Sublingual Tiroid Dokusu
94	4 ay	Erkek	Pulmoner Stenoz	Delesyon		Mikrognati Epilepsy Inguinal Herni, Displastik Kulaklar, Kronik Seröz Otit
95	4 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Fallot Tetralojisi	Delesyon		Tek Umbilikal Arter, Hipospadias, Pev, Kriptorşidizm, Düşük Yerleşimli Kulaklar, Tek Palmar Transvers Çizgi
96	6 yaş	Kadın	Atrial Septal Defekt, Büyük Arterlerin Transpozisyonu, Aort Koarktasyonu	Yapılmamış	Yapılmış	
97	3 yaş	Kadın	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi, Heretotaksi	Yapılmamış	Yapılmış	Klinodaktili, Füsiform Parmaklar
98	16 ay	Erkek	Ventriküler Septal Defekt	Yapılmamış	Yapılmış	Gastroözofagial Reflü, Hipospadias, Hipertelorizm
99	2 yaş	Erkek	Ventriküler Septal Defekt, Pulmoner Stenoz, Aort Darlığı	Yapılmamış	Yapılmış	
100	5 gün	Erkek	Atrial Septal Defekt, Ebstein Anomalisi	Yapılmamış	Yapılmış	Plegiosefali, Tek Palmar Transvers Çizgi

Tablo 7'nin devamı

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KALP ANOMALİSİ	22q11.2 FISH	ARRAY	DİSMORFİK ÖZELLİKLER
101	2 gün	Kadın	Atriyal Septal Defekt	Yapılmamış	Yapılmış	Entelektüel Yetersizlik, Epikantus,Hipertelorizm
102	1 gün	Kadın	Ventriküler Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus, Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi	Yapılmamış	Yapılmış	Prematürite, Palpebral Aralık Yukarı Yönlü, Blefarofimosis, Kulaklar Arkaya Dönük
103	10 gün	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt	Normal	Yapılmış	Tek Palmar Transvers Çizgi, Hipertelorizm
104	1 gün	Erkek	Atriyal Septal Defekt, Patent Duktus Arteriyosus	Yapılmamış	Yapılmış	Hipertelorizm

Tablo 8. Array-CGH analizi yapılan hastaların sonuçları

S.NO	YAŞ	CİNSİYET	KARDİYAK ANOMALİLER	FISH	ARRAY SONUÇLARI
5	1gün	Kadın	ASD,VSD,PDA	Normal	21q22 del 4218 Kb del (patojenik), 12p12.1 dup1045 Kb (paternal)
18	6 ay	Erkek	AVSD	Normal	Normal
24	18 ay	Erkek	VSD	Normal	Xp22.33 314 Kb dup, klinik önemi belirsiz değişiklik
34	2.5 ay	Erkek	COA, MİTRAL ATREZİ	Normal	Normal
42	5 ay	Erkek	PDA, COA	Normal	Normal
96	6 yaş	Kadın	ASD, TGA, COA	Yapılmamış	Normal
97	1.5 yaş	Kadın	ASD, VSD, PDA, HETEROTAKSİ, PVDA	Yapılmamış	Normal
98	16 ay	Erkek	VSD	Yapılmamış	Normal
99	2 yaş	Erkek	VSD, PULMONER STENOZ, AORT DARLIĞI	Yapılmamış	Normal
100	5 gün	Erkek	ASD, EBSTEİN ANOMALİSİ	Yapılmamış	16q24.3 22 KB delesyon, klinik önemi belirsiz değişiklik
101	2 gün	Kadın	ASD	Yapılmamış	Normal
102	1 gün	Kadın	VSD, PDA,PULMONER VENÖZ DÖNÜŞ ANOMALİSİ	Yapılmamış	11p15.1 167 Kb del, klinik önemi belirsiz değişiklik
103	10 gün	Erkek	ASD, VSD,	Normal	Normal
104	1 gün	Erkek	ASD, PDA	Yapılmamış	Normal

ASD: Atriyal Septal Defekt

VSD: Ventriküler Septal Defekt

PDA: Persistan Duktus Arteriyosus

AVSD: Atriyovenriküler Septal defekt

PVDA: Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi

COA:AortKoarktasyonu

Tablo 9. Array-CGH analizinde delesyon ve duplikasyon saptanan bölgeler ve ilgili genleri.

SIRA NO	KROMOZOMDAKİ YERİ	BÜYÜKLÜĞÜ (KB)	DELESYON/ DUPLİKASYON	GENOMİK KOORDİNATLARI	İLGİLİ GENLER
5	21q22.13 - q22.3	4218	Delesyon (patojenik)	chr21:38796811-43014373	<i>DYRK1A</i> , <i>KCNJ6</i> , <i>DSCR4</i> , <i>KCNJ15</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>PSMG1</i> , <i>HMGNI</i> , <i>WRB</i> , <i>SH3BGR</i> , <i>B3GALT5</i> , <i>PCP4</i> , <i>DSCAM</i> , <i>BACE2</i> , <i>MX2</i>
	12p12.1	1045	Duplikasyon (paternal)	chr12:21445371-22490082	<i>IAPP</i> , <i>RECQL</i> , <i>GYS2</i> , <i>LDHB</i> , <i>KCNJ8</i> , <i>ABCC9</i> , <i>CMAS</i> , <i>SLCO1A2</i> , <i>PYROXD1</i> , <i>GOLT1B</i> , <i>C12orf39</i> , <i>ST8SIA1</i>
24	Xp22.33	314	Duplikasyon (klınık önemi belirsiz)	chrX: 2281367-2594954	<i>ZBED1</i> , <i>DHRXS</i> , <i>CD99P1</i>
100	16q24.3	22	Delesyon (klınık önemi belirsiz)	chr16:89874649-89897040	<i>FANCA</i> , <i>SPIRE2</i>
102	11p15.1	167	Delesyon (klınık önemi belirsiz)	chr11:17423181-17590512	<i>ABCC8</i> , <i>USH1C</i>

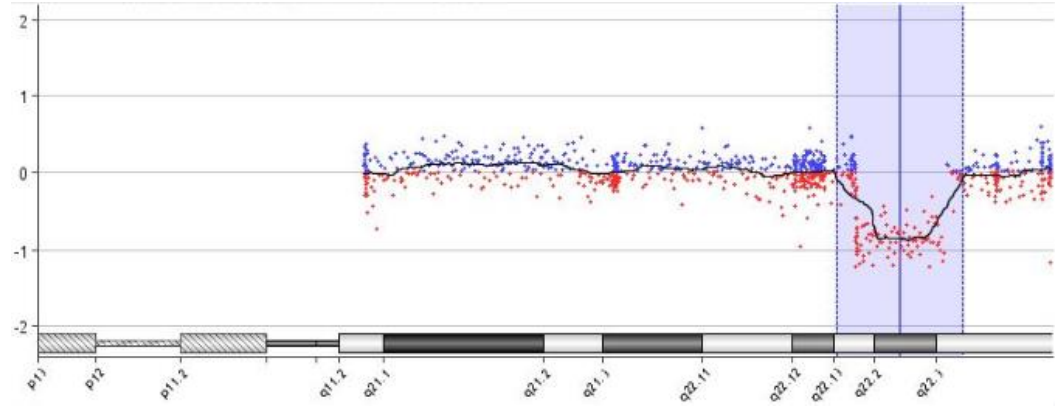
DYRK1A: Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A

DSCAM: Down Syndrome Cell Adhesion Molecule

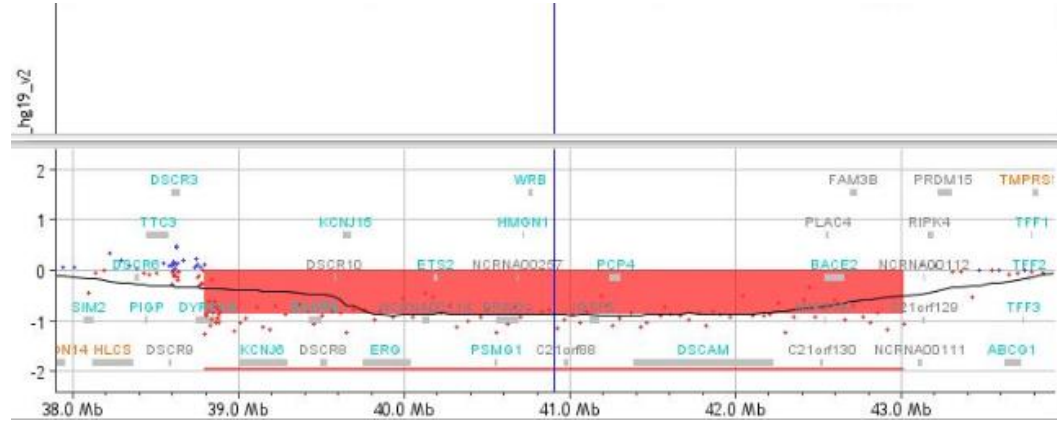
Tablo 10. Array-CGH analizi sonucunda konjenital kalp hastalıkları açısından anlamlı olabileceği düşünülen delesyon/duplikasyon bölgeleri ve hastaların dismorfik bulguları ile eşlik eden organ anomalileri

HASTA NO	KALP ANOMALİSİ	DEL/DUP BÖLGESİ	DİSMORFİK BULGULAR VE EK ANOMALİLER
5	Atrial Septal Defekt, Ventriküler Septal Defekt, Persistan Duktus Arteriyosus	12p12.1 (1045 Kb) dup (paternal) 21q22.13 - q22.3 (4.2 Mb) del (patojenik)	Metopik çıkıntı, Kraniosinostozis, Kalın kaşlar, Dik çıkışlı kaş mediali, Sinofris, Ödematöz göz kapakları, Derin yerleşimli gözler, Hipotelorizm, 2-3-4. Ayak parmaklarında Dorso-mediale eğilim, Ayak 2.parmağı Üstten yerleşimli, Gelişimsel gerilik, Epilepsi.
24	Ventriküler Septal Defekt	Xp22.33 (314 Kb) dup (klinik önemi belirsiz değişiklik)	Yarık dudak, Düşük yerleşimli kulaklar, Hipospadias.
100	Atrial Septal Defekt, Ebstein Anomalisi	16q24.3 (22Kb) del (klinik önemi belirsiz değişiklik)	Plegiosefali, Dolikosefali, Makrosefali, Mikrognati, Kısa boyun, Sol elde tek transvers çizgi.
102	Ventriküler Septal Defekt, Persistan Duktus Arteriyosus, Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi	11p15.1 167 Kb del (klinik önemi belirsiz değişiklik)	Prematürite, Palpebral aralık yukarı yönlü, Blefarofimosis, Arkaya dönük kulaklar.

Array CGH analizinde patojenik değişiklik saptanan tek hasta, 5 nolu hastadır (Tablo 8-10). Bu hastada yirmibirinci kromozomun kısa kol 22.13 - 22.3 bölgeleri arasında bulunan 4.2 Mb'lık delesyon saptanmıştır (Şekil 2A ve 2B). Delesyon bölgesindeki kayıba uğrayan genler Şekil 2B'de ve Tablo 10'da sunulmaktadır.



A



B

Şekil 2. 5 numaralı hastanın array CGH analizi ile saptanan 21. kromozomda

A. 21q22.13 - q22.3'deki 4218 Kb büyüklüğündeki delesyon

B. Delesyon bölgesi ve ilgili genlerin detayları

Çalışmada 22q11.2 delesyonu saptanan ve saptanmayan her iki grup hastada da en sık görülen kardiyak anomalilerin ASD, VDS ve PDA olduğu görülmüştür. İki grup arasında belirtilen kardiyak anomaliler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 11). Diğer kardiyak anomaliler için hasta sayısının yetersiz oluşu nedeniyle istatistiksel analiz yapılamamıştır.

Tablo 11. Kardiyak anomaliler ve FISH analiz sonuçları arasındaki ilişki

KARDİYAK ANOMALİLER	22q11.2 FISH NORMAL	22q11.2 FISH DELESYON	TOPLAM	P
Konotrunkal anomaliler	49	10	59	A.D.
ASD	38	7	45	A.D.
PDA	21	2	23	A.D.
Heterotaksi	4	0	4	*
Biküspit aorta	2	0	2	*
Aort Koarktasyonu	5	2	7	*
Anormal pulmoner venöz dönüş	3	0	3	*
Pulmoner stenoz	11	3	14	*
Noncompaction	4	0	4	*
Tek ventrikül	1	0	1	*
Pulmoner atrezi	2	0	2	*
Mitral atrezi	3	0	3	*
Atriyoventriküler septal defekt	5	0	5	*
Aort stenoz	4	1	5	*
Sağ arkus aorta	0	4	4	*
Aort hipoplazisi	1	0	1	*
Sol ventrikül hipoplazisi	2	0	2	*
Sağ ventrikül hipoplazisi	2	0	2	*

A.D: Anlamlı değil (Fisher's exact test, two tailed, %95 CI) ,

* Sayı yetersizliği nedeniyle istatistiksel değerlendirilme yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

Bir genetik sendromun erken teşhis edilmesi, daha doğru tedavi ve takip seçeneklerinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Ancak yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde dismorfolojik bulguların saptanması oldukça zor olmaktadır. Ayrıca hastanın yaşı ilerledikçe anlaşılabilecek entelektüel yetersizlik ve gelişimsel gerilik gibi bulgular ilk muayenede belirlenemeyebilmektedir. Trizomi 21, DiGeorge sendromu gibi klinik bulguları ile daha kolay tanınabilen sendromlar için karyotip analizi ve FISH analizi yeterli olurken, bulguların silik olduğu özellikle yenidoğan ve süt çocukluğu dönemindeki hastalar için, tüm genomda bulunan kopya sayısı değişikliklerini gösteren Array-CGH analizi tanı konulabilme aralığını artırmaktadır. Ekokardiyografi ile konjenital kalp hastalığı teyit edilmiş hastaların az bir kısmına kromozom analiz uygulandığı ve sadece %11'lik bir kısmına Array-CGH analizi yapıldığı ve epidemiyolojik olarak da olguların sadece %24'üne tanı konulduğu görülmektedir (93, 94). Amerikan Kalp Derneği ve Amerikan Pediatri Akademisi, konjenital kalp hastalıklarının genetik etiyolojisinin araştırılmasına yönelik olarak izlenmesi gereken basamakları belirlemişlerdir: 1. İzlem gerektiren diğer organ ve sistemlerin belirlenmesi, 2. Hastanın prognozunun belirlenmesi, 3. Hastalığın tekrar etme olasılığının belirlenerek aileye bu konuda danışma verilmesi, 4. Diğer risk altındaki aile bireylerinin belirlenmesi ve gerekli genetik taramanın yapılması (35). Bu hastaların değerlendirilmesinde, belirtilen basamakların göz önüne alınmasının yanı sıra ailelerinde konjenital kalp hastalığı hikayesi bulunmadığından, bu

anomalilerinin *de novo* kromozomal anomaliler, küçük kopya sayısı değişiklikleri ve nokta mutasyonlar sonucu olabileceği unutulmamalıdır.

Bu retrospektif çalışmada da kardiyak anomaliler hastanın ilk başvurusunda, özellikle yenidoğanlarda izole bir bulgu olarak değerlendirilirken, sonraki klinik izlemlerinde yeni ortaya çıkan klinik ve dismorfolojik özellikleri nedeniyle bir sendromun bileşeni olarak karşımıza çıkabildiği için, çok sayıda hasta verisi taranmış olmasına rağmen, 104 hasta çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun bulunmuştur. Çalışma grubundaki hastaların 96'sında, kardiyak anomalilerin 22q11.2 delesyon sendromu ile sık birlikteliği olmasından dolayı "kritik bölgeyi işaretleyen" prob ile FISH analizi yapılmış ve 14'ünde (%13,4) delesyon saptanmıştır. Yirmi ikinci kromozomun q11.2 bölge delesyonu ile karakterize olan bu sendromda en sık görülen kardiyak anomaliler interrupted aortik ark ve konotrunkal kalp defektleri olmakla birlikte başka pekçok kardiyak anomali de izlenebilmektedir (95). Interrupted aortik ark hastaların %50-89'unda, trunkus arteriosus %34-41'inde, Fallot tetralojisi ise hastaların %8-34'ünde görülebilmektedir. Ventriküler septal defektli hastaların %10'unda 22q11.2 delesyonu görülebilenken eşlik eden ark anomalisi de varsa bu oranın %45'e yükseldiği bildirilmiştir (35). Bu çalışmada konotrunkal anomali başlığı altında sınıflandırılan Fallot tetralojisi, trunkus arteriosus, çift çıkımlı sağ ventrikül ve ventriküler septal defekt, 22q11.2 delesyonu saptanan 14 hastanın 10'unda (%71,4) mevcut iken, delesyon saptanmayan hastaların %59,7'sinin ortak bulgusudur (Tablo 7 ve 11). Bu nedenle konotrunkal anomali varlığında, 22q11.2 delesyon sendromunun öncelikle araştırılmasının, etiyolojinin aydınlatılması açısından anlamlı olabileceği

düşünülmüştür. Diğer önemli bir nokta da, yenidoğanlarda 22q11.2 sendromu tanısının erken dönemde konulması ile, daha sonra ortaya çıkması muhtemel epileptik nöbete yol açabilen dirençli hipokalsemi gibi ciddi komplikasyonların önlenilmesidir (96, 97). Yeni doğanlarda 22q11.2 delesyon sendromunun bir bileşeni olan immün yetmezlik tablosunun da erken fark edilerek aşılama gibi gerekli önlemlerin alınmasına olanak sağlanması da, ayrıca önemlidir (98). Bu sendromun kardiyak defektler, hipokalsemi ve hava yolu kollapsına yol açan trakeomalazi nedeniyle, yenidoğanlarda artmış mortaliteye sebep olduğu bilinmektedir (99). Mortalite riski sadece kardiyak anomalili çocukluklarda değil erişkin yaş grubundaki hastalarda, hatta kardiyak anomalisi olmayanlarda da bulunmaktadır. Bu konuda yapılmış bir çalışmada, 22q11.2 delesyon sendromu saptanmış erişkinlerde 30, 40 ve 50 yaş için hayatta kalım oranları sırasıyla %95, %89,9 ve %73,9 olarak bildirilmiştir (100). Bu nedenle 22q11.2 sendromuna olabildiği kadar erken evrede tanı konulması ve destekleyici tedavilerin planlanması hayatta kalım sürelerini arttırabileceği için önemli olabilecektir. Delesyonu olan hastalarda kalp ameliyatlarında perioperatif komplikasyonların delesyonu olmayanlara göre daha fazla görüldüğü bildirildiği için, mevcut anomalilere yönelik yapılacak operasyonlarda peroperatif ve perioperatif dönemde gelişebilecek komplikasyonlara hazırlıklı olunması ile de sağ kalım süreleri ayrıca arttırabilecektir (101). Bu çalışmada da delesyon belirlenen, 85 ve 87 numaralı hastalar postoperatif dönemde eksitus olmuşlardır. Bu nedenle kardiyak cerrahi planlanan hastalar için, 22q11.2 delesyonu açısından değerlendirme yapılmasının,

peroperatif ve perioperatif dönemde gelişebilecek komplikasyonlara karşı alınabilecek önlemlerin planlanmasında yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Yirmi ikinci kromozomun q11.2 delesyonunda kalp anomalileri dışında birçok sistemi ilgilendiren farkı anomaliler olabileceği gibi, bazı hastalarda da dismorfik ek bir bulgu izlenmeyebilmektedir (44). Çalışmamızda da delesyon saptanan bazı hastalarda velofaringeal yetmezlik, hipospadias ve böbrek anomalileri gibi genitoüriner anomaliler bulunmakla birlikte, herhangi bir dismorfik bulgu saptanmayan hastalar da mevcuttur (Tablo 7). Doksan üç nolu hastada ise nadir bir anomali olarak ektopik sublingual tiroid dokusu mevcuttur (Tablo 7). Literatürde bulabildiğimiz kadarı ile şimdiye kadar 22q11.2 delesyon sendromunda bu anomalinin varlığı rapor edilmemiştir. Ektopik tiroid dokusu toplumda yüzbin ile üçyüz binde bir sıklığı aralığında rapor edilen nadir bir anomalidir (102). Embriyonik dönemde, kısmen nöral krest kökenli olan tiroid dokusunun foliküler ve C hücreleri, dört ve beşinci faringeal poşlardan gelişirken, 22q11.2 delesyon sendromu patogenevizinden, üç ve dördüncü faringeal poştan köken alan nöral krest hücrelerinin migrasyon defekti sorumlu tutulmaktadır (103). Bu nedenle 22q11.2 delesyon sendromlu hastalarda yapılacak daha kapsamlı çalışmalarda tiroid bezi ektopisinin değerlendirilmesinin, bu grup hastalardaki gerçek sıklığın belirlenmesi açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Kardiyak bulgular ile kromozomal değişimlerin değerlendirilmesinde, konvansiyonel sitogenetik analiz ancak 5 milyon baz (Mb) ve üzerindeki genomik dengesizlikleri saptayabilmekle beraber, genetik analizler içinde uygulanması

gereken ilk basamak testtir (104). Literatürde konjenital kalp hastalığı nedeniyle yoğun bakımda bulunan veya kardiyak cerrahi işleme alınan sendromik veya sendromik olmayan hastalarda %10-23 kromozomal anomali bildirilmekle beraber, bu retrospektif çalışmada kromozomal anomalili hastalar dışlanma kriterlerinden dolayı çalışma dışı bırakılmıştır (105, 106). Kardiyak anomalilerin değerlendirilmesinde Floresan insitu hibridizasyon analizi, baz dizisi bilinen hedef bölgeye ait delesyonu saptayan düşük maliyetli ve hızlı sonuç veren bir test olduğundan, konvansiyonel analizlerden sonra genellikle ikinci tercih edilen testtir. Bu testin DiGeorge sendromu için tanı koyma oranı yaklaşık %12 olarak bildirilmekle beraber interrupted aortik ark, ventriküler septal defektle birliktelik gösteren pulmoner atrezi veya trunkus arteriyosus gibi spesifik kardiyak bulguların varlığında, tanı konma yüzdesi %25-50'ye yükselmektedir (105). Çalışmamızda da FISH analizi 95 hastada ikinci sırada uygulanan yöntem olmuş ve 95 hastanın birinde ailesel olmakla beraber 14'ünde (%14,7) delesyon tespit edilmiştir (Tablo 7). Literatüre göre bu çalışmada daha düşük oranda delesyon saptanması, hasta sayısının az olması ile ilişkilendirilmiştir.

Array-CGH analizinin özellikle 22q11.2 delesyon sendromu gibi iyi tanımlanmış delesyon ve duplikasyon sendromlarında tanısal değeri yüksek olduğundan konvansiyonel analizleri takiben veya konvansiyonel ile birlikte FISH analizi sonrası uygulamada yerini almaktadır (107, 108). Literatürde, sendromik ve izole konjenital kalp hastalıkları olanlarda farklı çözünürlük düzeylerine sahip Array-CGH platformları kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur (107-111). Bu

Çalışmalarda rapor edilen patojenik değişiklikler, kullanılan Array-CGH platformuna bağlı olarak ve/veya izole/sendromik konjenital kalp hastalığı olup olmamasına bağlı olarak değişmektedir. Bachman ve ark. 135 K Array-CGH platformunu ile hastaların %10,9’unda kopya sayısı değişikliği tespit etmiştir (109). Bir diğer çalışmada 244 K ile Array-CGH platformunu kullanılmış ve hastalarda patojenik kopya sayısı değişikliği %25 oranında rapor edilmiştir (110). Patojenik kopya sayısı değişiklikleri izole konjenital kalp hastalığı olanlarda sıfır ile %17,9 arasında bildirilmektedir. Hastalarda kalp anomalisi yanında entelektüel ya da gelişimsel geriliğin bulunduğu durumlarda patojenik kopya sayısı değişikliği oranının %63 gibi yüksek bir orana ulaştığı görölmektedir. Bu nedenle Wu ve ark. konjenital kalp anomalisi olan olgularda özellikle de entelektüel ya da gelişimsel geriliğin eşlik ettiği durumlarda, Array-CGH analizini öncelikli test olarak önermiştir. Ayrıca konjenital kalp hastalığında kullanılan Array-CGH platformunun çözünürlüğünün artması ile daha yüksek oranda patojenik kopya sayısı değişikliklerinin saptanabileceği belirtilmiştir (111). Çalışmamızda ortalama çözünürlüğü 100kb olan olan 8x60 K Array-CGH platformunu kullanılmış ve sadece bir hastada patojenik kopya sayısı değişikliği saptanmıştır. Tek hastada patojenik kopya sayısı değişikliğinin belirlenmiş olmasının daha düşük çözünürlükteki bir Array-CGH platformu kullanılmasından ve/veya az sayıda hasta çalışılmış olmasından ve bu az sayıdaki hastaların da sendromik olmayan hastalardan seçilmiş olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünölmüştür. Patojenik kopya sayısı değişikliği saptanan tek hasta olan bu 5 nolu hastada, 21q22 lokusunda 4,2 Mb büyüklüğünde patojenik delesyon saptanmıştır (Şekil 2).

Literatürde, 21q22 lokusunda delesyon olan hastalarda da VSD, aort koarktasyonu ve patent duktus arteriyosus gibi kalp anomalileri bildirilmiştir (112, 113). Bu bölgede bulunan ve 5 nolu hastada da delete olan *DYRK1A* (Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A) geninin mutasyonu kalp anomalisi ile ilişkilendirilmektedir (114). *DYRK1A*'nın kardiyomiyositlerdeki hipertrofi üzerine negatif düzenleyici etkisi olduğu bilinmekle birlikte, bu mutasyon ve kalp anomalisi arasındaki ilişkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. *DYRK1A*'nın aşırı ifadelенmesinin dilate kardiyomiyopatiye sebep olarak erken ölüme neden olabileceği de rapor edilmiştir (115). Hastamızdaki delesyon bölgesinde bulunan diğer bir gen olan *DSCAM* (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) geninin kalpte elektro-mekanik sinyal iletiminin düzenlenmesinden sorumlu olduğu ve yine bu gendeki anormal ekspresyonun kardiyak septum ve AV kanalda defekte sebep olabileceği bildirilmiştir (116). Aynı hastada 12p12.1 bölgesinde 1045 Kb boyutunda belirlenen duplikasyon, hastanın babasında da bulunduğu ve literatürde de herhangi bir klinik bulgu ile ilişkilendirilmediğinden, önemi belirsiz muhtemel benign değişiklik olarak yorumlanmıştır.

Yirmi ikinci kromozomda q11.2 bölgesinde delesyon belirlendiğinde, benzer klinik özelliklerinden dolayı bazı sendromlar ile Digeorge sendromunun ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir. Bu sendromların başında OpitzG/BBB (MIM:145410) sendromu ve Cayler kardiyofasiyal sendromu (Asymmetric Crying Facies) (MIM:125520) gelmektedir. Çalışma grubundaki 22q11.2'de delesyonu olan 89 numaralı hastada gülümsediğinde ortaya çıkan ağız köşesindeki asimetri ve

kardiyak bulgular, hem DiGeorge hem de Cayler kardiyofasial sendromunun (MIM:125520) ortak bulgularıdır. Bu iki sendrom arasında ayırıcı tanının net olarak yapılabilmesi için hastada tek taraflı depressor anguli oris kası hipoplazisinin gösterilmesi önemli olmakla beraber, bu çalışma retrospektif veri analizine dayandığından bu ayırım yapılamamıştır (117).

Sonuç olarak konjenital kalp hastalıklarında her ne kadar gen-çevre etkileşimi önemli bir etken olmakla beraber, öncelikle dikkatli bir klinik bir değerlendirme, iyi bir ayırıcı tanı, sonra da sırasıyla konvansiyonel ve ileri moleküler analizlerin uygulanması daha fazla sayıda hastaya doğru tanının konulmasını sağlayabilecektir.

6. SONUÇ

İlk başvurdıkları tarihte detaylı klinik değerlendirmelerinde non-sendromik izole kardiyak bulgusu olan ve/veya konjenital kalp hastalığı olan toplam 104 hasta çalışmaya alınmıştır.

Hastaların 96'sına 22q11.2 delesyon sendromu açısından FISH analizi yapılmış ve bu hastalardan 14'ünde delesyon saptanmıştır. Bu hastaların birindeki delesyonun maternal kaynaklı olduğu görülmüştür. Annede bu delesyona ait klinik bulgu bulunmamaktadır.

FISH ile delesyon saptanmamış dört hastaya 100 Kb çözünürlüğünde 60K Array-CGH analizi yapılmış ve bir hastada (5 nolu hasta) kardiyovasküler anomali ile ilişkilendirilebilecek 21q22 lokusunda 4,2 Mb boyutunda patojenik delesyon tespit edilmiştir. Bu delesyon bölgesindeki *DYRK1A* ve *DSCAM* genleri kardiyak gelişim ile ilişkilendirmiş genlerdir.

7. KAYNAKLAR

1. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. Journal of the American college of cardiology. 2002;39(12):1890-900.
2. Boneva RS, Botto LD, Moore CA, Yang Q, Correa A, Erickson JD. Mortality associated with congenital heart defects in the United States. Circulation. 2001;103(19):2376-81.
3. Hoffman J. Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. Pediatric cardiology. 1995;16(4):155-65.
4. Van Der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJ. The changing epidemiology of congenital heart disease. Nature Reviews Cardiology. 2011;8(1):50-60.
5. van Karnebeek CD, Hennekam R. Associations between chromosomal anomalies and congenital heart defects: a database search. American journal of medical genetics. 1999;84(2):158-66.
6. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tümer Z, Tommerup N, Chen W, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. Journal of medical genetics. 2008;45(11):704-9.
7. Sadler TW. Cardiovascular system. Langman's Medical Embryology. 13 ed: Wolters Kluver; 2015. p. 175-217.

8. Campbell M. Causes of malformations of the heart. *British medical journal*. 1965;2(5467):895.
9. Campbell M. Genetic and Environmental Factors in Congenital Heart Disease
1. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1949;18(4):379-91.
10. Gelb BD. History of our understanding of the causes of congenital heart disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2015;8(3):529-36.
11. Nora JJ. Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. *Circulation*. 1968;38(3):604-17.
12. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, et al., editors. Cloning the gene for the inherited disorder chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; 1986: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
13. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, et al. Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature genetics*. 1997;15(1):30-5.
14. Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424(6947):443-7.
15. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437(7056):270-4.
16. Kirk EP, Sunde M, Costa MW, Rankin SA, Wolstein O, Castro ML, et al. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac

pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy.

The American Journal of Human Genetics. 2007;81(2):280-91.

17. Schott J-J, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5.

Science. 1998;281(5373):108-11.

18. de la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. Human genetics. 1981;57(3):253-6.

19. Scambler P, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, et al. Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. The Lancet. 1992;339(8802):1138-9.

20. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1982;79(14):4381-5.

21. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. European heart journal. 2007;28(22):2778-84.

22. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. Nature. 2013;498(7453):220-3.

23. Gillum RF. Epidemiology of congenital heart disease in the United States. American heart journal. 1994;127(4):919-27.

24. Tennstedt C, Chaoui R, Körner H, Dietel M. Spectrum of congenital heart defects and extracardiac malformations associated with chromosomal abnormalities: results of a seven year necropsy study. *Heart*. 1999;82(1):34-9.
25. Bruneau BG, Srivastava D. Congenital Heart Disease. *Circulation research*. 2014;114(4):598-9.
26. Azhar M, Ware SM. Genetic and developmental basis of cardiovascular malformations. *Clinics in perinatology*. 2016;43(1):39.
27. Øyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PK, Melbye M. Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation*. 2009;120(4):295-301.
28. Khalid Y, Ghina M, Fadi B, Fadi C, May K, Joseph R, et al. Consanguineous marriage and congenital heart defects: A case-control study in the neonatal period. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(14):1524-30.
29. Jones KL JM DCM. Chromosomal Abnormality Syndromes Identifiable on Routine Karyotype, Down Syndrome. In: Jones KL JM DCM, editor. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. 7th ed: Elsevier, Saunders; 2013. p. 7-9.
30. Korbelt JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen X-N, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(29):12031-6.

31. Control CfD, Prevention. Improved national prevalence estimates for 18 selected major birth defects--United States, 1999-2001. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2006;54(51):1301.
32. Maslen CL, Babcock D, Robinson SW, Bean LJ, Dooley KJ, Willour VL, et al. CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140(22):2501-5.
33. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(11):826.
34. Chen CP. Congenital heart defects associated with fetal trisomy 18. *Prenatal diagnosis*. 2006;26(5):483-5.
35. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge. *Circulation*. 2007;115(23):3015-38.
36. Quemener S, Chen JM, Chuzhanova N, Bénech C, Casals T, Macek M, et al. Complete ascertainment of intragenic copy number mutations (CNMs) in the CFTR gene and its implications for CNM formation at other autosomal loci. *Human mutation*. 2010;31(4):421-8.
37. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Human molecular genetics*. 2005;14(suppl_2):R215-R23.

38. Hegde MR, Chin EL, Mulle JG, Okou DT, Warren ST, Zwick ME. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene. *Human mutation*. 2008;29(9):1091-9.
39. Wong L-JC, Dimmock D, Geraghty MT, Quan R, Lichter-Konecki U, Wang J, et al. Utility of oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization for detection of target gene deletions. *Clinical chemistry*. 2008;54(7):1141-8.
40. Piluso G, Dionisi M, Blanco FDV, Torella A, Aurino S, Savarese M, et al. Motor chip: a comparative genomic hybridization microarray for copy-number mutations in 245 neuromuscular disorders. *Clinical chemistry*. 2011;57(11):1584-96.
41. Glessner J, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variations in congenital heart disease by integrative analysis of SNP array and exome sequence data. *Circulation research*. 2014:CIRCRESAHA. 114.304458.
42. Ylstra B, Van Den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic acids research*. 2006;34(2):445-50.
43. Kim DS, Kim JH, Burt AA, Crosslin DR, Burnham N, Kim CE, et al. Burden of potentially pathologic copy number variants is higher in children with isolated congenital heart disease and significantly impairs covariate-adjusted transplant-free survival. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2016;151(4):1147-51. e4.

44. McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, et al. Phenotype of the 22q11. 2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genetics in Medicine*. 2001;3(1):23-9.
45. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JA, et al. 22q11. 2 deletion syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15071.
46. Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11. 2 deletion syndrome. *The American journal of cardiology*. 2010;105(11):1617-24.
47. Mahle WT, Crisalli J, Coleman K, Campbell RM, Tam VK, Vincent RN, et al. Deletion of chromosome 22q11. 2 and outcome in patients with pulmonary atresia and ventricular septal defect. *The Annals of thoracic surgery*. 2003;76(2):567-71.
48. Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Human mutation*. 2006;27(8):814-21.
49. Scambler PJ, Carey AH, Wyse RK, Roach S, Dumanski JP, Nordenskjöld M, et al. Microdeletions within 22q11 associated with sporadic and familial DiGeorge syndrome. *Genomics*. 1991;10(1):201-6.
50. Wentzel C, Fernström M, Öhrner Y, Annerén G, Thuresson A-C. Clinical variability of the 22q11. 2 duplication syndrome. *European journal of medical genetics*. 2008;51(6):501-10.

51. Portnoi M-F. Microduplication 22q11. 2: a new chromosomal syndrome. *European Journal of Medical Genetics*. 2009;52(2):88-93.
52. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *TRENDS in Genetics*. 2002;18(2):74-82.
53. Alberti A, Romano C, Falco M, Cali F, Schinocca P, Galesi O, et al. 1.5 Mb de novo 22q11. 21 microduplication in a patient with cognitive deficits and dysmorphic facial features. *Clinical genetics*. 2007;71(2):177-82.
54. Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, et al. Microduplications of 22q11. 2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genetics in Medicine*. 2008;10(4):267-77.
55. Morris CA. Williams Syndrome, In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington; 1999 Apr 9 [Updated 2017 Mar 23].
56. Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell*. 1993;73(1):159-68.
57. Spinner NB, Leonard LD, Krantz ID. Alagille syndrome. 2013.
58. Allanson J, Roberts A. Noonan Syndrome. 2001 Nov 15 [Updated 2011 Aug 4]. *GeneReviews™* [Internet] Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 1993.
59. Moran R, Robin N. Congenital heart defects. *Emery and Rimoin's essential medical genetics*. 2013:169-74.

60. Wyse RK, Al-Mahdawi S, Burn J, Blake K. Congenital heart disease in CHARGE association. *Pediatric cardiology*. 1993;14(2):75-81.
61. Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC. Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(3):674-86.
62. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and genomics of congenital heart disease. *Circulation research*. 2017;120(6):923-40.
63. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(9):1650-5.
64. Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, St Amand T, Kondo R, Pradervand S, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease: loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell*. 2004;117(3):373-86.
65. Tong Y-F. Mutations of NKX2.5 and GATA4 genes in the development of congenital heart disease. *Gene*. 2016;588(1):86-94.
66. Ellesøe SG, Johansen MM, Bjerre JV, Hjortdal VE, Brunak S, Larsen LA. Familial Atrial Septal Defect and Sudden Cardiac Death: Identification of a Novel NKX2-5 Mutation and a Review of the Literature. *Congenital heart disease*. 2016;11(3):283-90.

67. Hanley A, Walsh KA, Joyce C, McLellan MA, Clauss S, Hagen A, et al. Mutation of a common amino acid in NKX2.5 results in dilated cardiomyopathy in two large families. *BMC medical genetics*. 2016;17(1):83.
68. Lee Y, Shioi T, Kasahara H, Jobe SM, Wiese RJ, Markham BE, et al. The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(6):3120-9.
69. Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Developmental biology*. 1994;164(2):361-73.
70. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes & development*. 1997;11(8):1048-60.
71. Misra C, Sachan N, McNally CR, Koenig SN, Nichols HA, Guggilam A, et al. Congenital heart disease—causing gata4 mutation displays functional deficits in vivo. *PLoS genetics*. 2012;8(5):e1002690.
72. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, et al. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(39):14471-6.
73. Heinritz W, Shou L, Moschik A, Froster UG. The human TBX5 gene mutation database. *Human mutation*. 2005;26(4):397-.

74. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006;313(5795):1922-7.
75. Knöfler M, Meinhardt G, Vasicek R, Husslein P, Egarter C. Molecular cloning of the human Hand1 gene/cDNA and its tissue-restricted expression in cytotrophoblastic cells and heart. *Gene*. 1998;224(1):77-86.
76. Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Inga A, Borlak J. A loss-of-function mutation in the binding domain of HAND1 predicts hypoplasia of the human hearts. *Human molecular genetics*. 2008;17(10):1397-405.
77. Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Traverso I, Kuhls B, Inga A, Borlak J. A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart. *Human molecular genetics*. 2009;18(19):3567-78.
78. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437(7056):270.
79. Wang B, Yan J, Mi R, Zhou S, Xie X, Wang J, et al. Forkhead box H1 (FOXH1) sequence variants in ventricular septal defect. *International journal of cardiology*. 2010;145(1):83-5.
80. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*. 2008;451(7181):943.
81. Elektronik veritabanı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
82. Marín-García J. Molecular Determinants of Congenital Heart Disease. *Post-Genomic Cardiology*. 2nd ed: Academic Press; 2014. p. 151-79.

83. Hershberger RE. Cardiovascular genetic medicine: evolving concepts, rationale, and implementation. *Journal of cardiovascular translational research*. 2008;1(2):137.
84. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg H-P, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990;62(5):999-1006.
85. Mital S, Musunuru K, Garg V, Russell MW, Lanfear DE, Gupta RM, et al. Enhancing literacy in cardiovascular genetics: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2016;9(5):448-67.
86. Elektronik veritabanı: <http://affymetrix.com-user> manual.
87. Elektronik veritabanı: <http://projects.tcag.ca/variation>
88. Elektronik veritabanı: <http://decipher.sanger.ac.uk>.
89. Elektronik veritabanı: <http://www.ecaruca.net>.
90. Elektronik veritabanı: <http://www.ensembl.org>.
91. Elektronik veritabanı: <http://www.ncbi.nlm.gov>.
92. Elektronik veritabanı: <http://omim.org>.
93. Baker K, Sanchez-de-Toledo J, Munoz R, Orr R, Kiray S, Shiderly D, et al. Critical congenital heart disease—utility of routine screening for chromosomal and other extracardiac malformations. *Congenital heart disease*. 2012;7(2):145-50.
94. Kathiresan S, Srivastava D. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell*. 2012;148(6):1242-57.

95. Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *European journal of medical genetics*. 2014;57(8):402-13.
96. Cheung ENM, George SR, Andrade DM, Chow EW, Silversides CK, Bassett AS. Neonatal hypocalcemia, neonatal seizures, and intellectual disability in 22q11. 2 deletion syndrome. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2014;16(1):40.
97. Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32(2):492-8.
98. Jawad AF, Prak EL, Boyer J, McDonald-McGinn DM, Zackai E, McDonald K, et al. A prospective study of influenza vaccination and a comparison of immunologic parameters in children and adults with chromosome 22q11. 2 deletion syndrome (diGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Journal of clinical immunology*. 2011;31(6):927-35.
99. Repetto GM, Guzmán ML, Delgado I, Loyola H, Palomares M, Lay-Son G, et al. Case fatality rate and associated factors in patients with 22q11 microdeletion syndrome: a retrospective cohort study. *BMJ open*. 2014;4(11):e005041.
100. Bassett AS, Chow EW, Husted J, Hodgkinson KA, Oechslin E, Harris L, et al. Premature death in adults with 22q11. 2 deletion syndrome. *Journal of medical genetics*. 2009;46(5):324-30.

101. McDonald R, Dodgen A, Goyal S, Gossett JM, Shinkawa T, Uppu SC, et al. Impact of 22q11. 2 deletion on the postoperative course of children after cardiac surgery. *Pediatric cardiology*. 2013;34(2):341-7.
102. Di Benedetto V. Ectopic thyroid gland in the submandibular region simulating a thyroglossal duct cyst: a case report. *Journal of pediatric surgery*. 1997;32(12):1745-6.
103. Weinzimer SA. Endocrine aspects of the 22q11. 2 deletion syndrome. *Genetics in Medicine*. 2001;3(1):19.
104. Obstetricians ACo, Gynecologists. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. ACOG committee opinion No. 446. *Obstet Gynecol*. 2009;114:1161-3.
105. Ahrens-Nicklas RC, Khan S, Garbarini J, Woyciechowski S, D'alessandro L, Zackai EH, et al. Utility of genetic evaluation in infants with congenital heart defects admitted to the cardiac intensive care unit. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2016;170(12):3090-7.
106. Geddes GC, Butterly M, Sajan I. FISH for 22q11. 2 deletion not cost-effective for infants with congenital heart disease with microarray. *Pediatric cardiology*. 2015;36(3):531-6.
107. Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Sholler GF, Dunwoodie SL, Harvey RP, et al. Advances in the genetics of congenital heart disease: a clinician's guide. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;69(7):859-70.

108. Pergament E. New molecular techniques for chromosome analysis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2000;14(4):677-90.
109. Bachman KK, DeWard SJ, Chrysostomou C, Munoz R, Madan-Khetarpal S. Array CGH as a first-tier test for neonates with congenital heart disease. *Cardiology in the Young*. 2015;25(1):115-22.
110. Syrmou A, Tzetis M, Fryssira H, Kosma K, Oikonomakis V, Giannikou K, et al. Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. *Pediatric research*. 2013;73(6):772.
111. Wu X-l, Li R, Fu F, Pan M, Han J, Yang X, et al. Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease. *BMC pediatrics*. 2017;17(1):117.
112. Oegema R, de Klein A, Verkerk A, Schot R, Dumee B, Douben H, et al. Distinctive phenotypic abnormalities associated with submicroscopic 21q22 deletion including DYRK1A. *Molecular syndromology*. 2010;1(3):113-20.
113. Theodoropoulos DS, Cowan JM, Elias ER, Cole C. Physical findings in 21q22 deletion suggest critical region for 21q—phenotype in q22. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 1995;59(2):161-3.
114. van Bon BW, Coe BP, Bernier R, Green C, Gerds J, Witherspoon K, et al. Disruptive de novo mutations of DYRK1A lead to a syndromic form of autism and ID. *Molecular psychiatry*. 2016;21(1):126.

115. Kay L, Smulders-Srinivasan T, Soundararajan M. Understanding the multifaceted role of human down syndrome kinase DYRK1A. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 105: Elsevier; 2016. p. 127-71.
116. Baumann J. Down syndrome cell adhesion molecule—a common determinant of brain and heart wiring. *Pediatric research*. 2007;62(1):1.
117. Lin DS, Huang FY, Lin SP, Chen MR, Kao HA, Hung HY, et al. Frequency of associated anomalies in congenital hypoplasia of depressor anguli oris muscle: a study of 50 patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 1997;71(2):215-8.

8. ÖZET

Kardiyak anomaliler yenidoğan döneminde izole bir bulgu olarak değerlendirilirken, sonraki klinik izlemlerinde yeni ortaya çıkan klinik ve dismorfolojik özellikleri nedeniyle bir sendromun bileşeni olarak karşımıza çıkabilirler. Bu çalışmada da ilk başvurdıkları tarihte detaylı klinik değerlendirmelerinde non-sendromik izole kardiyak bulgusu olan ve/veya konjenital kalp hastalığı olan toplam 104 hastanın retrospektif verileri değerlendirilmeye alınmıştır.

İlk basamakta tüm hastalara konvansiyonel sitogenetik analiz yapılmış ve tamamında normal konstitüsyonel karyotip belirlenmiştir. Yüz dört hastanın 96'sına Floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile 22q11.2 delesyonu açısından analiz yapılmış ve 14'ünde (%14,7) delesyon tespit edilmiştir. Delesyon saptanan 14 hastanın 10'unda (%71,4) literatür ile uyumlu olarak konotrunkal kardiyak defektler bulunmaktadır. Genomik kopya sayısı değişikliklerini gösterebilmek amacıyla on dört hastaya array karşılaştırmalı genom hibridizasyon analizi yapılmış ve bir hastada 21p12.1 bölgesinde 4,2 milyon baz büyüklüğünde delesyon tespit edilmiştir. Delesyon bölgesinde yer alan kardiyak gelişimde rolü olan *DYRK1A* ve *DSCAM* genleri hastadaki kalp anomalisi ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuç olarak klinik ve tanı testlerinin retrospektif veri analizlerine dayanan bu çalışma ile, detaylı klinik değerlendirmenin yanı sıra, dikkatli bir ayırıcı tanı ile konvansiyonel testlerden başlayarak ileri moleküler testlerin doğru algoritma

basamakları kullanılarak uygulanmasının kardiyak anomalili hastaların tanısında önemli olduğu düşünölmüştür.

Anahtar Kelimeler: Konotrunkal kardiyak defektler; karşılaştırmalı genom hibridizasyon; in situ hibridizasyon, Floresan; sitogenetik

9. SUMMARY

While cardiac anomalies are regarded as an isolated symptom in neonatal period, they would be a component of a syndrome through new clinical and dysmorphic properties figured out during the further clinical monitoring. In the present study, the retrospective data of 104 patients with non-syndromic cardiac symptom and/or congenital heart disease diagnosed at the first day of application after detailed clinical evaluation were re-analyzed.

At the first step, conventional cytogenetic analyses were applied for all the patients, and karyotypes of all of them were normal. Ninety six of 104 patients were analyzed by the usage of Fluorescence *in situ* hybridization technique for 22q11.2 deletion syndrome and deletion was found on 14 patients (14,7 %). Ten (71,4 %) of the 14 patients with 22q11.2 deletion had conotruncal heart defects as supported by the literature. Array comparative genomic hybridization was applied to fourteen patients to demonstrate the genomic copy number variations and a 4,2-million base deletion at 21p12.1 region was found in one of the patient. The genes, namely DYRK1A and DSCAM, related with cardiac development which were located at the microdeletion region, were associated with the cardiac anomalies of the patient.

As a result, beside the detailed clinical evaluation, conventional cytogenetics and advanced molecular tests through appropriate algorithm steps by an attentive differential diagnostic are proposed to be critical in the diagnosis of the patients with cardiac defect, based on the data of retrospective clinical and diagnostic tests.

Key words: Conotruncal cardiac defects; comparative genomic hybridization; cytogenetics; in situ hybridization, Fluorescence

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Serdar

Soyadı: Mermer

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara 16/05/1971

Eğitimi

2013-2018: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında

Araştırma Görevlisi Doktor

1997-2002: Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalında

Araştırma Görevlisi Doktor

1990-1997: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

1985-1988: Ankara Atatürk Lisesi

1982-1985: Namık Kemal Orta Okulu

1977-1982: Namık Kemal İlk Okulu

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Tıbbi Genetik Derneği Türk Kardiyoloji Derneği,

Bilimsel Etkinlikleri :

1. Mermer, S., Kayhan, G., Karacelebi, E., & Percin, F. E. (2016). Oculoectodermal Syndrome: A New Case With Giant Cell Granulomas And Non-Ossifying Fibromas. *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)*, 27(1), 77-81.

2. Mermer, S., Özek, M., Perçin F., Karaoğuz M, Bayram M. (2018). Holoprosencephaly: A Rare Finding in Mosaic Trisomy 9 Syndrome. *Erciyes Med J* Accepted: 25.01.2018. (Basım Aşamasında).

11. EKLER



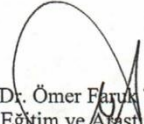
T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği
Klinik Araştırma Etik Kurulu

Sayı : 2012-KAEK-15/1199
Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Etik Kurul Kararı

27.07.2016

**KEÇİÖREN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMA
ETİK KURULU**

“Doğumsal Kalp Anomalili Çocukluk Yaş Grubu Hastalarının Klinik ve Genetik Analiz Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi” adlı klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından sağlık bakanlığına arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.


Op.Dr. Ömer Faruk TANER
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Pınarbaşı Mahallesi Sanatoryum Cad.
Ardahan Sokak No:25 Keçiören / ANKARA
Web: www.akeah.gov.tr