

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA GATA4, NKX2-5, TBX5,
CRELD1 VE BMP4 GEN BÖLGELERİNİN MLPA YÖNTEMİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ALPER AKPINAR**

DANIŞMAN
PROF. DR. DOLUNAY GÜRSES

DENİZLİ-2014

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA GATA4, NKX2-5,
TBX5, CRELD1 VE BMP4 GEN BÖLGELERİNİN MLPA
YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
DR.ALPER AKPINAR

DANIŞMAN
PROF.DR.DOLUNAY GÜRSES

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 08,10,2010 tarih ve sayılı 2012TPF029 no'lu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2014

Prof. Dr. Dolunay GÜRSES danışmanlığında Dr. Alper AKPINAR tarafından yapılan “Konjenital Kalp Hastalıklarında GATA4, NKX2-5, TBX5, CRELD1 ve BMP4 Gen bölgelerin MLPA yöntemi ile değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışması 10/01/2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Aziz POLAT

ÜYE : Prof. Dr. Dolunay GÜRSES

ÜYE : Doç. Dr. Özmert MA. ÖZDEMİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../.....

Prof. Dr. Hasan HERKEN
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım, çok saygıdeğer hocam Prof. Dr. Dolunay GÜRSES'e, katkılarından dolayı Anabilim Dalı başkanımız değerli hocamız Prof. Dr. Aziz POLAT, değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer ERGİN, Doç. Dr. Selçuk YÜKSEL Doç. Dr. Yasemin IŞIKBALCI, , Doç. Dr. Özmert Muhammet Ali ÖZDEMİR, Doç. Dr. Emin METE, Doç. Dr. Ahmet ERGİN, Yrd. Doç. Dr. Mine CİNBIŞ, Yard. Doç. Dr. Mustafa DOĞAN, Yard. Doç. Fatih FIRINCI, Yard. Doç. Dr. Bayram ÖZHAN, Yrd. Doç. Dr. Sabahat Yılmaz AĞLADIOĞLU ile birlikte çalışmaktan ve tanımaktan onur duyduğum, kader birliği yaptığımız değerli asistan arkadaşlarıma;

Çalışmanın genetik aşamasında destek ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Emre TEPELİ'ye;

Ayrıca bu süreçte desteğini sürekli yanımda hissettiğim, varlığı ile hayatı bana daha değerli kılan eşime, bugünlere gelmemde maddi ve manevi emeği geçen anne ve babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLOLARDİZİNİ	IX
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XI
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI	2
Tanımı	2
Etyolojisi	2
Kromozomal Anomaliler	2
Down sendromu	2
Patausendromu	2
Di George sendromu	3
Turner sendromu	3
Tek Gen Defektleri	3
Marfansendromu	3
Holt- Oramsendromu	3
Alagillesendromu	4
Noonan sendromu	4
Çevresel Maternal Faktörler	4
KKH SINIFLANDIRILMASI	5
Asiyantotik KKH	5
Atriyal Septal Defekt	5
Ventriküler Septal Defekt	8
Patent DuktusArteriyosus	9
KompletEndokardiyalYastıkDefekti	10
ParsiyelEndokardiyalYastıkDefekti	11
PulmonerDarlık	11
AortDarlığı	11
AortKoarktasyonu	12
Siyantotik KKH	12
BüyükArterTranspozisyonu	12
FallotTetralojisi	12
PersistanTrunkusArteriyozus	13
TriküspitAtrezisi	13
Total PulmonerVenözDönüşAnomalisi	14
Tek Ventrikül	14
Çift Çıkışlı Sağ Ventrikül	15
Ebstein Anomalisi	15
BAZI GENETİK TERİMLER VE MLPA YÖNTEMİ	15
KKH İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLER	20

GEREÇ VE YÖNTEM	22
MLPA YÖNTEMİ	23
Periferik Kandan DNA İzolasyonu	23
İzole Edilen DNA'nın Saflık	24
Değerlendirmesi	
DNA Denatürasyonu ve SALS A Probu	24
Miksole Hibridizasyonu	
Ligasyon Reaksiyonu	24
Polymerase Chain Reaction	25
PCR basamakları	25
MLPA sonuçlarının değerlendirilmesi	25
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	27
BULGULAR	29
TARTIŞMA	36
SONUÇLAR	46
KAYNAKLAR	48
EKLER	
EK 1: V14 nolu hasta verisi	
EK 2: V22 nolu hasta verisi	
EK 3: V31 nolu hasta verisi	
EK 4: V32 nolu hasta verisi	
EK 5: V33 nolu hasta verisi	
EK 6: V53 nolu hasta verisi	
EK 7: V63 nolu hasta verisi	
EK 8: V120 nolu hasta verisi	
EK 9: V141 nolu hasta verisi	
EK 10: V143 nolu hasta verisi	
EK 11: A2 nolu hasta verisi	
EK 12: A8 nolu hasta verisi	
EK 13: A20 nolu hasta verisi	
EK 14: A26 nolu hasta verisi	
EK 15: S3 nolu hasta verisi	
EK 16: S10 nolu hasta verisi	
EK 17: S11 nolu hasta verisi	
EK 18: S12 nolu hasta verisi	
EK 19: S13 nolu hasta verisi	
EK 20: S34 nolu hasta verisi	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASD	: Atriyaşseptaldefekt
AD	: Aort darlığı
AK	: Aort koartasyonu
BAT	: Büyük arter transpozisyonu
BMP4	: Bone morphogenetic protein 4
CRELD1	: Cysteine-rich whit EGF-like domains 1
CDC45	: Cell divisioncycle 45 homolog
EYD	: Endokardiyal yastık defekt
FT	: Fallottetralojisi
GATA4	: GATA binding protein 4
GATA5	: GATA binding protein 5
GATA6	: GATA binding protein 6
KKH	: Konjenital kalp hastalığı
MLPA	: MultiplexLigation-DependentProbe-Amplification
MSR1	: Macrophagescvengerreceptor
NKX2-5	: NK2 transcription factor related, locus 5
PDA	: Patent duktusarteriyosus
PD	: Pulmoner darlık
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TPVDA	: Totalpulmonervenöz dönüş anomalisi
TBX5	: T-box 5
TBX1	: T-box 1
TBX20	: T-box 20
TPVDA	: Totalpulmonervenöz dönüş anomalisi
VSD	: Ventrikülerseptaldefekt

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1	ASD tipleri.....	7
Şekil 2	VSD tipleri.....	8
Şekil 3	Parsiyel ve kompletendokardiyalseptaldefekt.....	10
Şekil 4	MLPA problemlerinin şematik gösterilmesi.....	17
Şekil 5	MLPA aşamaları.....	19

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1	Konjenital kalp hastalıkları sınıflandırılması.....	6
Tablo 2	SALSA MLPA P311 kiti.....	28
Tablo 3	Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler.....	30
Tablo 4	Konjenital kalp hastalığı tipleri.....	31
Tablo 5	Konjenital kalp hastalarındaki genetik mutasyonların tipleri.....	32
Tablo 6	VentrikülerSeptalDefektli hastalarda saptanan genetik mutasyonlar.....	33
Tablo 7	SiyanotikKonjenital Kalp hastalığı bulunan hastalarda saptanan genetik mutasyonlar.....	33
Tablo 8	Genetik mutasyon saptanan hastalardaki mutasyon tipleri.....	35

ÖZET

KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA GATA4, NKX2-5, TBX5, CRELD1 VE BMP4 GEN BÖLGELERİNİN MLPA YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Alper AKPINAR

Konjenital kalp hastalıklarının etiyolojisinde genetik ve çevresel etkenler rol oynamaktadır. Özellikle Downsendromu, Di George sendromu, Turner sendromu, Alagile sendromu, Noonan sendromu, Holt-Oram sendromu gibi hastalıklarda sık görülmekle birlikte; literatürde bazı genlerin kalp embriyogenezinde etkili olduğu ve bu genlerdeki mutasyonların konjenital kalp hastalıkları ile sonuçlanabildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada doğumsal kalp hastalığı olan çocuklarda doğumsal kalp hastalığı ile ilişkisi olduğu düşünülen *NKX2.5*, *GATA4*, *BMP4*, *TBX5* ve *CRELD1* genlerine ait mutasyonları MLPA yöntemi ile araştırıldı. Doğumsal kalp hastalığı olan toplam 255 hasta ile kontrol grubunu oluşturan 50 çocuktan alınan venöz kan örneklerini SALSALSA MLPA P311-A2CHD Prob Mix kiti ile değerlendirildi.

Hastaların 78'i perimembranöz, 66'sı müskülerventrikülerseptaldefekt (VSD), 60'ı sekundumatriyalseptaldefekt (ASD), 14'ü kompletendokardiyal yastık defekti ve 37'si siyanotikkonjenital kalp hastalığı idi. Konjenital kalp hastalığı olan 255 hastanın 20'inde toplam 24 adet genetik mutasyon saptandı. Hastaların hiçbirinde *NKX2.5* ve *CRELD1* mutasyonu saptanmadı. Üçü VSD, ikisi sekundum ASD olmak üzere toplam beş hastada *GATA4* gen bölgesinde mutasyon; dördü VSD, biri sekundum ASD olmak üzere toplam beş hastada *BMP4* gen bölgesinde mutasyon; VSD'li bir hastada *TBX5* gen bölgesinde mutasyon; VSD'li üç ve Fallottetrolojili üç hastada olmak üzere toplam altı hastada *MSR1* gen bölgesinde mutasyon saptandı. Downsendromlu hastaların hiçbirinde genetik mutasyon saptanmadı.

Sonuç olarak, konjenital kalp hastalıklarının gelişiminde *GATA4*, *BMP4*, *TBX5*, *MSR1* genlerindeki mutasyonların etkili olabileceği düşünüldü. Ancak bu konuda daha geniş vaka sayılarını içeren çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

SUMMARY

EVALUATION OF GATA4, NKX2.5, TBX5, CRELD1 and BMP4 GENES WITH MLPA TECHNIQUE IN CONGENITAL HEART DISEASE PATIENTS

Dr Alper AKPINAR

Genetic and environmental factors play an important role in etiology of congenital heart disease. Especially it is frequent in syndromes like Down syndrome, Di George Syndrome, Turner Syndrome, Alagille syndrome, Noonan syndrome, Holt-Oram syndrome; However, it is reported some genes are important in cardiac embryogenesis and mutations of these genes resulted with congenital heart diseases.

In our study, we investigated NKX2.5, GATA4, BMP4, TBX5 and CRELD1 gene mutations with MLPA technique. The venous blood samples of 255 patients with congenital heart disease and 50 healthy children as control group were collected and investigated with SALSA MLPA P311-A2 CHD ProbMix.

Seventy eight of patients had perimembranous and 66 of them had muscular ventricular septal defect (VSD). There were 60 patients with atrial septal defect (ASD), 14 patients with complete endocardial cushion defect and 37 patients with cyanotic congenital heart diseases. We detected total 24 mutations in 20 patients with congenital heart disease. We did not find any mutations NKX2.5 and CRELD1 genes in the patients. There was GATA4 gene mutation in the five patients (three of them with VSD, two of them with ASD), BMP4 gene mutation in five patients (one of them with secundum ASD, four of them with VSD) and TBX5 gene mutation in a patient with VSD, six patients had MSR1 mutation (three of them VSD, three of them with Fallot tetralogy). There was not found any mutation in patients with Down syndrome.

In conclusion, GATA4, BMP4, TBX5, MSR1 gene mutations could be important in congenital heart disease pathogenesis. However there was need the studies performed in larger numbers of patients with congenital heart disease in this issue.

GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital kalp hastalıkları (KKH), kalbin yada intratorasik damarların yapısal anomalileridir (1). Yenidoğanda en sık konjenital malformasyonları oluşturan, KKH'nın 1000 canlı doğumda 8 oranında görüldüğü ve prenatal kayıpların en sık nedenini oluşturduğu bildirilmektedir (2,3). Konjenital kalp hastalıkları ile ilgili Mendelian kalıtımı bulunan 4000'den fazla gen tanımlanmıştır. Ancak bu genlerin büyük çoğunluğunu malformasyon sendromları ve kromozomal anomaliler oluşturmaktadır.

Embriyolojik dönemde bazı gen mutasyonlarının konjenital kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaların çoğu hayvan deneyleri olmakla birlikte (4-6), kardiyak defektlerde genetik kalıtımla ilgilili azsayıda toplumsal çalışma bulunmaktadır (7-9). Ülkemizde de bu konuda sadece bir çalışma yapılmıştır (10).Konjenital kalp hastalıklarına yatkınlık yaratan genlerin tanımlanması; hastalığın taranması ve prenatal dönemde erken tanısı açısından yararlı olacaktır. Bu çalışmada Türk toplumunda KKH'da görülen gen mutasyonlarının araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla KKH nedeniyle Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Polikliniğinde izlenen hastalarda, kardiyak embriyogenezde etkili olduğu düşünülen *NKX2-5* 'NK2 transcription factor related, locus 5', *TBX5* 'T-box 5', *GATA4* 'GATA binding protein 4', *CRELD1* 'cysteine-rich whit EGF-like domains 1' ve *BMP4* 'bone morphogenetic protein 4' genlerindeki mutasyonlar 'Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification'(MLPA) tekniği kullanılarak araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI

Konjenital kalp hastalıkları kalbin yada büyük damarların yapısal anomalileridir (1).Konjenital kalp hastalıklarının prevalansı bölgeler arasında farklılık göstermekle birlikte 1000 doğumda 6 ile 13 arasında değişmektedir (3, 11-15). İngiltere’de yapılan bir çalışmada KKH prevalansı 1000 canlı doğumda 6,5 bulunurken (16), Atlanda’da 1000 canlı doğumda 8,1 olarak saptanmıştır (17). Tayvan’da 2000-2008 yılları arasında yapılan bir çalışmada ise (18);1000 canlı doğumda 13,1 olarak bildirilmiştir. Ülkemizden 2006 yılında yapılan bir çalışmada (19), KKH prevalansı 7,77/1000 olarak bildirilmiş ve literatürdeki diğer prevalans çalışmaları ile uyumlu olarak izole ventriküler septal defekt (VSD) %32,6 iken, ventriküler septal defekti %15,9 ile patent duktus arteriyosus (PDA) ve %13,1 ile atriyal septal defektin (ASD) izlediği görülmüştür.

Etiyoloji

Konjenital kalp hastalıklarının bilinen nedenleri arasında kromozomal anomaliler, tek gen hastalıkları, maternal teratojen maruziyeti yer almaktadır.Ancak sadece %15’inde altta yatan bir neden gösterilebilmiştir.KKH’larının %85’inin etyolojisinde multifaktöriyel etkiler söz konusudur (9).

Kromozomal anomaliler: Kromozomal anomaliler kompleks lezyonlarının bir parçası olarak konjenital kalp hastalıklarına sebep olurlar (16).

- Down sendromu (trizomi 21): Kromozom 21’in bir bölümünden ya da tamamından üç kopya bulunması ile karakterize olan sendrom orta derecede mental retardasyonun en sık nedenidir. İnsidansı 1/733’dir. Hastalarda karakteristik dismorfik bulgular, mental motor retardasyon, hipotiroidi, gastrointestinal sistem anomalilerine ilaveten %50 oranında endokardiyal yastık defekti (EYD), VSD, izole sekundum ASD, PDA, Fallot tetralojisi (FT) gibi konjenital kalp hastalıkları görülebilmektedir (20).

- Patau sendromu (trizomi 13): İnsidansı 1/10000 olan sendromun kardinal bulguları motor ve mental gerilik, mikrosefali, mikroftalmi, holoprozensefali, hipotelorizm, yarık damak ve/veya yarık dudak, kardiovasküler, genitoüriner, oküler malformasyonlardır. Kardiyovasküler malformasyonlar genellikle VSD, ASD, PDA, aort koarktasyonu, biküspit aortik kapak ya da pulmoner kapak hastalıklarından oluşmakla birlikte hastaların %90’ı yaşamın ilk yılında kaybedilirler (20).

- Di George sendromu (22q11 mikrolelesyonu): Kromozom 22q11.2’de görülen mikrolelesyon sonucu gelişen sendromun prevalansı 1/4000 olarak bildirilmiştir (20).

Etiyolojide sorumlu tutulan *TBX1*; geni T-box transkripsiyon ailesine bağılı olup, Di George sendromlu hastalarda fenotipin belirleyicisidir. Farinks arkının gelişiminin sorumlu olmakla birlikte büyük damar anomalilerinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (21, 22). Hastalığın klasik triadı konontrunkal anomaliler, timus aplazisi ve hipokalsemidir. Ayrıca trakeomalazi, bronkomalazi, tiroid agenezisi, özafagus atrezisi, gastroözafageal reflü, koanal atrezi, yarık damak-dudak sendroma eşlik edebilir. Hastalarda timüs aplazik olduğu için T hücre fonksiyon bozukluğu ve buna bağılı hücre sel immün yetmezlik görülmektedir (23).

- Turner sendromu (45,X): Monozomi X olarak da bilinen sendrom 1/2000- 1/5000 doğumda bir görülmektedir. Kısa boy, ayrık meme ucu, düşük kulak, yele boyun gibi fenotipik özellikleri olan hastalarda gonadal disfonksiyon ve buna bağılı amenore görülmektedir. Turner sendromlu olguların yaklaşık %20-30'unda aortik kapak hastalıkları görülürken, aort koarktasyonu görülme oranı %3 olarak bildirilmektedir (24, 25).

- **Tek gen defektleri:** Tek gen hastalıkları bir sendromun parçası olarak ya da tek başına konjenital kalp hastalıklarına neden olabilmektedirler.

- Marfan sendromu: Bir bağı dokusu hastalığı olan sendrom, fibrillin 1 proteinini kodlayan gen olan FBN1 gen mutasyonu sonucu oluşmaktadır. İskelet sistemi anomalileri ile birlikte lens dislokasyonu görülmekle birlikte, en önemli ve ölümcül komplikasyonu aort anevrizması ve diseksiyonudur (26).

- Holt- Oram sendromu: Prevelansı 1/100000 olan hastalık, otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Transkripsiyon faktörü olan *TBX5* mutasyonu sonucu görülen sendromda ASD, VSD ve iletim defektleri ile birlikte, üst ekstremité anomalileri görülmektedir (27).

- Alagille sendromu: 20p12 bölgesinde bulunan JAG1 mutasyonu notch sinyal yolunda bozulmaya neden olmakta ve bu durum safra yollarında yetersizlik ile birlikte kardiyovasküler malformasyonların oluşması ile sonuçlanmaktadır. Kardiyak malformasyonlardan en sık periferik ve valvuler pulmoner darlık ve Fallot tetralojisi görülmektedir (28).

- Noonan sendromu: İnsidansı 1/1000-2500 olarak görülen bu sendrom, otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Vakaların %50'sinde Ras sinyal yolağında bulunan PTPN11 gen mutasyonu görülmektedir. RAF1 (%3), SOS1 (%13) ve KRAS (%5) gen mutasyonları da sendromun etyolojisinde yer almaktadır. Kısa boy, pektus ekskavatum, yele boyun ile

karakterize bu sendromda, pulmoner darlık, ASD ve hipertrofik kardiyomiyopati görülebilmektedir (29).

Çevresel ve Maternal Faktörler: Kalp ve vasküler sistem oluşumu intrauterin dönemde gestasyon ortasında hemen hemen tamamlanmış olur. Bu nedenle gebeliğin ilk ayları kardiyovasküler malformasyonlar açısından kritiktir. Annenin gebelikte kullandığı busulfan, lityum, retinoidler, talidomid trimetoprim ve valproik asit gibi ilaçlar kardiyovasküler sistem için teratojeniktir (30, 31). Busulfanın teratojen olduğu hayvan modellerinde gösterilmiştir. Ancak insanlarda teratojenite ile ilgili çalışma bulunmamaktadır (30). Lityum triküspit atrezisi ve Ebstein anomalisi ile ilişkili olmakla birlikte, manik depresif hastalığı bulunan annelerde hastalığın fetüse etkileri kar-zarar oranına göre değerlendirilerek bazı durumlarda kullanılmaktadır. Valproik asit folat metabolizması üzerinden etki göstermektedir. Annede folik asit eksikliği bulunmasının fetüste kardiyovasküler malformasyon riskini arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle prekonsepsiyon döneminde bir ay, postkonsepsiyonel dönemde ise iki ay süreyle annelere folik asit desteği verilmesi önerilmektedir (32). Yüksek doz A-vitamini içeren ilaçların fetüste kardiyak dokunun hiç oluşmamasından VSD, FT ve büyük arter transpozisyonuna (BAT) kadar uzanan farklı etkileri bulunabileceği gösterilmiştir (33). Annenin kokain kullanımı fetal miyositlere direk toksik etkide bulunarak apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Bunun sonucunda kardiyovasküler malformasyonlar, ventrikül yapısında anomaliler ve intrakardiyak iletim defektleri gelişebilmektedir (33). Annenin özellikle ilk trimestırda alkol kullanımı fetal alkol sendromuna yol açar ve başta ASD olmak üzere VSD, pulmoner darlık ve büyük arter transpozisyonuna eşlik edebilir (33). Gebelikte sigara kullanımı da hipoksi ve nikotin maruziyeti sonucu miyosit hasarına neden olmaktadır. Annenin pasif içiciliğinin de aktif sigara içiciliği kadar kardiyovasküler malformasyon açısından ciddi bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (34).

İlk trimestırda annenin geçirdiği ateşli hastalıklar ile kardiyak malformasyonlar arasında ilişki bulunmuştur. Annede HIV-1 pozitifliğinin bulunması durumunda fetüste anormal kalp gelişiminin olduğu, bu hastalarda sol ventrikül disfonksiyonu geliştiği gösterilmiştir (35). İlk trimestırda geçirilen rubella enfeksiyonu, konjenital rubella sendromu ile ilişkilidir. Bu sendromda işitme kaybı ve görme bozukluklarına ek olarak, başta PDA olmak üzere çeşitli KKH'ları görülebilmektedir (36).

KONJENİTAL KALP HASTALIKLARININ SINIFLAMASI

Doğuştan kalp hastalıkları siyanozun bulunup bulunmamasına göre asiyanotik ve siyanotik konjenital kalp hastalıkları olarak ikiye ayrılır (Tablo 1).

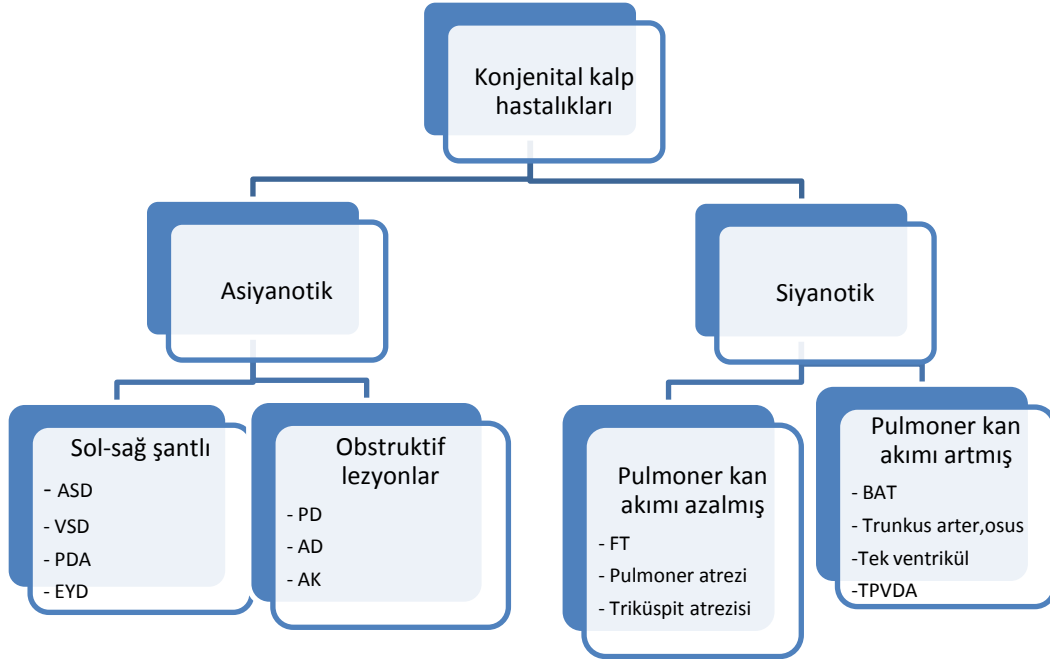
Asiyanotik konjenital kalp hastalıkları; kalpte baskın olan fizyolojik yükün durumuna göre ayrıca kendi içerisinde sınıflandırılabilir. En yaygın lezyonlar hacim yükü oluşturan sol-sağ şantlı lezyonlarıdır.

ASİYANOTİK KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI

Atriyal Septal Defekt (ASD)

Atriyal septal defekt, izole anomali olarak tüm doğuştan kalp hastalıklarının %5-10'unu oluştururken; doğuştan kalp hastalıklarının %30-50'sinde kalp defektlerinin bir parçası olarak olaya eşlik eder. Kızlarda erkeklerden iki kat fazla görülür (37,38).

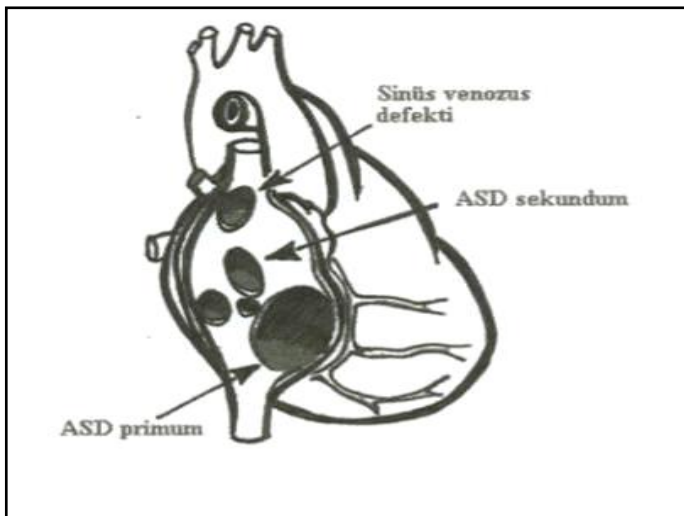
Tablo 1. Konjenital kalp hastalıkları sınıflaması



ASD: Atrial septal defekt, VSD: Ventriküler septal defekt, PDA: Patent duktus arteriosus, EYD: Endokardiyal yastık defekti, PD: Pulmoner darlık, AD: Aort darlığı, AK: Aort koarktasyonu, FT: Fallot Tetralojisi, BAT: Büyük arter transpozisyonu, TPVDA: Total pulmoner venöz dönüş anomalisi

ASD'lerin, sekundum, primum ve sinus venosus tipi defekt olmak üzere üç tipi vardır. Diğer bir nadir görülen bir formu da koroner sinus ASD'dir. Ostiyum sekundum tipi ASD'ler tüm ASD'lerin %50-70'ni oluşturur. Defekt, fossa ovalis bölgesinde bulunur ve kanın sol atriyumdan sağ atriyuma sol-sağ şantına yol açar. Olguların %10'unda anormal pulmoner venöz dönüş anomalisi vardır. Ostiyum primum ASD, endokardiyal yastık defektinin bir parçasıdır ve %30 oranında görülür. Sinüs venosus tipi ASD ise; %10 oranında görülür. En sık süperior vena kavanın sağ atriyuma giriş bölgesinde olan süperior vena kaval tip şeklindedir. Bu durum sıklıkla sağ akciğer üst pulmoner venin anormal dönüşüyle ilişkilidir. İnférieur vena kavanın sağ atriyuma giriş bölgesinde görülen inferior vena kaval tipi ise, sağ akciğerin inferior vena kava içerisine anormal dönüşü ile ilişkilidir. Koroner sinus tipi ASD'de, koroner sinus tavanında defekt vardır (Şekil 1).

Hastalar genellikle asemptomatiktir. Fizik muayenede ikinci kalp sesi sabit ve çifttir. Pulmoner odakta daha belirgin olmak üzere sistolik ejeksiyon üfürümü duyulur. Elektrokardiyografide sağ aks sapması, hafif sağ ventrikül hipertrofisi ve sağ dal bloğu gözlenir. Ekokardiyografi defektin boyutu ve pozisyonunu gösterir. Belirgin sol-sağ şanttan dolayı sağ atriyum ve ventrikülün genişlemesi, pulmoner kapakta velosite artışının eşlik ettiği pulmoner arter dilatasyonu görülebilir.



Şekil1.ASD tipleri

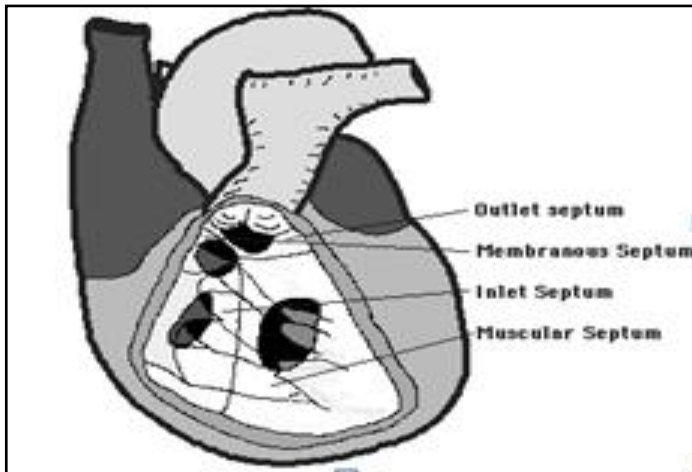
Orta-küçük ostiyum sekundum defekti olan hastalarda defekt, spontan olarak kapanabilmektedir. Ancak defekt sekiz milimetreden büyükse nadiren kendiliğinden kapanmaktadır. Enfektif endokardit riski oldukça düşük olması nedeni ile ostiyum sekundum defektlerde enfektif endokardit profilaksisi önerilmez. Serebrovasküler olay, ASD yoluyla paradoksik emboli sonucu nadiren görülebilmektedir. Geniş defektler tedavi edilmezse ileri yaşlarda pulmoner hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği gelişebilir (37,38).

ASD'lerde uygun endikasyonlarda kateter yolu ile yerleştirilen cihazlarla cerrahi olmayan kapatma yöntemi uygulanabilir. Transkateter yolu ile kapatmaya uygun olmayan ancak kapatma endikasyonları bulunan hastalara cerrahi kapatma işlemi uygulanır (37,38).

Ventriküler Septal Defekt (VSD)

Ventriküler septal defekt, en sık görülen konjenital kalp hastalığıdır ve KKH'nın %15-20'sini oluşturur.

İnterventriküler septum, küçük membranöz kısım ve geniş mürsküler kısımdan oluşur. Mürsküler septumun inlet septum, trabeküler septum, outlet septum olmak üzere üç bölümü vardır. VSD'ler yerleştikleri bu bölgelere göre tiplendirilirler (Şekil 2). Trabeküler septum ayrıca anterior, posterior, orta ve apikal kısımlara da ayrılır.



Şekil 2. VSD tipleri

Membranöz septum aort kapağının hemen altındadır. Bu bölgede yerleşen membranöz VSD'ler tüm VSD'lerin %70'ini oluşturur. Outlet defektler; VSD'lerin %5-30'unu oluşturmaktadır. Bu tip VSD'lerde aort yaprakçığı VSD içerisinden prolobe olabilir ve aort

yetersizliğine neden olabilir. İnlet defektler ise VSD'lerin %5-8'ini oluşturur ve triküspit kapak septal yaprakçığın altında yer alırlar.Trabeküler veya mürküler defektler, VSD'lerin %5-20'sini oluşturmaktadır.

Küçük VSD'ler genellikle asemptomatiktir.Orta-geniş VSD'li hastalarda süt çocukluğu döneminde büyüme-gelişme geriliği, egzersiz intoleransı, tekrarlayan akciğer enfeksiyonları sıktır.Fizik muayenede sternum sol alt kenarında pansistolik üfürüm tipiktir.Küçük VSD'lerde elektrokardiyografi normalken, orta- geniş VSD'li hastalarda sol ventrikül hipertrofisi görülür.Ekokardiyografi ile defektin yeri ve boyutu belirlenir. Eşlik eden diğer anomaliler ve şantın miktarı belirlenebilir.

Membranöz ve mürküler VSD'lerin %30-40'ı hayatın ilk 6 ayı içerisinde kendiliğinden kapanır.İNlet ve outlet defektler kendiliğinden kapanmaz. Geniş VSD'li hastalarda 6-8 hafta içinde konjestif kalp yetmezliği gelişebilir. Enfektif endokardit riski vardır.Konjestif kalp yetmezliği bulunan hastalarda kalp yetmezliği tedavisi ve yeterli kilo alımı ile defektin küçülmesi beklenerek operasyon geciktirilir.Konjestif kalp yetmezliği tedavisi verilmesine rağmen büyüme geriliği düzelmeyen hastalar, ilk yıl içinde opere edilirken; tıbbi tedaviye yanıt veren süt çocuklarının operasyonu ise geciktirilmelidir. Bir yaşından sonra pulmoner kan akımının, sistemik kan akımına oranı oranı (Qp/Qs) oranı 2'den fazla olan hastalarda kapatma gerekir (37, 38).

Patent Duktus Arteriyosus (PDA)

Sol pulmoner arter ve sol subklavian arter çıkışından yaklaşık 5-10mm distalindeki inen aorta arasında bulunan normal '*duktus*' yapısının devam etmesidir.Prematüreler hariç patent duktus arteriyosus tüm doğuştan kalp defektlerinin %5'ini oluşturur. Erkek/kız oranı: 1/3'tür.

Küçük PDA'lar genellikle asemptomatiktir.Geniş şantlı PDA'lar ise, akciğer enfeksiyonu ve konjestif kalp yetmezliğine neden olabilir.Fizik muayenede geniş nabız basıncı ve sıçrayıcı periferik nabız karakteristiktir.Sternum sol üst kenarında ve klavikula altında devamlı üfürüm tipiktir.Pulmoner vasküler obstruktif hastalık geliştiğinde oluşan sağ-sol şant, sadece vücudun alt yarısında siyanoza neden olur.

Geniş PDA'larda elektrokardiyografide sol aks ve sol ventrikül hipertrofisi izlenir.Ekokardiyografi ile patent duktus arteriyosusun boyutu belirlenebilir. Sol atriyum ve ventrikül boyutları değerlendirilir.

Prematüre bebeklerde hipoksi ve PGE1 nedeniyle duktus açık kalırken; zamanında doğmuş bebeklerde duktusun media ve intima tabakalarının yapısal hasarı nedeniyle açıktır. Bu nedenle prematürelerin aksine zamanında doğmuş bebeklerde PDA'nın kapanma olasılığı

daha azdır. Enfektif endokardit riski vardır.Şant geniş olduğunda konjestif kalp yetmezliği ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonları görülebilir.

Zamanında doğan bebeklerde farmakolojik kapatma tedavileri etkili değildir.Kalp yetmezliği gelişmesi halinde antikonjestif tedavi uygulanabilir.Hemodinamik olarak önemli duktus, yaşa bakılmaksızın kapatılmalıdır.Çeşitli cihazlar kullanılarak PDA'lar kateter yoluyla kapatılabilmektedir.Bu tekniklere uygun olmayan hastalara cerrahi kapatma yöntemi uygulanır (37, 38).

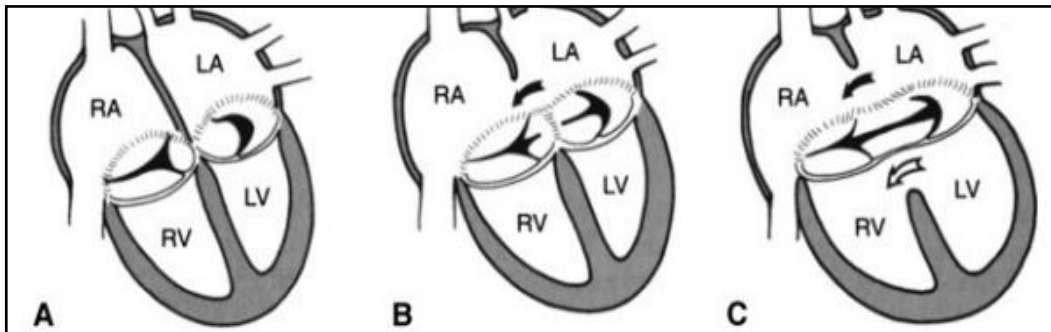
Komplet Endokardiyal Yastık Defekti (EYD)

Komplet endokardiyal yastık defekti doğuştan kalp hastalıklarının %2'sini oluşturur.Komplet EYD'li hastaların %70'i Down sendromludur.Down sendromlu çocukların %40'ında doğuştan kalp hastalıkları bulunur ve bu defektlerin %50'si EYD'dir.

Patolojik olarak, ostiyum primum ASD, inlet VSD, mitral kapak anterior ve triküspit kapak septal yapraklarında yarıklar vardır (Şekil 3c).

Klinikte büyüme geriliği, konjestif kalp yetmezliği, tekrarlayan akciğer enfeksiyonu bulguları siktir.Sternum sol alt kenarında holosistolik üfürüm duyulur.Elektrokardiyografide sol-süperior QRS aksı karakteristiktir.Ekokardiyografi ile defektin boyutu ve ağırlığı değerlendirilebilir.Anjiyografide karakteristik 'kuğu boynu deformitesi' görülebilir.

Erken dönemde kalp yetmezliği bulguları ve akciğer enfeksiyonları gelişir.Bir yaştan sonra pulmoner vasküler obstruktif hastalık gelişmeye başlar.Bu nedenle erken süt çocukluğu döneminde cerrahi düzeltme uygulanmalıdır (37, 38).



Şekil3.Parsiyel ve komplet EYD

Parsiyel Endokardiyal Yastık Defekti

Parsiyel EYD'de atriyoventriküler kapaklarda yarıklar ve ostiyum primum ASD vardır (Şekil 3b).Doğuştan kalp hastalıklarının %1-2'sini oluşturur.

Ostiyum primum ASD'li hastalar genellikle çocukluk çağı boyunca asemptomatiktir. Ortak atriyum ya da mitral yetmezlik varlığında, tekrarlayan akciğer enfeksiyonu, büyüme geriliği gibi belirtiler bulunabilir. Fizik muayenede mitral kapak yetmezliğine bağlı sistolik ejeksiyon üfürümü duyulabilir. Elektrokardiyografide sol- superior QRS aksı karakteristiktir. Olguların yaklaşık %50'sinde birinci derece atriyoventriküler blok bulunur. Ekokardiyografi tanı koydurur.

Defekt kendiliğinden kapanmaz. Parsiyel EYD varlığı cerrahi onarım endikasyonudur. Çocukluk çağında konjestif kalp yetmezliği görülebilir. Bu durum mitral yetmezlik ve diğer eşlik eden defektler ile ilişkilidir. Erişkin dönemde pulmoner hipertansiyon gelişebilir. Hastaların %20'sinde aritmiler görülür (37, 38).

Pulmoner darlık (PD)

İzole pulmoner darlık tüm doğumdal kalp hastalıklarının %8-12'sini oluşturur. Pulmoner darlık; valvuler, subvalvuler (infundibuler) ve supralvalvuler olabilir. Sağ ventrikül genellikle normal olsa da kritik PD'da hipoplastiktir. Displastik kapaklar genellikle Noonan sendromunda görülürken; izole infundibuler darlıklar ise, nadirdir ve genellikle FT'de olduğu gibi geniş VSD ile birlikte. Supralvalvuler pulmoner arter darlığı sıklıkla konjenital Rubella sendromu, Williams sendromu, Noonan sendromu, Alagille sendromu, Ehler Danlos sendromu ve Silver Russel sendromu gibi sendromlarla görülebilir (37, 38).

Aort Darlığı (AD)

Tüm doğuştan kalp hastalıklarının %10'unu oluşturur. Erkeklerde kızlardan dört kat daha sıktır. Aort darlığı valvüler, subvalvuler ve supralvalvüler düzeyde görülebilir. En sık valvular darlık görülürken (%71); subvalvuler darlık %23, supralvalvuler darlık ise %5-6 oranında görülmektedir. Valvuler aort darlığı, en sık biküspit aortik kapak nedeniyle görülür. Supralvalvuler AD ise Williams sendromu ile birlikte (37, 38).

Aort Koarktasyonu (AK)

Doğuştan kalp hastalıklarının %8-10'unu oluşturan aort koarktasyonu, erkeklerde kızlardan iki kat daha fazla görülür. Koarktasyonun proksimal ve distal segmentleri arasında kollateral dolaşım bulunurken, hastaların %85'inde biküspit kapak eşlik eder. Turner sendromlu olguların %30'unda AK bulunur (37, 38).

SİYANOTİK KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI

Büyük Arter Transpozisyonu (BAT)

Tüm doğuştan kalp hastalıklarının %5-7'sini oluşturan büyük arter transpozisyonu, erkeklerde kızlardan üç kat daha fazla görülür. Aort vücuda desatüre kanı taşır, önden ve sağ

ventrikülden çıkar.Pulmoner arter arkadan, sol ventrikülden çıkar ve akciğerlere oksijenlenmiş kanı taşır.Tüm vücutta hipoksik kanın dolaşması yaşamla bağdaşamaz.İki dolaşımın karışmasına izin veren ASD, VSD ya da PDA gibi defektler yaşam için gereklidir.

Siyanoz doğumdan itibaren her zaman vardır.Hipoksemi oksijene yanıt vermez. Fizik muayenede yenidoğanda orta-ağır siyanoza takipne eşlik eder. İkinci kalp sesi tek ve şiddetlidir.VSD ile birlikte olan hastalarda holosistolik VSD üfürümü duyulabilir.Elektrokardiyografide sağ QRS aksı vardır. İlk günlerden sonra genellikle sağ ventrikül hipertrofisi bulunur.Tanı için anatomik ve fonksiyonel bilgiyi ekokardiyografi sağlar.Cerrahiye kadar geçen sürede PGE1 infüzyonu ile duktus açık tutulmalıdır. Karışımı yeterli olmayan olgularda operasyona kadar balon atriyal septostomi yapılır. Hastalara en kısa sürede cerrahi düzeltme yapılmalıdır (37, 38).

Fallot Tetralojisi (FT)

Tüm doğuştan kalp hastalıklarının %5-10'unu oluşturan Fallot tetralojisi, en sık görülen siyanotik konjenital kalp hastalığıdır.Geniş VSD, sağ ventrikül çıkış yolu darlığı, sağ ventrikül hipertrofisi ve aortanın '*overriding*'ini içeren dört anomaliyi kapsar. Anomalinin en ağır formunda pulmoner kapak atretiktir.Hastaların %5'inde koroner anomaliler eşlik eder.

Doğumda üfürüm duyulur.Hastaların çoğunda doğumdan kısa süre sonra siyanoz belirir.Pulmoner atrezili olan yenidoğanlarda doğumdan hemen sonra ağır siyanoz görülür. Fizik muayenede değişken derecede siyanoz, takipne ve parmaklarda çomaklaşma vardır. Sıklıkla sternum sol üst ve orta kenarında sistolik üfürümvardır.Elektrokardiyografide sağ aks ve sağ ventriküler hipertorfi; direk grafide bot şeklinde kalp ya da '*coeure en sabot*' görünümü tipiktir.Ekokardiyografi ile hastalığın tanısı ve şiddeti belirlenir. Eşlik eden anomaliler belirlenebilir.

Hastalarda siyanoz varsa giderek artarken, asiyanotik hastalarda ilerleyen zamanlarda siyanoz görülür.Siyanoza ikincil olarak polisitemi gelişir. Süt çocuklarında huzursuzluk ve ağlamamanın neden olduğu sağ ventrikül çıkış yolu darlığının artması ve kan akımının azalmasına bağlı olarak, FT'nin en önemli komplikasyonu olan hipoksik nöbetler görülebilir. Siyanoz şiddetli ise büyüme geriliği beklenir.Nadiren beyin apsesi ve serebrovasküler olay gelişebilir.Enfektif endokardit riski vardır.Koagulopati siyanozun geç komplikasyonudur.

Hipoksik nöbetlerin önlenmesi için oral propranolol kullanılmalıdır. Göreceli demir eksikliği taranmalı ve tedavi edilmelidir. Pulmoner kan akımını arttırmak amacıyla palyatif şant operasyonları uygulanabilir. Tam onarım ameliyatı, oksijen saturasyonunun %75-80'den az olması halinde yapılır. Semptomatik süt çocuklarına 3-4 aylık olduktan sonra primer onarım

uygulanabilirken; asemptomatik hastalar, asiyanotik olsalar bile 1-2 yaşında primer onarım yapılması gereklidir.Erken primer onarım ile sağ ventrikül hipertorifisi ve fibrozisinin azalması ile pulmoner arterlerin normal genişlemesi, aritmilerin azalması ile ölüm riskini azaltılması amaçlanmaktadır (37, 38).

Persistan Trunkus Arteriyozus

Tüm doğuştan kalp hastalıklarının %1'den azını oluşturmaktadır.Kalpten trunkal kapakla birlikte tek bir arter gövdesi ayrılır ve pulmoner, sistemik ve koroner dolaşımlara dallar verir.Trunkal kapağın altında geniş perimembranöz VSD bulunur. Hastaların %33'ünde hipokalsemi ile birlikte DiGeorge sendromu eşlik eder.

Hastalar kalp yetmezliğine yönelik tedavi edilmelidir.Di George sendromu açısından hastalar araştırılmalıdır.Trunkus arteriyozus tipine göre cerrahi operasyonun tipi ve hastalığın seyri değişir(37, 38).

Triküspit Atrezisi

Doğuştan kalp hastalıklarının %1-3'ünü oluşturur.Triküspit kapak atretiktir. Sağ ventrikül hipoplastiktir ve giriş kısmı yoktur. Yaşamın devamlılığı için ASD, VSD veya PDA gibi defektler gereklidir.Olguların %70'inde büyük arterler normal ilişkideyken; %30'unda transpozisyon bulunur.Hastaların %30'ünde ise L-tipi transpozisyon vardır.

Bu hastalarda doğumdan itibaren ciddi siyanoz görülür.Belirgin takipne ve beslenme zorluğu vardır.Elektrokardiyografide süperior QRS aksı karakteristiktir.Sol ventrikül hipertorfisi bulunur.Ekokardiyografide triküspit orifis yokluğu, belirgin sağ ventrikül hipoplazisi ve geniş sol ventrikül görülür.Cerrahi düzeltme yapılmayan hastalar 6 ay içerisinde kaybedilir.Yenidoğanlara PGE1 infüzyonu başlanarak PDA açık tutulmalıdır.Palyatif operasyonlar ardından Fontan tipi ameliyat yapılır (37, 38).

Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi (TPVDA)

Tüm doğuştan kalp hastalıklarının %1'ini oluşturur.Pulmoner venler ile sol atriyum arasında doğrudan ilişki yoktur.Pulmoner venler direkt veya sistemik venler aracılığı ile sağ atriyuma açılır.Pulmoner venlerin açıldığı yere bağlı olarak suprakardiyak, kardiyak, infrakardiyak ve mikst olmak üzere dört tipi vardır.Suprakardiyak tip,TPVDA'li hastaların %50'sini oluşturur ve ortak pulmoner venöz sinus sol vertikal ven ve sol innominate ven yolu ile süperior vena kavaya dökülür. Kardiyak tipe pulmoner venler sağ atriyuma ayrı ayrı dört yerden veya ortak pulmoner venöz sinus aracılığı ile koroner sinüse açılır.İnfrakardiyak tip, TPVDA'li hastaların %20'sini oluşturur.Ortak pulmoner venöz sinus portal ven, duktus venosus, hepatic ven veya inferior vena kava açılır.

Siyanoz, büyüme geriliği, konjestif kalp yetmezliği ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonları görülebilir. Elektrokardiyografide sağ ventrikül hipertrofisi, direk grafide suprakardiyak tip TPVDA'de 'kardan adam' belirtisi ya da '8' şekli görülebilir. Cerrahi onarım yapılmazsa hastaların çoğu bir yaşından önce kaybedilirler (37, 38).

Tek Ventrikül

Tüm doğuştan kalp hastalıklarının %1'inden azını oluşturur. Her iki atriyoventriküler kapak, ana tek ventriküle açılır ve ana odacık bulboventriküler foramen yoluyla rudimenter bir odacığa bağlanır. Ana odacıktan tek büyük arter çıkarken, diğeri rudimenter odacıktan çıkar. Olguların %85'inde büyük arter transpozisyonu bulunur.

Doğumdan itibaren farklı derecelerde siyanoz bulunabilir. Fizik muayene bulguları pulmoner kan akımına bağlıdır. Pulmoner kan akımında artış varsa, fizik muayene bulguları geniş VSD'li hastalara benzerken; pulmoner kan akımında azalma varsa FT'a benzer.

Pulmoner darlığı olmayan hastalarda erken süt çocukluğu döneminde pulmoner hipertansiyon veya konjestif kalp yetmezliği gelişebilir. Cerrahi uygulanmayan hastalar genellikle bir yıl içerisinde kaybedilirler. Palyatif operasyonlar ardından 18-24 aylıkken Fontan tipi ameliyat uygulanır (37, 38).

Çift Çıkışlı Sağ Ventrikül

Tüm KKH'larının %1'inden azını oluşturur. Sıklıkla diğer kompleks defektlerin eşlik ettiği heterotaksili hastalarda bulunur. Hem aorta hem de pulmoner arter sağ ventrikülden çıkarken, sol ventrikülün tek çıkışı geniş VSD'dir. Ventriküler septal defektin pozisyonu ve pulmoner darlığın varlığı hemodinamik durumu etkiler ve çift çıkışlı sağ ventrikül tiplerini belirler.

Klinik bulgular çift çıkışlı sağ ventrikülün tipine göre değişir. PD'lığı olmayan subaortik VSD'li olgularda siyanoz hafifken, PD'lı olgularda siyanoz belirgindir ve klinik FT'e benzer. Kalp yetmezliği tedavisi ve defektin tipine göre düzeltici operasyonlar yapılmalıdır (37, 38).

Ebstein Anomalisi

Triküspit kapakların Ebstein anomalisi tüm KKH'nın %1'inden azını oluşturur. Triküspit kapağın septal ve posterior yaprakçıkları, sağ ventrikül kavitesinin içinde apekse doğru yerleşmiştir. Bu durumda sağ ventrikülün bir kısmı sağ atriyuma dahil olur ve sağ ventrikül fonksiyonel hipoplazisiyle sonuçlanır. Tüm hastalarda sağ-sol şantlı interatriyal bağlantı vardır. Sıklıkla '*Wolf Parkinson White*' sendromu eşlik eder ve hastalarda supraventriküler taşikardi yatkınlığını oluşturur (37,38).

BAZI GENETİK TERİMLER ve MLPA YÖNTEMİ

Gen:Fonksiyonel bir ürün oluşturmak için gerekli olan kromozomal DNA dizisidir. Genler her hücrenin çekirdeğinde kromozom adı verilen organelleri oluşturan DNA'da kodlanmaktadır ve kromozom üzerinde kesin pozisyonu veya lokusu olacak şekilde doğrusal biçimde sıralanmışlardır. Herhangi bir spesifik lokusta aynı genin özdeşi veya çok az farklı formu olabilir ve allel olarak adlandırır (39).

Ekzon: Gen tarafından kodlanan ve RNA işlenmesi ardından olgun RNA'da yer alan nükleik asit dizisidir (39).

Mutasyon:DNA'daki gen yapısını oluşturan nükleotid çiftlerinin sıralamasında veya yapısında oluşan, sentez edilecek olan proteinin yapısını ve işlevini saptırıcı nitelikteki değişikliklere mutasyon denir. Mutasyonun en önemli sonuçlarından birisi, bir sonraki kuşağa farklı genetik özellikler aktarılmasına neden olmasıdır (39).

Bir DNA dizisindeki tek bir nükleotid değişimi (veya nokta mutasyonu) üçlü bazdaki kodu değiştirebilir ve gen ürününde bir aminoasidin diğeriyle yer değiştirmesine sebep olabilir: '*Missense mutasyonlar*'. İnsanlarda genetik hastalığa neden olan mutasyonların yarısı bu mutasyonlardır. Üç '*stop kodonundan*' birini meydana getiren mutasyon; '*nonsense mutasyon*' olarak adlandırılır. Bu mutasyonlar, hastalığa neden olan mutasyonların %12' sini içerir.

Mikrodelesyon:Kromozomal mutasyon tiplerinden biridir. Tek gen hastalıklarında, bozukluğu moleküler metotla tanımlanan gen içi mutasyonları ile oluşurken; mikrodelesyonlar, komşu birkaç geni ortadan kaldırarak mutasyona neden olurlar. Bu nedenle mikrodelesyon sendromları '*contiguous gen sendromu*' olarak da adlandırılırlar (39).

MLPA Yöntemi

'*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*' (MLPA), güncel bir yöntemdir ve tek reaksiyonla 50'ye yakın ilişkili gen bölgesinin değerlendirilmesine imkan vermektedir. '*Relatif kantitatif PCR*' olarak adlandırılan bu yöntem, ilk defa 2002 yılında yılında Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (40). MLPA, uygulaması kolay bir yöntemdir ve 45 dizinin amplifikasyonu için 20ng DNA yeterlidir(40).MLPA reaksiyonunda amplifiye olan hedef dizi değil, hedef diziye hibridize olan MLPA problemleridir. Standart bir multipleks PCR'dan farklı olarak, sadece bir tek primer çifti kullanılır. Elde edilen amplifikasyon ürünleri 130-490 baz çifti uzunluğunda olup, jelde yürütülür ve kapiller elektroforez sistemi yardımıyla pikler elde edilir. Bu pikler referans örnekler ile karşılaştırılarak, delesyonlar veya amplifikasyonlar tespit edilebilir.

MLPA probaları hedef diziyeye hibridize olduklarında, her prob için birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid dizisi tasarlanmıştır. Bütün hibridize problemler, 5' ve 3' uçlarında PCR ile aynı anda tek primer çifti ile amplifiye olmaları için sabit evrensel primer dizileri içermektedir. Prob uzunluğunun ayarlanması için genellikle her iki oligonükleotid parçasında dolgu (stuffer) dizisi bulunmaktadır. 3' oligonükleotid parçası, 5' ucundan fosforiledir. Dolayısıyla 5' oligonükleotid parçası ile birleşebilir. Her MLPA probunun 5' oligonükleotid parçasının 5' ucunda 19 nükleotidlik evrensel primer dizisi; 3' ucunda ise, 21-30 nükleotid uzunluğunda hedefe özgü dizi bulunmaktadır. 3' oligonükleotid parçasının 3' ucunda ise, 23 nükleotid uzunluğunda evrensel primer dizisi; 5' ucunda ise, 25-43 nükleotid uzunluğunda ilk proba komşu hedef diziyeye hibridize olacak dizi bulunmaktadır. 19-370 nükleotid uzunluğundaki dolgu dizisi de probun 3' oligonükleotid ucuna eklenerek, toplam prob uzunluğu ayarlanır (Şekil 4).

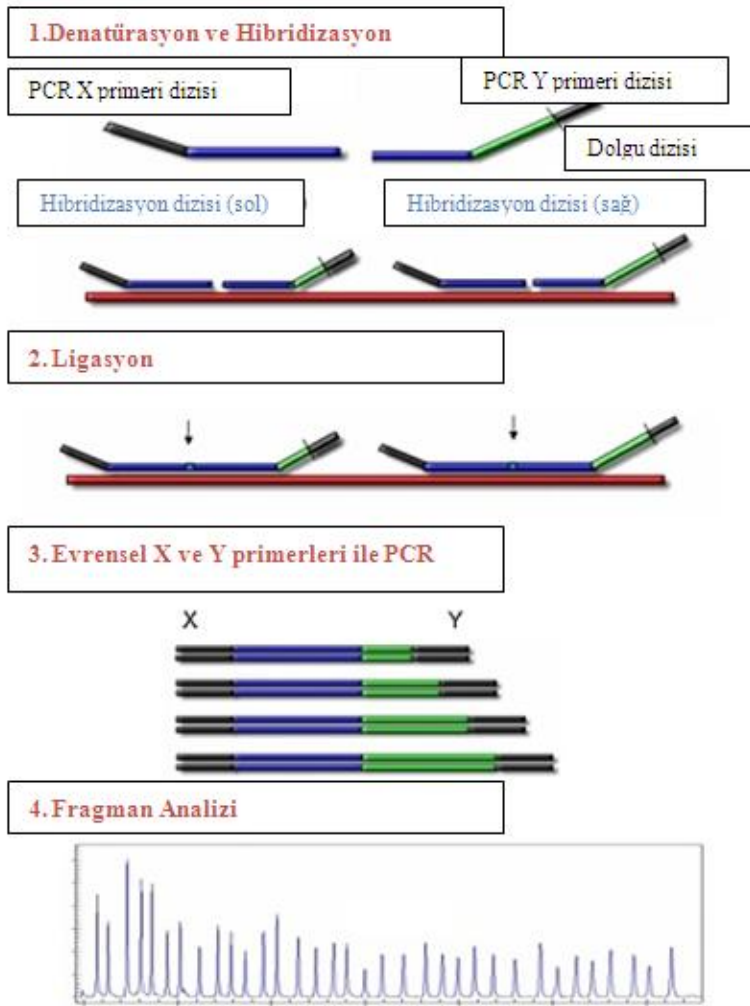


Şekil 4. MLPA probleminin şematik gösterilmesi

80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler, MLPA kalitesini olumsuz etkilediklerinden kimyasal olarak sentezlenmektedir. Bu oligonükleotidler, M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı ile sentezlenmektedir. MLPA'da kullanılan kitlerin çoğu 35-42 prob içermektedir ve problemler arasında 6-9 baz çiftlik uzunluk farkı vardır. Bu problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden tasarlanmıştır. Bu problemler arasında heterodupleks oluşumunu engellemek için sadece uç kısımlarının ortak dizi içermesine dikkat edilir. M13 kaynaklı, 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren MLPA vektörü bulunmaktadır. Gerekli fragman uzunluğu, bu vektörlerin hedef diziyeye spesifik oligonükleotidlere eklenmesi ile elde edilir. Amplifikasyon ürünü 94-124 baz çifti olan problemler, MLPA yönteminde başarılı bir şekilde kullanılabilir (40). M13 kaynaklı oligonükleotid problemlerin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukta olması önemli avantajlar sağlamaktadır. Amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri bu sayede değerlendirilebilmektedir. Hibridizasyonu gerçekleşen hedefe

özgü kısa diziler ise, yarışmalı olarak bağlanmadıklarından tek nükleotid polimorfizmleri ve mutasyonu değerlendirmede kolaylık sağlamaktadır.

MLPA tekniği, 4 temel aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve son olarak PCR ile amplifikasyon aşamasıdır (Şekil 5). cPCR aşamasında bütün problemler tek bir primer çifti ile amplifiye edilir. Primer çiftlerinden bir tanesi N-(3-fluoranthyl) maleimide (FAM) ile işaretlenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kapiller elektroforez yardımıyla kontrol grubu pikleri esas alınarak değerlendirilir. MLPA yöntemi genomik DNA'da olduğu gibi mRNA çalışmalarında da kullanılabilir.



Şekil5.MLPA aşamaları

**KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLER;
Kardiyak embriyogeneizde etkili olduğu gösterilmiş bazı genler**

BMP4 'Bone morphogenetic protein 4': Beş ekzondan oluşan gen genomik DNA'nın yaklaşık 4,8 kb'ini oluşturmaktadır. Kromozom 14q22'de yerleşen gen p-telomerden yaklaşık 10Mb uzaklıktadır. *BMP4*, TGF- β sitokin ailesine aittir. Epitelyal mezenkimal transformasyonunda önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Kardiyomyositlerde *BMP4* ekspresyonunun gösterilmesi septasyon ve valvulogenezde *BMP4* geninin etkili olduğunu düşündürmektedir. Bu genin eksikliklerinin atriyoventriküler septal defekt ile sonuçlandığı bildirilmektedir (41).

CRELD1 'Cysteine rich with EGF domains': Onbir ekzondan oluşan gen, yaklaşık olarak 11,6 kb'tir ve kromozom 3p25'te yerleşmiştir. Epidermal growth faktor (EGF) ailesine ait olan gendeki mutasyonun; atriyoventriküler septal defekt ile ilişkisi olduğu araştırılmıştır (42).

NKX2-5 'NK2 transcription factor related, locus 5': Kromozom 5q35'te yerleşen gen, 2 ekzondan oluşur ve yaklaşık 3,1 kb büyüklüktedir. Konjenital kalp hastalıklarının %3'ünde *NKX2-5* 'homeobox' transkripsiyon faktöründe mutasyon saptanmıştır. En sık konontrunkal anomaliler ile ilişkili olan genin kardiyak iletim defektleri ve tiroid disgenezi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (43).

TBX5 (*T-box 5*): Genomik DNA'da yaklaşık 5,2kb yer kaplayan gen 10 ekzondan oluşmaktadır. Kromozom 12q25'de yerleşen gen, p-telomerden 113,3 Mb uzaklıktadır. *Tbx5* geni üst ekstremit ve kalp gelişiminde etkili olması nedeni ile mutasyonu Holt-Oram sendromu ile ilişkili olarak bildirilmektedir. *Tbx5* gen mutasyonunun Holt- Oram sendromu olmayan ASD, VSD ve atriyoventriküler septal defektleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (44).

Tbx20 '*T-box 20*': Farelerde kardiyak progenitor hücreleri tarafından ifade olan *Tbx20* geninin endokardiyal yastıklar, atriyoventriküler kanal, interatriyal septum oluşumunda önemli olduğu gösterilmiştir (45).

GATA4 '*GATA binding protein 4*': Yedi ekzondan oluşan gen, kromozom 8p23'de yerleşmektedir ve yaklaşık 55,8kb boyutundadır. Kardiyak septasyonda rolü bulunan genin mutasyonunun pulmoner darlık ve kardiyak septal defektler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (45). *Tbx 5* geni ile birlikte kardiyak gelişim sırasında normal kardiyomyosit gelişiminde etkilidir (46).

GATA5 '*GATA binding protein 5*': *GATA* ailesine ait olan genin *GATA4* ve 6 ile kalp embriyogenezinde önemli olduğu gösterilmiştir. *GATA5* geni olmayan farelerin, gestasyon dönemi ortalarında kardiyovasküler defektler nedeni ile kaybedildiği gösterilmiştir (47).

GATA6 'GATA binding protein 6': Kalp gelişirken eksprese olan genin eksikliği, farelerde kardiyak gelişim öncesi embriyonik kayıp ile sonuçlanmıştır (48). Konjenital kalp hastalığı olanlarda *GATA6* mutasyonunun saptanması da kardiyak morfogenezde *GATA6* geninin önemli olduğunu göstermiştir (46).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ekim 2012- Ekim 2013 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı tarafından izlenen hastalar arasından konjenital kalp hastalığı olduğu saptanan toplam 260 hastada kesitsel olarak yapıldı. Çalışmaya alınan hastalar; Pediatrik Kardiyoloji polikliniğine ilk kez başvuran ve çalışma kriterlerine uygun olan hastalar ile daha önceden izlenen ve çalışma kriterlerine uygun olan hastaların çağırılmasıyla oluşturuldu. Tüm hastalar fizik muayene, elektrokardiyografi ve

ekokardiyografi ile değerlendirildi. Değerlendirmeye alınan toplam 260 hastanın beşi genetik değerlendirilme için alınan kan örneklerinin pıhtılı olması nedeniyle çalışma dışı bırakıldı ve 255 hasta ile çalışma yapıldı.

Down sendromu dışında; Di George sendromu, Marfan sendromu, Holt-Oram sendromu, Allagille sendromu vs gibi sendromlara ait stigmaları olan hastalar ile diabetes mellitus, kas hastalığı, epilepsi, kistik fibrozis gibi kronik hastalığı olan çocuklar çalışma dışı bırakıldı. Ritim-iletim bozukluğu olan çocuklar çalışmaya alınmadı.

Toplam 255 hastanın 144'ü VSD, 60'ı ASD, 14'ü EYD idi. Hastaların 36'sında siyanotik konjenital kalp hastalığı vardı. Ventriküler septal defektli hastaların 78'i perimembranöz VSD, 66'sı ise müküler VSD idi. Atriyal septal defektli hastaların hepsi ostiyum sekundum tip ASD idi. Sinüs venozus ve primum tip ASD tanılı hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Atriyal septal defektli hastaların hepsi daha öncesinde cerrahi veya anjiyo yöntemi ile kapatma yapılmış veya kapatma tedavisi düşünülen geniş ve hemodinamik açıdan anlamlı sekundum ASD'li hastalardı. Siyanotik konjenital kalp hastalığı bulunan hastaların 29'u Fallot tetralojisi, beşbüyük arter transpozisyonu, ikisipersistan turunkus arteriyosus ve bir tanesi ise Ebstein anomalisi idi.

Kontrol grubu; çocuk kardiyoloji polikliniğine üfürüm, göğüs ağrısı ve senkop gibi yakınmalarla başvuran ve tamamen sağlıklı oldukları tespit edilen; patent foramen ovale dahil hiçbir doğumsal kalp hastalığı olmayan 50 çocuktan oluşturuldu.

Çalışmaya dahil edilen tüm çocukların ayrıntılı anamnez, özgeçmiş ve soygeçmiş özellikleri alındı. Fizik muayene, elektrokardiyografi ve ekokardiyografik değerlendirmeleri yapıldı. Ebeveynler arasındaki akrabalık hikayesi ve ailede doğumsal kalp hastalığı varlığı ayrıntılı olarak sorgulanıp; hastalar için oluşturulan formlara kaydedildi. Tüm çocuklarda genetik çalışma için EDTA'lı tüpe 2ml serum örneği alındı. Bu örnekler çalışma grubu tamamlanmaya kadar -20 °C'de buzdolabında saklandı. Çalışma grubu tamamlandığında, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında SALSA MLPA P311-A2 CHD kiti ile değerlendirildi.

Çalışma ve kontrol grubuna alınan çocukların ailelerine sözlü ve yazılı olarak çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildi. Araştırmayı kabul eden ailelerden bilgilendirilmiş aile gönüllü olur formu imzalatılarak izin alındı.

Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Etik Kurulundan izin alındı (Etik belge numarası: 2012TPF029). Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklendi.

MLPA YÖNTEMİ

Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA saflaştırılması, Fujifilm Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon Cihazı kullanılarak yapıldı. Saflaştırma işleminde aşağıdaki sıra izlenmiştir.

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne (greiner bio-one), 30 µI QuickGen proteaz konuldu.

2. Dahasonra EDTA'lı tüp içeresinde bulunan periferik kan örneğinden 200 µI alınıp tüpe aktarıldı.

3. 250 µI Lysis Buffer eklenip, 10 saniye vortekslenerek karıştırıldı.

4.

1.5

µI'lik ependorf tüpünün kapağını yapışank kısmının indüşmesi için kısasürelisantrifüj yapıldı.

5. Dahasonra 56 °C'de 2 dakikainkübyasyona (BOECO BioTDB-100) bırakıldı.

6. Eppendorflara %96'lık 250 µI etanol eklendi, 15 saniye vortekslendikten sonra tekrar kısa sürelisantrifüj yapıldı.

7. QG-Mini80 cihazındaki tüp taşıyıcılarından, önkısmaatıkkabı (W), arkatarafına (E) DNA'nın toplanacağı 1,5 ml'lik yeniependorf tüpü yerleştirildi. Filtrelikartu jlaratıkkaplarının üstlerine yerleştirildikten sonra lizatın tamamı bu kartu jlara aktarıldı.

8. QG-Mini80 cihazında basınçlama işlemi yapıldı. Kartuja 750 µI yıkama tamponu eklendikten sonra QG-Mini80'de basınçlama işlemi yapıldı. Buişlem 3 kez tekrarlandı.

9. QG-Mini80 cihazında önkısma nayerletirilmiş olan DNA'nın bulunduğu kartuj, arkakısma ndakisaf DNA'nın toplanacağı ependorf tüpünün üstüne transfer edildi.

10. Filtratı içeren tüpler atıldı.

11. 200 µI elüsyon tamponu (Elution Buffer) kartuja eklendi ve basınçlama işlemi yapıldı.

12. Elde edilen DNA'lar, -20 °C'de saklandı.

İzole Edilen DNA'nın Saflık Değerlendirmesi

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık tayini Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometre cihazı ile yapıldı.

DNA Denatürasyonu ve SALSA Prob Miksile Hibridizasyonu

1. İzole edilen DNA örneklerinden 5 µI (50-150 ng DNA) alındı.

2. Alınan örnekler 0.2 ml'lik PCR tüplerine aktarıldı.

3. Thermal Cycler (TECHNETC-412) cihazında 98°C'de 5 dakikabekletilerek, DNA denatürasyonu gerçekleştirildi.

4. Dahasonra örnekler Thermal Cycler cihazında 25 °C'ye kadar soğutuldu ve beklemeye alındı.

5. 25 °C’de bulunan DNA örneğine, 1.5 µI SALSA MLPA P311-A2CHD Prob Mix (Buffer) olmak üzere 3’er µlekle pipetaj yapıldı ve homojenize edildi.

6. 95 °C’de 1 dakikalık kübe edilen örnekler daha sonra 60 °C’de 16-20 saat hibridizasyon bırakıldı.

Ligasyon Reaksiyonu

1. Hibridizasyon süresini bitirmek için Termal Cyclor cihazının ısısı 54 °C’ye getirildi.

2. 54 °C’de örnekler 32 µI ligasyon miks solusyonu (25 µI distile su, 3 µI Ligase-65 buffer A, 3 µI Ligase-65 buffer B ve 1 µI Ligase-65) ilave edildi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi.

3. Örnekler 54 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Daha sonra ligaz enzimini inaktive etmek için örnekler 98 °C’de 5 dakika bekletildi.

5. Örnekler 20 °C’ye soğutuldu ve Thermal Cyclor cihazı 20 °C’de beklemeye alındı.

Polymerase Chain Reaction

1. Polimeraz master miks (7.5 µI distile su + 2 µI SALSA PCR primer miks + 0.5 µI SALSA Polimeraz) hazırlandı ve 10’ar µI PCR tüpüne eklendi. Pipetaj yapılarak homojenize edildi.

2. Daha sonra PCR reaksiyonu başlatıldı.

PCR basamakları

Amplifikasyon (35 döngü)

Denatürasyon: 95 °C 30 saniye

Eşleşme (Annealing): 60 °C 30 saniye

Uzama (Ekstansiyon): 72 °C 1 dakika

Son Ekstansiyon

72 °C 10 dakika

Daha sonra 15 °C’de beklemeye alındı.

MLPA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforez cihazında yürütme işlemi bittikten sonra, örnekler için pik alanları ve prob uzunlukları Microsoft Office Excel dosyası formatında kaydedildi. İlgili prob mikslere özgün olmayan pikler kaldırıldı. Elde edilen veriler, MAPEZERSOFT programına yüklendi. Her reaksiyonda sağlıklı olduğu bilinen en az beş bireyin DNA’sı internal kontrol olarak kullanıldı. MRC-Holland firmasının konjenital kalp hastalıkları için spesifik olarak tasarladığı SALSA MLPA P311-A2CHD kiti blok normalizasyonuna göre hesaplandı (Tablo 2). Blok

normalizasyonu, her hasta için, her bir prob amplifikasyon ürününe ait pik alanı, kit içerisinde bulunan referans problemleri amplifikasyon ürünleri pik alanları toplamına bölündü. MAP ezersoftware programı ile aşağıdaki formüle göre, her bir spesifik prob bölgeleri için doz oranı belirlendi.

$$\text{Doz Oranı Tayini} = \frac{\frac{\text{Hasta -TPAD}}{\text{Hasta -RKPATD}}}{\frac{\text{Kontrol 1-TPAD}}{\text{Kontrol 1-RKPATD}} + \frac{\text{Kontrol 2 -TPAD}}{\text{Kontrol 2 - RKPATD}} + \frac{\text{Kontrol 3 -TPAD}}{\text{Kontrol 3- RKPATD}}} \times 3$$

TPAD : Test Piki Alan Değeri

RKPATD : Referans Kontrol Prob Pik Alanları Toplam Değeri

Programda tespit edilen her prob bölgesi için, 0,7 ile 1,3 arası normal doz; 0,5 ile 0,7 arası ve 1,3 ile 1,5 arası gri alan; <0,5 ise delesyon yani doz eksikliği, >1,5 ise amplifikasyon yani doz fazlalığı olarak tanımlanmaktadır. Gri alan bölgelerinde ise, gerçek bir delesyon ya da amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kontrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak belirlenmektedir.

Hasta Spesifik Prob Alanı

Hasta Mutasyonlu Prob Alanı

Gri Alan Formülü: -----

Kontrollerin Ortalama Spesifik Prob Alanı

Kontrollerin Ortalama Hasta Mutasyonlu Alana Karşılık Gelen Bölge Alanı

Tablo 2.SALSA MLPA P311-A2 CHDKiti

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position				
		reference	GATA4	TBX5	NKX2-5 22q11	BMP4 CRELD1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
124 ~	MSR1 probe 04235-L08770		8p22			
130	CTSB probe 01212-L00766		Downstream GATA4			
136	CRELD1 probe 02141-L01620				Exon 3	
142	GATA4 probe 07641-L07326		Exon 5			
148	GATA4 probe 08309-L08282		Exon 1			
154	Reference probe 11356-L12081	12p13				
160	TBX5 probe 05694-L05136			Exon 9a		
166	TBX5 probe 06207-L05127			Exon 1		
174	TBX5 probe 05696-L05138			Exon 10		
184	TBX5 probe 05687-L05129			Exon 3a		
190	NKX2-5 probe 12465-L13480			Exon 1		
195	TBX5 probe 05688-L05130			Exon 4		
202	GATA4 probe 07643-L07328		Exon 7			
208 ±	GP1BB probe 05464-L10114				22q11	
215	Reference probe 08570-L08571	17q23				
229	GATA4 probe 07697-L07414		Upstream GATA4			
238	GATA4 probe 07642-L07327		Exon 6			
247	TBX5 probe 05691-L05133			Exon 7		
255	BMP4 probe 12467-L14521				Exon 1b	
266	NKX2-5 probe 11629-L12386			Exon 2c		
274	NKX2-5 probe 12468-L13483			Exon 1		
283	TBX5 probe 05695-L05137			Exon 9a		
292 ±	Reference probe 11087-L11770	2p24				
303	TBX5 probe 05697-L05139			Exon 10		
310	GATA4 probe 07638-L07323		Exon 2			
317	TBX5 probe 05686-L05128			Exon 2		
328	Reference probe 10682-L11264	6p12				
337	GATA4 probe 07639-L07324		Exon 3			
346	TBX5 probe 06209-L05132			Exon 6		
355	GATA4 probe 07640-L07325		Exon 4			
362	GATA4 probe 07696-L07413		Upstream GATA4			
369	Reference probe 12377-L13386	2q37				
382	DGCR8 probe 08476-L10765				22q11	
391	BMP4 probe 12469-L13484				Exon 5	
400	CRELD1 probe 12470-L13485				Exon 10	
409	Reference probe 07208-L06858	7p14				
418	Reference probe 11008-L11679	4q22				
427	NKX2-5 probe 12471-L13486			Exon 2c		
436	BMP4 probe 12472-L13487				Exon 2	
445	Reference probe 11010-L11680	7q32				
454	BMP4 probe 12473-L13488				Exon 4	
465	CDC45 probe 05463-L05808				22q11	
472	Reference probe 09205-L14667	18p11				
481	Reference probe 12530-L13580	6q23				

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ (İSTATİSTİKSEL ANALİZ)

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences for Windows) paket programı kullanıldı. Nonparametrik verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullandı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlık sınırı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 255 hastanın yaşları 1-23 arasında değişmekle beraber ortalama yaş $5,6 \pm 5,1$ yıl olarak saptandı. Hastaların 132'si erkek (%52), 123'ü kız (%48) idi. Akrabalık öyküsü 14 hastada (%5,5) mevcuttu. Akrabalık, hastaların dokuzunda birinci dereceden kuzen evliliği şeklindeyken; beş hastada daha uzak akrabalık şeklindeydi. Anamnezden 7 hastada (%2,7) ailede doğumsal kalp hastalığı varlığı öğrenildi.

Bunların ikisinin kardeşinde, birinin annesinde üçünün de amcasında müsküler VSD saptanırken; bir hastanın babasının ASD tanısı ile opere olduğu önerildi.

Kontrol grubuna alınan 50 hastanın ortalama yaşı $5,5 \pm 3,7$ ve 27'si (%54) erkek, 23'ü (%46) kız idi. Kontrol grubu ile çalışma grubu arasında cinsiyet ve yaş açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Kontrol grubuna alınan çocuklarda ailede akrabalık vekalp hastalığı öyküsü yoktu. Çalışma ve kontrol gruplarına ait demografik veriler Tablo3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler

Veri	KKH (n: 255)	Kontrol (n: 50)
Yaş (yıl)	5,6±5,1	5,5±3,7
Cinsiyet		
Erkek	132 (%52)	27 (%54)
Kız	123 (%48)	23 (%46)
Ailede Kalp Hastalığı		
var	7 (%2,7)	-
yok	248	50
Akrabalık		
var	14 (%5,5)	-
yok	241	50

Toplam 255 hastanın 144'ü (%56,4) VSD, 60'ı (%23,5) ASD, 14'ü (%5,4) EYD idi. Hastaların 37'sinde (%14,5) siyanotik konjenital kalp hastalığına vardı. Ventriküler septal

defektli hastaların 78'i (%54,2) perimembranöz VSD, 66'sı (%45,8) ise müsküler VSD idi. Atriyal septal defektli hastaların hepsi sekundum tip ASD idi. Siyanotik konjenital kalp hastalığı bulunan hastaların 29'u (%78,4) Fallot tetralojisi, beşi (%13,5) büyük arter transpozisyonu, ikisi (%5,4) persistan turunkus arteriyosus tip1 ve bir tanesi ise (%2,7) Ebstein anomalisi idi (Tablo 4).

Tablo4.Konjenital kalp hastalığı tipleri

Konjenital kalp hastalığı tipi	Sayı (n)	%
VSD	144	56,4
Perimembranöz	78	54,2
Müsküler	66	45,8
Sekundum ASD	60	23,5
EYD	14	5,4
Siyanotik	37	14,5
Fallot tetralojisi	29	78,4
BAT	5	13,5
Trunkus arteriyozus	2	5,4
Ebstein	1	2,7

SALSA MLPA P311-A2 CHD kiti ile bakılan genetik mutasyon incelemesinde; *GATA4* mutasyonu toplam beş hastada (%2), *TBX5* mutasyonu bir hastada (%0,4), *BMP4* mutasyonu beş hastada (%2), *MSR1* mutasyonu altı hastada (%2,4) pozitif olarak saptandı. Hastalarımızın hiçbirinde *CRELD1* ile *NKX2.5* genlerinde mutasyon saptanmadı. Di George sendromuna özgü klinik stigmaların olmamasına rağmen 7 hastada (%2,7) *CDC45* (22q11) bölgesinde mutasyon saptandı. Kontrol grubunda ise *GATA4*, *TBX5*, *BMP4*, *MSR1*, *CRELD1*, *NKX2.5* ve *CDC45* genlerinin hiçbirinde mutasyon saptanmadı (Tablo 5). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmasa da konjenital kalp hastalığı olan grupta genetik mutasyon sıklığının fazla olduğu görüldü ($p>0,05$).

Ventriküler septal defekti olan 144 hastanın üçünde (%2,1) *GATA4* geninde, birinde (%0,7) *TBX5* geninde, dördünde (%2,8) *BMP4* geninde, üçünde *MSR1* geninde (%2,1) ve

ikisinde *CDC45* (%1,4) geninde mutasyon saptandı. Sekundum ASD'li 60 hastada toplam beş adet gen mutasyonu saptandı. Bunların ikisi (%3,3) *GATA4*, biri(%1,6) *BMP4*, ve ikisi (%3,3) *CDC45* genlerindeydi. Komplet endokardiyal defektli 14 hastanın ise birinde (%7,1) *CDC45* mutasyonu saptandı. Siyanotik doğumsal kalp hastalığı olan 37 hastanın üçünde (%8,1) *MSRI* ve ikisinde (%5,4) *CDC45* genlerinde mutasyon saptandı (Tablo 5). Mutasyon saptanan hastaların hepsi Falot tetralojili hastalar idi.

Tablo5. Konjenital kalp hastalarındaki genetik mutasyonların tipleri

Genler	Konjenital Kalp Hastalığı Tipi					Kontrol (n: 50)
	VSD (n:144)	ASD (n:60)	EYD (n:14)	Siyanotik (n:37)	Toplam (n: 255)	
<i>GATA4</i>	3 (%2,1)	2 (%3,3)	-	-	5 (%2)	-
<i>NKX2.5</i>	-	-	-	-	-	-
<i>TBX5</i>	1 (%0,7)	-	-	-	1 (%0,4)	-
<i>BMP4</i>	4 (%2,8)	1 (%1,6)	-	-	5 (%2)	-
<i>CRELD1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MSRI</i>	3 (%2,1)	-	-	3 (%8,1)	6 (%2,4)	-
<i>CDC45</i>	2 (%1,4)	2 (%3,3)	1 (%7,1)	2 (%5,4)	7 (%2,7)	-

Ventriküler septal defektli 144 hastanın 78'i (%54,2) perimembranöz ve 66'sı (%45,8)müsküler VSD idi. Perimembranöz VSD'li hastalara baktığımızda bir hastada (%1,3) *GATA4*, üç hastada (%3,8) *BMP4*, bir hastada (%1,3)*MSRI* ve birhastada da (%1,3) *CDC45* geninde mutasyon saptandı. Müsküler VSD'li hastaların ikisinde (%3)*GATA4*, birinde (%1,5) *TBX5*, birinde (1,5)*BMP4*, ikisinde (%3)*MSRI* ve birinde (%1,5) *CDC45*genlerinde mutasyon saptandı (Tablo 6).Kontrol grubu ile VSD'li grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmasa da *GATA4*, *BMP4*, *TBX5*, *MSRI* ve *CDC45* genlerindeki mutasyon sıklığının VSD'li grupta daha fazla olduğu görüldü(p>0,05).

Tablo 6. Ventriküler Septal Defektli hastalarda saptanan genetik mutasyonlar

Genler	Ventriküler Septal Defekt Tipi		
	Membranöz (n:78)	Müsküler (n:66)	Toplam (n:144)
<i>GATA4</i>	1 (%1,3)	2 (%3)	3 (%2,1)
<i>NKX2.5</i>	-	-	-
<i>TBX5</i>	-	1 (%1,5)	1 (%0,7)
<i>BMP4</i>	3 (%3,8)	1 (%1,5)	4 (%2,8)
<i>CRELD1</i>	-	-	-
<i>MSR1</i>	1 (%1,3)	2 (%3)	3 (%2,1)
<i>CDC45</i>	1 (%1,3)	1 (%1,5)	2 (%1,4)

Komplet endokardiyal yastık defektli toplam 14 hastanın sadece birinde *CDC45* (%7,1) mutasyonu saptandı ($p>0,05$).

Siyanotik kalp hastalığı olan hasta grubunda saptanan genetik mutasyonların hepsi Fallot tetralojili hastalarda idi. Fallot tetralojili üç hastada (%10) *MSR1*, iki hastada (%6,9) ise *CDC45* genlerinde mutasyon izlendi (Tablo 7). İstatistiksel olarak farklılık saptanmasa da ($p>0,05$) Fallot tetralojili grupta genetik mutasyon sıklığı daha fazla idi.

Tablo 7. Siyanotik Konjenital Kalp Hastalığı bulunan hastalarda saptanan genetik mutasyonlar

Genler	TGA	FT	Trunkus	Ebstein	Kontrol	Toplam
	(n:5)	(n:29)	arteriyosus (n:2)	(n:1)	(n:50)	(n:37)
<i>GATA4</i>	-	-	-	-	-	-
<i>NKX2.5</i>	-	-	-	-	-	-
<i>TBX5</i>	-	-	-	-	-	-
<i>BMP4</i>	-	-	-	-	-	-
<i>CRELD1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MSR1</i>	-	3 (%10)	-	-	-	3 (%8,1)
<i>CDC45</i>	-	2 (%6,9)	-	-	-	2 (%5,4)

Çalışmamızda konjenital kalp hastalığı olan toplam 255 hastanın 12'si (%4,7) Down sendromu idi. Bu hastaların dördünde (%33) ventriküler septal defekt, sekizinde (%67) ise

komplet endokardiyal yastık defektimevcuttu.Down sendromlu 12 hastanın hiçbirinde *NKX2.5*, *TBX5*, *GATA4*, *CRELD1* ve *BMP4* genlerinde mutasyon saptanmadı.

Konjenital kalp hastalığı olan hastalarımızın 14'ünde (%5,5) ebeveynler arasında akrabalık mevcuttu. Ancak genetik mutasyon saptanan olguların hiçbirinde ebevenler arasında akrabalık saptanmadı.

Ailede konjenital kalp hastalığının varlığı açısından bakıldığında ise; genetik mutasyon saptanan toplam 20 hastanın (%7,8) sadece ikisinde (%10) ailede konjenital kalp hastalığı mevcuttu. Bu iki hastanın kardeş olduğu ve herikisin de müsküler VSD nedeniyle izlendiği saptandı.Bu kardeşlerin ikisinde de *GATA4* geninde mutasyon bulundu.Birinde *GATA4* genindeki mutasyona ek olarak,*TBX5* ve *MSR1* genlerinde de mutasyon vardı.

Çalışmamızda konjenital kalp hastalığı olan 255 hastanın 20'sinde (%7,8) toplam 24 (%9,4) adet genetikmutasyon saptandı. *GATA4* mutasyonu saptanan toplam beş hastada 4 ayrı ekzonda mutasyon vardı. Ekzon 1 mutasyonu bir hastada, ekzon 2 mutasyonu bir hastada, ekzon 4 mutasyonu bir hastada ve ekzon 6 mutasyonu ise iki hastada saptandı. *BMP4* mutasyonu saptanan 5 hastada 2 ayrı ekzonda mutasyon vardı.Ekzon 2 mutasyonu 4 hastada saptanırken, bir hastada ekzon 5 mutasyonu vardı.Genetik mutasyon saptanan hastalar ve mutasyon tipleri Tablo 8 de verilmiştir.

Genetik mutasyon saptanan hastaların SALSA MLPA P311-A2 CHD kiti verileri ek 1-20'de verilmiştir.

Tablo 8.Genik mutasyon saptanan hastalardaki mutasyonların tipleri

Hasta no	Aile Öyküsü	Tanı	MLPA
V14	+	Müsküler VSD	MSR1 TBX5 ekzon4 GATA4 ekzon 2
V22	Yok	Membranöz VSD	BMP4 ekzon 2 CDC45

V31	+	Müsküler VSD	GATA4ekzon 6
V32	Yok	Membranöz VSD	GATA4ekzon 6
V33	Yok	Müsküler VSD	MSR1
V53	Yok	Müsküler VSD	BMP4ekzon 2
V63	Yok	Membranöz VSD	BMP4ekzon 2
V120	Yok	Membranöz VSD	MSR1
V141	Yok	Membranöz VSD	BMP4ekzon 5
V143	Yok	Müsküler VSD	CDC45
A2	Yok	Sekundum ASD	GATA4ekzon 1
A8	Yok	Sekundum ASD	CDC45
A20	Yok	Sekundum ASD	GATA4ekzon 4 CDC45
A26	Yok	Sekundum ASD	BMP4ekzon 2
S3	Yok	TOF	CDC45
S10	Yok	TOF	CDC45
S11	Yok	TOF	MSR1
S12	Yok	TOF	MSR1
S13	Yok	TOF	MSR1
S34	Yok	EYD	CDC45

TARTIŞMA

Konjenital kalp hastalıkları kardiyovasküler sistemin doğuştan var olan yapısal anomalilerini içermektedir (1). Sıklığı tüm canlı doğumlarda %0,8 olarak belirlenmiş ve prenatal kayıpların en sık nedenini oluşturduğu bildirilmiştir (2, 3).

Genel olarak konjenital kalp hastalıklarında belirgin cinsiyet ayrımı olmamakla birlikte; atriyal septal defekt ve patent duktus arteriyosus gibi bazı konjenital kalp hastalıkları kızlarda daha fazla görülürken; aort darlığı, aort koarktasyonu, büyük arter transpozisyonu ve infrakardiyak tip total pulmoner venöz dönüş anomalisi gibi bazı defektler ise erkek cinsiyetinde daha fazla görülmektedir (37). Bizim çalışmamız bir prevelans çalışması olmamakla birlikte tüm konjenital kalp hastalığı olan hastalarımıza baktığımızda, cinsiyet

açısından farklılık olmadığını gördük. Ancak büyük arter transpozisyonu olan beş hastanın tamamının erkek olması dikkat çekiciydi.

Ventriküler septal defekt, konjenital kalp hastalıkları içerisinde en sık görülenidir. Tüm KKH'nın %5-10'unu oluşturan Fallot tetralojisi ise, en sık görülen siyanotik konjenital kalp hastalığıdır (37,38). Çalışmamızda da olgularımızın çoğunu ventriküler septal defektli çocuklar oluşturuyordu. Siyanotik konjenital kalp hastalığı grubunda ise Fallot tetralojisi çoğunlukta idi.

Ülkemizde akraba evliliği bölgeler arasında değişmekle birlikte Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırmaları Kurumu'nun 2008 verilerine göre (49) %21 oranında görüldüğü tespit edilmiştir. Farklı toplumsal çalışmalarda genel olarak özellikle birinci derece kuzen ve daha yakın olan akraba evliliklerinde konjenital kalp hastalığı görülme riskinin arttığı gösterilmiştir (50). Ülkemizden yapılan bir çalışmada (51), yenidoğan yoğun bakım ünitesinde konjenital kalp hastalığı tanısı ile izlenen hastaların %15'inin ebeveynleri arasında akrabalık olduğu saptanmıştır. Bu hastaların çoğunda birinci derece kuzen evliliği olduğu görülmüştür. Çalışmamızda hastalarımızın %5,5'inde ebeveynler arasında akraba evliliği saptandı. Akraba evliliği olan hastaların dokuzunda birinci derece kuzen evliliği, beşinde ise daha uzak akrabalık vardı.

Konjenital kalp hastalıkları genel olarak sporadik kabul edilmekle birlikte kardeşte ya da bir ebeveynde KKH bulunmasının doğumsal kalp hastalığı gelişme riskini üç kat arttırdığı gösterilmiştir (52). Çalışmamızdaki %2,7'lik aile öyküsü pozitifliği Pakistan'da 250 konjenital kalp hastası ve 250 kontrol grubu ile yapılan konjenital kalp hastalığı risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada saptanan %2'lik aile öyküsü pozitifliği ile uyumlu bulundu (53). Pozitif aile öyküsü saptadığımız yedi hastanın ikisinde kardeşte, birinde annede, üçünde amcada müsküler ventriküler septal defekt varken; bir hastamızın babası atriyal septal defekt nedeni ile opere edilmişti.

Konjenital kalp hastalıklarında çevresel ve genetik faktörlerin birlikte eşlik ettiği multifaktöriyel geçiş sorumlu tutulmaktadır. Genetik faktörlerden bazı kromozomal anomaliler ile tek gen defektlerinin konjenital kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (10,16). Bu sendromlardan bazıları trizomi 13 olarak bilinen Patau sendromu, Turner sendromu, Down sendromu ve Di George sendromudur. Bu sendromlar arasında en yaygın olanı toplumda 1/733 oranında görülme sıklığı ile Down sendromudur. Down sendromlu olgularda %50 oranında konjenital kalp hastalığı görülmektedir. Di George sendromu, 22q11.2'deki delesyon sonucu oluşan konontrunkal anomaliler, timus aplazisi ve hipokalsemi

triadı ile seyreden bir sendromdur. Çalışmamıza Down sendromu dışında bilinen kromozomal anomalisi ya da sendrom stigmatları olan hastalar dahil edilmedi. Konjenital kalp hastalığı olan yedi hastada 22q11 ile uyumlu olduğu bilinen CDC45 gen bölgesinde mutasyon saptandı. Ancak bu hastalarımızda Di George sendromuna özgü hipokalsemi ve timus aplazisi gibi bulgular yoktu ve FISH yöntemi ile yapılan genetik analizlerinde 22q11 delesyonu saptanmamıştı. Literatürde atriyoventriküler septal defekti olan Down sendromlu hastalarda yapılan bir çalışmada (54), CRELD1 mutasyonunun fazla olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda Down sendromlu 12 olgumuzun sekizinde atriyoventriküler septal defekt, dördünde ventriküle septal defekt mevcuttu ve bu hastaların hiçbirinde genetik mutasyon saptanmadı. Ancak genetik mutasyon saptanmaması Down sendromlu hastalarımızın az olmasına bağlı olabilir.

Kromozomal hastalıklar dışında bazı tek gen hastalıkları da konjenital kalp hastalıklarına neden olabilmektedir. Bunlardan bazıları fibrilin 1 geninde mutasyon sonucu oluşan ve aort anevrizması- diseksiyonu riski bulunan Marfan sendromu; Tbx5 mutasyonu sonucu atriyal septal defekt, ventriküler septal defekt ve iletim defektleri ile birlikte üst ekstremité anomalileri bulunan Holt-Oram sendromu; JAG1 mutasyonu sonucu pulmoner darlık, Fallot teralojisi ve safra yollarında yetersizlik bulunan Alagille sendromu ve Ras sinyal yolağındaki PTPN11 gen mutasyonu sonucunda pulmoner darlık, atriyal septal defekt, hipertrofik kardiyomyopati, kısa boy, yele boyun vepektus ekskavatum gibi fenotipik özellikleri gösteren Noonan sendromudur (26-29). Çalışmaya dahil edilen hastalarımızda bu kromozomal hastalıklara özgü klinik ve fenotipik bulgular yoktu.

Bilinen genetik hastalıklar dışında bazı genlerin kardiyak embriyogenezde etkili olduğu ve mutasyonlarının konjenital kalp hastalıklarında daha fazla görüldüğü ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu genlerden bazıları; *NKX2-5*, *GATA4*, *BMP4*, *CRELD1* ve *TBX5* gen bölgeleridir(9, 55-81). Bu gen bölgeleri içinde en çok araştırılanı *NKX2-5* gen bölgesidir.

NKX2-5 geninin kardiyak embriyogenezindeki önemi ilk kez 1993 yılında *Drosophila*'larda keşfedilmiştir(55). Embriyolojik süreçte *NKX2-5* geni; kalp, tiroid, farinks, mide ve dalakta eksprese edilmektedir. Özellikle faringeal endodermdaki transkripsiyonununkalp gelişimini başlatacağı ve miyogenezde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. *NKX2-5* genindrosophila,ve farelerde yapılan çalışmalarda (55, 56) kardiyak gelişim için gerekli olduğu saptanmış; embriyonun 7,5. gününde eksprese olmaya başlayan*NKX2-5*'in homozigot olarak negatif olduğu durumlarda,normal kalp formasyonu olmasına rağmen embriyonun 11. gününde öldüğü gösterilmiştir.

NKX2-5'in kardiyak embriyogenezdeki rolünün gösterilmesinin ardından 1998 yılında Schott JJ ve arkadaşları (57), ASD ve atriyoventriküler iletim defekti olan hastalarda *NKX2-5* geninde üç farklı mutasyon saptamışlardır. Bu durumun kardiyak malfomasyonların *NKX2-5* geninin de bulunduğu 5q35 kromozomunda yerleşmesine bağlı olduğu belirtilmiştir. *NKX2-5*'in ASD ve atriyoventriküler iletim defekti ile ilişkili olduğunun gösterilmesinin ardından yapılan başka bir çalışmada ise (43), 15 atriyoventriküler bloklu ve 20 Fallot tetralojili hasta değerlendirilmiş ve *NKX2-5* geninde yedi mutasyon saptanmıştır. Bu durum konjenital kalp hastalıklarında *NKX2-5* gen mutasyonunun önemli olduğunu göstermiştir. Yüzdokuz ASD hastasında PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada (58), sadece bir vakada mutasyon saptanmış ve bu vakanın üç jenerasyonun incelendiği soyağacında ise dört bireyde *NKX2-5* geninde mutasyon olduğu gösterilmiştir.

McElhinney ve arkadaşlarının konjenital kalp hastalıklarında yaptığı bir çalışmada (59), 370 konontrunkal anomalili, 71 sekundum ASD'li ve 7 Ebstein anomalili hastada *NKX2-5* mutasyonu araştırılmış ve 18 hastada 12 ayrı mutasyon saptanmıştır. Mutasyon; Fallot tetralojisi bulunan 201 hastanın dokuzunda, sekundum ASD'li 71 hastanın üçünde, trunkus arteriyozusu olan 22 hastanın birinde, büyük arter transpozisyonu olan yedi hastanın birinde ve çift çıkışlı sağ ventrikülü olan 31 hastanın birinde saptanmıştır. Mutasyon saptanan 18 hastanın sadece ikisinde aile öyküsü pozitif bulunmuştur. Reamon-Buettner ve arkadaşları ise (44); ASD, VSD ve atriyoventriküler septal defekti olan toplam 68 hastadan defektin olduğu ve olmadığı bölgelerden kardiyak doku biyopsi olarak *NKX2-5* somatik mutasyonunu değerlendirmişlerdir. *NKX2-5* genine ait 33'ü daha önce tanımlanmamış olan toplam 35 adet mutasyon saptamışlar ve bu mutasyonların normal kalp dokularında görülmediğini göstermişlerdir. Mutasyon saptanan hastaların 12'si ASD, 14'ü atriventriküler septal defekt ve 29'u VSD grubunda tespit edilmiştir. Hastalıklı kalp dokusunda bulunan mutasyonların aynı hastanın normal kalp dokusunda görülmemiş olmasının mutasyonların mozaik patternde ve somatik özellikte olduğuna işaret edeceğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise (60); konjenital kalp hastalığı bulunan 159 hastanın periferik kan örneklerinde PCR ve DNA liquid kromatografi yöntemi ile çalışılan *NKX2-5* mutasyon incelemesinde biri Fallot tetralojisi, diğeri Ebstein anomalisi olan iki hastada mutasyon saptanmıştır. Toplam mutasyon oranının %1,26 olması nedeni ile konjenital kalp hastalığı olan hastaların bir kısmında *NKX2-5* mutasyonunun etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Konjenital kalp hastalığı tipi açısından çok çeşitlilik gösteren 268 hastanın incelendiği bir çalışmada da (61); ASD, VSD ve FT'li ailelerde üç yeni heterozigot *missense mutasyon* bulunmuştur. Bu mutasyonların 200 kişiden

oluşan sağlıklı kontrollerde görülmemesi *NKX2.5* genindeki farklı mutasyonların konjenital kalp hastalıklarına neden olabileceğini göstermiştir.

Kardiyak gelişimdeki *NKX2-5* etkisini araştırmak için *zebrafishlerde* yapılan bir araştırmada (62), *NKX2-5*'in olmaması halinde erken kardiyak gelişiminin olduğu; ancak kalp odacıklarının eksik geliştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada *NKX2-5* eksikliğinin sadece kalbin geç dönemde gelişmesini etkilemekle kalmayıp, ayrıca *BMP4*, *TBX5* ve *TBX20*'nin de anormal ekspresyonuna yol açtığı belirtilmiştir (62). Elliot ve arkadaşları da (63), aile öyküsü pozitif olan ASD hastalarında *NKX2.5* mutasyonunun araştırılması gerektiği sonucuna varmışlardır. Ancak literatürde konotrunkal anomaliler ile diğer konjenital kalp hastalıklarında *NKX2.5*'in etkili olmayabileceğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (10). Konjenital kalp hastalıklarında *NKX2.5* gen mutasyonundüşük orandaki pozitifliğinin çevresel etkilere de bağlanabileceği bildirilmiştir (10). Çalışmamızda hastalarımızın hiçbirinde *NKX2.5* mutasyonu saptamadık. Bunun nedeni, hastalarımızdaki aile öyküsünün azlığı olabileceği gibi; bu gendeki mutasyonların konjenital kalp hastalığı gelişiminde tek başına etkili olmayıp, çevresel faktörlere de bağlı olması olabilir.

GATA ailesinin bir üyesi olan *GATA4* geninin kardiyak embriyogenezde, miyokardiyal farklılaşma ve miyokard fonksiyonları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir(64-72).

Rajagopal ve arkadaşları (64); *GATA4* heterozigot mutasyonunun farelerde endokardiyal yastık defekti, ASD, VSD, hipoplastik sol kalp sendromu ve kardiyomiyopati gelişimi üzerinde etkili olduğunu; ancak insanlarda endokardiyal yastık defekti ve ASD ile ilişkiliyken, kardiyomiyopati ile ilişki olmadığını göstermişlerdir.

GATA4 geninin *TBX5* üzerinden etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu etkileşimi araştırmak için farelerde yapılan bir çalışmada (65); *GATA4* ve *TBX5* homozozigot mutasyonu olan farelerin yaşamadığı, *GATA4* ve *TBX5* heterozigot mutasyonu olan farelerin yaşadığı ancak komplet atriyoventriküler septal defektlerinin olduğu gösterilmiş ve *GATA4*, *GATA6* ve *TBX5* genlerinin kardiyak embriyogenezde birlikte etki gösterdikleri saptanmıştır(65).

Konjenital kalp hastalıkları ve *GATA4* mutasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda ailesel konjenital kalp hastalıkları ile *GATA4* mutasyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (65-72). Garg ve arkadaşları (66), beş farklı kuşağın toplam 16 bireyinde ASD olan büyük bir ailede *GATA4* missense mutasyonu saptanmışlardır. Aynı ailedeki hasta olmayan bireylerde *GATA4* geninde mutasyonun saptanmamış olması, bu mutasyonun otozomal dominant kalıtılan atriyal septal defekt gelişmesinde önemli olduğunu göstermektedir (66). Çalışmamızda müsküler VSD'li iki kardeşte *GATA4* geninde ekzon 2 ve

ekzon 4'te mutasyon saptandı. Bu durum, *GATA4* geninin ailesel konjenital kalp hastalıklarında etkili olabileceğini desteklemektedir. Literatürle uyumlu olarak atriyal septal defektli iki hastada ve ventriküler septal defektli üç hastada *GATA4* geninde mutasyon varlığı tespit edildi.

Kromozom 3p25 (OMIM 606217) ve kromozom 1p31 (OMIM 606215) atrioventriküler septal defektler ile ilişkisi gösterilmiş olan kromozomlardır. *CRELD1* geninin kromozom 3p25 komşuluğunda olması nedeni ile mutasyonunun atrioventriküler septal defekt gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Atrioventriküler septal defekti bulunan Down sendromlu hastalarda *CRELD1* mutasyonu %5,1 olarak bildirilmiştir (73). Ghosh ve arkadaşları (74) normal karyotipi ve atrioventriküler septal defekti olan olgular ile Down sendromu ve atrioventriküler septal defekti olan olguları incelemişler ve her iki grupta da üçer adet *CRELD1* gen mutasyonu olduğunu saptamışlardır. Bu durumun atrioventriküler septal defekt gelişmesinde *CRELD1* geninin rolünü gösterdiğini belirtmişlerdir. Down sendromu olan hastalarda *CRELD1* mutasyonunun tek başına etkili olmadığı başka genlerle etkileşiminin olması gerektiği gösterilmiştir (74, 75). Robinson ve arkadaşlarının Down sendromu olmayan konjenital kalp hastalarında *CRELD1* mutasyonunu araştırdığı bir çalışmada (76) komplet atrioventriküler septal defekti olan 13 hastanın hiçbirinde mutasyon gösterilmemiş; parsiyel atrioventriküler septal defekti olan 22 hastanın ise ikisinde mutasyon saptanmıştır. Çalışmamızda toplam 14 komplet endokardiyal yastık defektli hasta vardı. Bu hastaların sekizi Down sendromu idi ve hiçbir hastamızda *CRELD1* mutasyonu saptanmadı.

BMP4 geni, kromozom 14q22'de yerleşmekte ve 5 ekzondan oluşmaktadır. Kardiyak miyosit özelleşmesi ve daha sonra endokardiyal yastık gelişimi için *BMP4* ekspresyonu gerektiği gösterilmiştir (77-80). Deneysel çalışmalarda *BMP4* olmayan farelerde doğumdan sonra ağır siyanoz geliştiği ve çoğunun doğumdan birkaç saat sonra öldüğü gösterilmiştir. Bu genin mutasyonunun endokardiyal yastık defektleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (78). Çalışmamızda da dört VSD'li, bir ASD'li hastada *BMP4* geninde mutasyon saptadık.

Posh ve arkadaşları konjenital kalp hastalarında *CRELD1*, *BMP4*, *NKX2-5*, *GATA4* mutasyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında (80); bu genlerde 12'si yeni olmak üzere toplam 17 genetik mutasyon bildirmişlerdir. Ne var ki dokuz aileden toplam 16 ailesel ve 26 sporadik atrioventriküler septal defektli hastada yapılan bir çalışmada (42), *GATA4* ve *CRELD1* genlerinde mutasyon saptanmamıştır. Onbir ASD, 18 VSD ve altı atrioventriküler septal defektli hastada cerrahi esnasında alınan ve *frozenile* çalışılan kardiyak doku örnekleri

ile yapılan *NKX2-5* ve *GATA4* incelemesinde (81);*NKX2-5* geninde bir *variable*, iki polimorfizm ve *GATA4* geninde altı *variable*, iki polimorfizm saptanmıştır. Hastaların kardiyak dokularında tespit edilen bu genetik mutasyonlar, periferik kan örneklerinde de saptanmıştır.

Ülkemizden doğumsal kalp hastalıkları ile genetik mutasyonlar arasındaki ilişkiyi değerlendiren sadece bir çalışma bulunmaktadır (10). Ancak bu çalışmada sadece *NKX2-5* genindeki mutasyonlar değerlendirilmiştir. Akçaboy ve arkadaşları (10) konontrunkal defekti olan 72 hasta ile 185 sağlıklı çocuğu değerlendirmişler ve Fallot tetralojisi olan bir hastada p.Arg25Cys mutasyonu saptamışlardır. Ancak aynı mutasyonun Fallot tetralojisi olan hastanın sağlıklı babasında da bulunması nedeni ile, konontrunkal defektlerde *NKX2-5*'in etkili olmayabileceğini düşünmüşlerdir. Çalışmamızda hastalarımızda *NKX2-5* mutasyonu saptamadık. Bu durum konotrunkal anomalili hasta grubumuzun ve çalışma grubumuzdaki aile hikayesinin azlığına bağlı olabileceği gibi; bu genin konjenital kalp hastalıklarında tek başına etkili olmayıp genetik olarak yatkın bireylerde çevresel etkiler sonucunda konjenital kalp hastalıklarının gelişebileceğine de işaret edebilir. Çalışmamızda Akçaboy ve arkadaşların çalışmasına (10) benzer olarak *NKX2-5* gen bölgesinde mutasyon izlenmemesi; *NKX2-5*'in Türk toplumunda konjenital kalp hastalığına neden olmayabileceğine işaret edebilir. Ancak bu konuda ülkemizden yapılan geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda sadece *NKX2.5* geninin konjenital kalp hastalıklarındaki etkisini değil, aynı zamanda *GATA4*, *BMP4*, *CRELD1*, *TBX5* genlerindeki mutasyonları da araştırdık. Bu yönü ile çalışmamız ülkemizden yapılan doğumsal kalp hastalıkları ve genetik mutasyonlar arasındaki ilişkiyi değerlendiren ilk çalışmadır. Doğumsal kalp hastalıklarında ülkemizdeki çalışmalarda dahil olmak üzere literatürde yapılan tüm çalışmalarda *NKX2.5*, *BMP4*, *CRELD1*, *GATA4*, *TBX5* genleri geleneksel hücre kültürü yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda *NKX2.5*, *BMP4*, *CRELD1*, *GATA4* ve *TBX5* genlerindeki mutasyonları 'Multiplex ligation-dependent probe amplification' (MLPA) yöntemi ile değerlendirdik.

İlk kez 2002 yılında Schauten ve arkadaşları (82) tarafından tanımlanan 'Multiplex ligation-dependent probe amplification' yöntemi ile az miktarda DNA örneği alınarak kromozom analizleri, mikrodelesyonlar, duplikasyonlar ve tek gen mutasyonları hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanabilmektedir. Bu yöntemle ilk çalışılan genler *BRCA1*, *MSH2* ve *MLH1* genleri olmakla birlikte; günümüzde MLPA yöntemi ile bir çok hastalığın taraması yapılmıştır (83-87). MLPA yöntemi, geleneksel hücre kültürlerine göre oldukça spesifik,

güvenilir ve az maliyetlidir. Fetüslerden alınan kan örneklerinin MLPA yöntemi ve geleneksel hücre kültürü yöntemi ile kıyaslanarak değerlendirildiği bir karyotip çalışmasında (88); doğruluk MLPA yöntemi ile %99 oranında saptanırken, geleneksel hücre kültürü yöntemi ile %64 oranında saptamıştır. İran’da yapılan bir çalışmada Retinoblastom nedeni ile izlenen 121 hasta, MLPA P047-B1 RB1 kiti ile taranmış ve 21 hastada 22 adet mutasyon saptanmıştır (84). Başka bir çalışmada (85), ‘Salmonella entericar serovar Thyphi’ mikroorganizmasının genomu MLPA yöntemi ile incelenmiş ve bu yöntem ile tek nukleotid polimorfizmlerini %90 oranında saptayabildiği gösterilmiştir. Prader Willi ve Angelman sendromlu hastalarda UDP delesyonlarını saptamak için MLPA yöntemi kullanılmış ve geleneksel yöntemler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (86). Literatürde MLPA yöntemi ile herediter nonpolipozis kolon kanserli, adenmatöz polipozis koli ve herediter over/meme kanseri olan olgularda yapılan çalışmalar ile de MLPA yönteminin delesyonlar ve polimorfizmleri kolay ve güvenilir bir şekilde saptayabileceği belirtilmiştir (87).

Literatürde doğumsal kalp hastalarında MLPA yöntemi kullanılarak yapılmış az sayıda çalışma vardır (88-90). Sorensen ve arkadaşları (89) doğumsal kalp hastalıklarında sendromlara özgü mutasyonları araştırmışlar veiki hastada erken tanı olmak üzere toplam yedi hastada sendrom tanısı koymuşlardır. MLPA yönteminin konjenital kalphastalarında delesyon ve duplikasyonların tespiti ile genetik sendrom taraması açısından kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Guida ve arkadaşları ise (90), 33 ASD, 40 atriyoventriküler septal defekt, 80 Fallot tetralojisi ve 8 ebstein anomalili hastadaSALSA P234 MLPA kiti ile*GATA4*, *NKX2.5*ve *FOG2* genlerinin araştırmışlar ve hiçbir hastada amplifikasyon veya delesyon saptamamışlardır.Biz de çalışmamızda SALSA MLPA P311-A2CHDkitini kullanarak konjenital kalp hastalıkları ile ilişkili olabilecek*GATA4*, *NKX2.5*, *TBX*, *CRELD1* ve *BMP4* gen mutasyonlarını inceledik.Çalışmamız, konjenital kalp hastalarındaki gen mutasyonlarının MLPA yöntemi ile değerlendirildiği ikinci çalışmadır. İlk çalışma olan Guida ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (90) sadece*GATA4* ve*NKX2.5* gen bölgeleri değerlendirilmişken; biz diğer gen bölgelerindeki mutasyonları da araştırdık ve *BMP4*, *GATA4*, *TBX5*ve *MSR1* genlerinde mutasyon varlığını saptadık. Özellikle genetik mutasyonların birliktelik gösterdiği hastalarda sendromik açıdan daha ayrıntılı değerlendirme yapılması gerektiğini; ve MLPA yönteminin az miktarda kan örneği ile daha fazla gen bölgesini değerlendirebilmesi açısından bu amaçla tarama yöntemi olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz. Çalışmamızda CDC45 mutasyonu saptadığımız yedi vakanın daha önce FISH yöntemi ile yapılan genetik analizleri normaldi. Bu durum, MLPA yönteminin daha spesifik

olduğunu ve Sorensen ve arkadaşlarının çalışmalarına (89) benzer olarak sendrom taramasında kullanılabileceğini desteklemektedir.

Konjenital kalp hastalarında *GATA4*, *NKX2.5*, *CRELD1*, *TBX5* ve *BMP4* mutasyonlarını araştırdığımız çalışmamızda; ventriküler septal defektli hastaların üçünde, atriyal septal defektli hastalarının ikisinde *GATA4* mutasyonu saptadık. Bu mutasyonun müsküler VSD olan iki kardeşte pozitif saptanması, ainsel konjenital kalp hastalıklarında *GATA4* mutasyonun etkili olabileceğini düşündürmektedir. Hastalarımızın hiçbirinde *NKX2.5* mutasyonunun görülmemiş olması; çalışmamızda aile öyküsü pozitifliğinin az olmasına bağlı olabileceği gibi bu genin konjenital kalp hastalıklarında tek başına etkili olmayıp, genetik olarak yatkın bireylerde çevresel etkiler sonucunda konjenital kalp hastalıklarının gelişebileceğine ayrıca Türk toplumunda da etkili olmayabileceğine de işaret edebilir. Dördü ventriküler septal defekt, biri atriyal septal defektli olan toplam beş hastada *BMP4* mutasyonun gösterilmesi, *BMP4*'ün doğumsal kalp hastalığı gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kontrol grubunda hiçbir hastada genetik mutasyon saptanmadı. Çalışma grubumuzda genetik mutasyon varlığı ve sıklığı ile kontrol grubu verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaması kontrol grubunun çalışma grubuna göre belirgin azlığına bağlıdır. Ancak genetik mutasyon ile ilgili çalışmalarda polimorfizm çalışmalarının aksine kontrol grubuna ihtiyaç olmadığı da bilinmektedir.

Çalışmamızda şu ana kadar literatürde doğumsal kalp hastalıkları ile ilişkisi gösterilmemiş olan *MSRI* gen bölgesinde, üçü ventriküler septal defekt ve üçü Fallot tetralojisi olmak üzere toplam altı hastada mutasyon saptadık. Literatürde *MSRI* gen bölgesine yönelik çalışmalarda Prostat kanserinde bu gen bölgesinde mutasyon varlığı bildirilmiştir (91). *MSRI* genine yönelik tasarlanan 8p22'de yerleşmiş gen bölgesi, kullanılan kit kataloğunda da belirtildiği üzere *CNS 'copy number variant'* bölgesi olarak tanımlanan polimorfik bir bölgedir. Bu nedenle bu bölgedeki delesyonların hastalık ile ilişkilendirilebilmesi için bu bölgeye yönelik daha geniş kapsamlı toplumsal çalışmalara ihtiyaç vardır.

MLPA tekniği, moleküler genetik alanında birçok gen bölgesini aynı anda ve düşük maliyet ile incelediği için tercih edilen bir yöntem olmaktadır. Ülkemizde daha önceden bu şekilde dizayn edilmiş bir çalışma olmadığından verilerimiz yurtdışında yapılan çalışmalarla kıyaslanmıştır. Aynı hastalık için farklı toplumlarda farklı genetik mutasyonların saptanabileceği; her toplum ve ırka özgü farklı genetik eğilimlerin olabileceği bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız mevcut kitin dizayn ve mutasyon bölgeleri yurtdışında yapılan

alışmalar ışığında hazırlanmıştır. Bu nedenle ülkemiz için ilişkili genler ve mutasyon bölgeleri farklılık gösterebilir. Bu konu ile ilgili ülkemizden yapılacak benzer çalışmalar ile ilişkili genler konusunda daha fazla bilgi sahibi olunacak ve özellikle ülkemize özgü mutasyonların yer aldığı yeni kitler dizayn edilebilecektir.

Sonuç olarak araştırmamız, MLPA yöntemi ile yapılmış konjenital kalp hastalıklarında beş gen bölgesini aynı anda araştıran ülkemizden yapılan ilk çalışmadır. *NKX2.5* ile konjenital kalp hastalıkları arasında ilişki saptanmamış olmasına rağmen; *MRS1* gen mutasyonunun konjenital kalp hastalıklarında ilk kez pozitif bulunması bu genin, *BMP4*, *GATA4* ve *TBX5* gibi doğumsal kalp hastalıkları patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. MLPA yöntemi bu hastalarda tarama amacı ile kullanılabilir kadar ucuz, güvenilir ve spesifik bir yöntemdir. Ancak bu yöntem ile özellikle ailesel konjenital kalp hastalıklarında daha fazla sayıda hasta üzerinde ülkemizden yapılacak araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu alışmalar ışığında MLPA tekniğinde hali hazırda dizayn edilmiş olan probun daha da genişleterek rutin kullanımda kullanılabilir duruma geleceğini ve bu sayede konjenital kalp hastalıklarında genetik etyolojisininin daha net aydınlatılabileceğini düşünüyoruz.

SONUÇLAR

Türk toplumunda konjenital kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu düşünülen *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *CRELD1*, *BMP4* genlerinin ‘multiplex ligation dependent probe amplification’ (MLPA)yöntemi ile değerlendirildiği çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Çalışmaya alınantoplam 255 hastanın ortalama yaşı $5,6 \pm 5,1$ yıl ve 132’si erkek (%52), 123’ü kız (%48) idi. Kontrol grubuna alınan 50 hastanın ortalama yaşı $5,5 \pm 3,7$ ve 27’si (%54) erkek, 23’ü (%46) kız idi
- Akrabalık öyküsü 14 hastada (%5,5) mevcuttu. Akrabalık, hastaların dokuzunda birinci dereceden kuzen evliliği şeklindeyken; beş hastada daha uzak akrabalık şeklindeydi.
- Yedi hastada (%2,7) ailede doğumsal kalp hastalığı vardı. Bunların ikisinin kardeşinde, birinin annesinde üçünün de amcasında müsküler VSD bulunurken; bir hastanın babası ASD tanısı ile opere olmuştu.
- Konjenital kalp hastalığı bulunan 255 hastanın 20’sinde (%7,8) toplam 24 (%10) mutasyon saptandı.
- Hastalarımızın hiçbirinde *NKX2.5* ve *CRELD1* gen bölgelerinde mutasyon saptanmadı.
- Hastalarımızın 12’sinde Down sendromu vardı. Down sendromu olan hastaların hiçbirinde *GATA4*, *NKX2.5*, *TBX5*, *CRELD1*, *BMP4* genlerinde mutasyon saptanmadı.
- *GATA4* genin ekzon2, ekzon 4 ve ekzon 6. bölgelerinde, toplam beş adet mutasyon saptandı. Bu hastaların ikisinde müsküler VSD (birinde ekzon2, diğerinde ekzon 6), birindemembranöz VSD (ekzon 6) ve ikisinde de sekundum ASD (birinde ekzon 1, diğerinde ekzon 4)vardı.
- Toplambeş hastada *BMP4* genin ekzon 2 ve 5. ekzon bölgelerinde mutasyon saptandı. Bu hastaların üçü membranöz VSD (ikisinde ekzon 2’de, birinde ekzon 5’te), biri müsküler VSD (ekzon 2’de), biri sekundum ASD (ekzon 2’de) idi.
- *TBX5* gen bölgesinde mutasyon sadece bir hastada ekzon 4 bölgesinde saptandı.Bu hastanın müsküler VSD’si vardı.
- Altı hastada *MSR1* (8p22), yedi hastada *CDC45* (22q11) gen bölgesinde mutasyon saptandı. *MSR1* gen mutasyonu bulunan hastaların ikisi müsküler VSD, biri membranöz VSD ve üçü Fallot tetralojilisi nedeni ile izlenmekteydi. *CDC45* gen

bölgesinde mutasyon görülen yedi hastanın birinde membranöz VSD, birinde müsküler VSD, ikisinde sekundum ASD, ikisinde Fallot tetralojisi, birinde endokardiyal yastık defekti vardı. *CDC45* geninin bulunduğu 22q11 gen bölgesi Di George sendromu gelişmesinde etkili olmasına rağmen, hastaların hiçbirinde Di George sendromuna ait stigmalar yoktu. Daha önce FISH yöntemi ile yapılan genetik analizlerde 22q11 delesyonu saptanmamıştı. Bu bulgumuz MLPA yönteminin sendromların taramasında kullanılabileceğini göstermektedir.

- Müsküler VSD nedeni ile takipli iki kardeşte *GATA4* gen bölgesinde mutasyon saptandı. Bu durum ailesel konjenital kalp hastalığında *GATA4* gen bölgesinin önemli olabileceğini düşündürdü.

KAYNAKLAR

1. Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. *Circulation* 1971;43(3):323-32.
2. Tennant PW, Pearce MS, Bythell M, Rankin J. 20-year survival of children born with congenital anomalies: a population-based study. *Lancet* 2010; 375:649.
3. Posch M, G, Perrot A, Berger F, Özçelik C. Molecular genetics of congenital septal defects. *Clin Res Cardiol* 2010;99:137-147.
4. Nemer G, Nemer M. Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev Biol* 2003;1;254(1):131-48.
5. Tu CT, Yang TC, Tsai HJ. Nkx2.7 and NKX2.5 function redundantly and are required for cardiac morphogenesis of zebrafish embryos. *PLoS One* 2009;4(1):e4249.

6. Singh MK, Li Y, Li S, Cobb RM, Zhou D, Lu MM, Epstein JA, Morrisey EE, Gruber PJ. Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice. *J Biol Chem* 2010;15;285(3):1765-72.
7. Burn J, Brennan P, Little J, Holloway S, Coffey R, Somerville J, et al. Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet* 1998;351:311.
8. Liu C, Shen A, Li X, Jiao W, Zhang X, Li Z. T-box transcription factor TBX20 mutations in Chinese patients with congenital heart disease. *Eur J Med Genet* 2008;51(6):580-7.
9. Balci M M, Akdemir R. NKX2.5 mutations and congenital heart disease: Is it a marker of cardiac anomalies? *Int J Cardiol* 2011;17;147(3):e44-5.
10. Akçaboy MI, Cengiz FB, Inceoğlu B, Uçar T, Atalay S, Tutar E, Tekin M. The effect of p.Arg25Cys alteration in NKX2-5 on conotruncal heart anomalies: mutations or polymorphism? *Pediatr Cardiol* 2008;29(1):126-9.
11. Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JI, Neill CA, Perry LW, et al. Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington Infant Study. *Am J Epidemiol* 1985;121(1):31-6.
12. Tanner K, Sabine N, Wren C. Cardiovascular malformations among preterm infants. *Pediatrics* 2005;116(6):e833-8.
13. Wren C, Irving CA, Griffiths JA, O'Sullivan JJ, Chaudhari MP, Haynes SR, et al. Mortality in infants with cardiovascular malformations. *Eur J Pediatr* 2012;171(2):281-7.
14. Ishikawa T, Iwashima S, Ohishi A, Nakagawa Y, Ohzeki T. Prevalence of congenital heart disease assessed by echocardiography in 2067 consecutive newborns. *Acta Paediatr* 2011;100(8):e55-60.
15. Khoshnood B, Lelong N, Houyel L, Thieulin AC, Jouannic JM, Magnier S, et al. EPICARD Study Group. Prevalence, timing of diagnosis and mortality of newborns with congenital heart defects: a population-based study. *Heart* 2012;98(22):1667-73.
16. Wren C, Reinhardt Z, Khawaja K. Twenty-year trends in diagnosis of life-threatening neonatal cardiovascular malformations. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008; 93 (1):F33-5.
17. Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, Mahle WT, Correa A. Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998-2005. *J Pediatr* 2008; 153 (6):807-13.

18. Wu MH, Chen HC, Lu CW, Wang JK, Huang SC, Huang SK. Prevalence of congenital heart disease at live birth in Taiwan. *J Pediatr* 2010;156(5):782.
19. Başpınar O, Karaaslan S, Oran B, Baysal T. A, Elmacı M, Alaaddin Y. Prevalence and distribution of children with congenital heart diseases in the central Anatolian region, Turkey. *Turk J Pediatr* 2006;48(3):237-43.
20. Bernstein D. Congenital heart disease. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB eds. *Nelson textbook of pediatrics*. 19th ed. United States of America: Saunders; 2004: 400.
21. Packham EA, Brook DJ. T-box genes in human disorders. *Hum Genet*. 2003; 12: 37-44.
22. Yamagishi H, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, et al. Tbx1 regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev* 2003; 17 (2): 269-81.
23. Kılıç S Ş, Aydoğdu H. Di George Sendromu, *Güncel Pediatri Dergisi* 2004;2: 98-100.
24. Sachdev V, Matura LA, Sidenko S, Ho VB, Arai AE, Rosing DR, Bondy CA. Aortic valve disease in Turner Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51 (19): 1904-9.
25. Gøtzche CO, Krag-Olsen B, Nielsen J, Sørensen KE, Kristensen BO. Prevalence of cardiovascular malformations and association with karyotypes in Turner's Syndrome. *Arch Dis Child* 1994; 71(5): 433-6.
26. Luther K, Marfan Syndrome In Kliegman RM, Nelson Textbook Pediatrics 19theds. Philadelphia: Elsevier 2011:2890.
27. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, et al. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 1997; 15(1): 30-5.
28. Bruce R Korf, Human Genetics In Kliegman RM, Nelson Textbook Pediatrics 19th eds. Philadelphia: Elsevier 2011:513.
29. Bruce R Korf, Human Genetics In Kliegman RM, Nelson Textbook Pediatrics 19th eds. Philadelphia: Elsevier 2011:514.
30. DeSantis M, Carducci B, Cavaliere AF, DeSantis L, Straface G, Caruso A. Drug-induced congenital defects. Strategies to reduce the incidence. *Drug Saf* 2001;24:889–901.
31. Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987;176(2):259-68.

32. Czeizel AE. Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;78 (2):151.
33. Mone SM, Gillman MW, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Effects of Environmental Exposures on the Cardiovascular System: Prenatal Period Through Adolescence. *Pediatrics* 2004;4:1058.
34. Alverson CJ, Strickland MJ, Gilboa SM, Correa A. Maternal smoking and congenital heart defects in the Baltimore-Washington Infant Study. *Pediatrics* 2011;127(3):e647-53.
35. Lipshultz SE, Easley KA, Orav EJ, Kaplan S, Starc TJ, Bricker JT, et al. The P2 C2 HIV Study Group. Cardiovascular status of infants and children of women infected with HIV-1 (P2C2 HIV): a cohort study. *Lancet* 2002;360(9330):368.
36. Way RC. Cardiovascular defects and rubella syndrome. *Can Med Assoc J* 1967;97(22): 1329.
37. Park MK. Congenital Heart Disease. In Park MK, eds. *Pediatric cardiology for Practitioners*. 5 th ed. St. Louis: Mosby, 2009:161-287.
38. Keane JF, Lock JE, Fyler DC. Congenital Heart Disease. In John F Keane, eds. *Nadas Pediatric Cardiology*. 2nd Ed. Elsevier Saunders 2007: 525-773.
39. Nussbaum RR. Thomson & Thompson Tıbbi Genetik. Çev Ed 6. Baskı, Güneş Yayıncılık, 2005: 17-32.
40. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 57.
41. Jiao K, Kulesa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev* 2003; 17(19):2362-7.
42. Sarkozy A, Esposito G, Conti E, Digilio MC, Marino B, Calabrò R, et al. CRELD1 and GATA4 gene analysis in patients with nonsyndromic atrioventricular canal defects. *Am J Med Genet A* 2005;15;139(3):236-8.
43. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999;104:1567-73.
44. Reamon-Buettner SM, Borlak J. TBX5 mutations in non Holt Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat* 2004;24(1):104.

45. Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, et al. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol* 2003;15;262(2):206-24.
46. Maitra M, Schluterman MK, Nichols HA, Richardson JA, Lo CW, Srivastava D, Garg V. Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development. *Dev Biol* 2009;15;326(2):368-77.
47. Singh MK, Li Y, Li S, Cobb RM, Zhou D, Lu MM, Epstein JA, et al. Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice. *J Biol Chem* 2010; 15;285(3):1765-72.
48. Lepore JJ, Mericko PA, Cheng L, Lu MM, Morrissey EE, Parmacek MS. GATA-6 regulates semaphorin 3C and is required in cardiac neural crest for cardiovascular morphogenesis. *J Clin Invest* 2006;116(4):929-39.
49. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması, 2008. http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2008/data/TNSA-2008_ozet_Rapor-tr.pdf.
50. Shieh JT, Bittles AH, Hudgins L. Consanguinity and the risk of congenital heart disease. *Am J Med Genet* 2012;158(5):1236-41.
51. Güven H, Bakiler AR, Kozan M, Aydınlioğlu H, Helvacı M, Dorak C. Yenidoğan servislerinde konjenital kalp hastalıkları. *Çocuk Sağlığı ve Hast Derg* 2006; 49(1):008-011.
52. Øyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PKA, Melbye M. Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation* 2009;120: 295–301.
53. Ul Haq F, Jalil F, Hashmi S, Jumani MI, Imdad A, Jabeen M, et al. Risk factors predisposing to congenital heart defects. *Ann Pediatr Cardiol* 2011;4(2):117-21.
54. Maslen CL. Molecular genetics of atriyoventricular septal defects. *Curr Opin Cardiol* 2004;19(3)-205-10.
55. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993;119(2):419-31.
56. Tanaka, M, Chen, Z, Bartunkova, S, Yamasaki, N, and Izumo, S. The cardiac homeobox gene Csx/NKX2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 1999;126:1269.
57. Schott JJ, 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;281:108-11.

58. Ikeda Y, Hiroi Y, Hosoda T, Utsunomiya T, Matsuo S, Ito T, et al. Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease. *Circ J* 2002;66(6):561-3.
59. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;5;42(9):1650-5.
60. Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Xavier-Neto J, Lopes AA, Krieger JE. NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *Int J Cardiol* 2010;138(3):261-5.
61. Wang J, Liu XY, Yang YQ. Novel NKX2-5 mutations responsible for congenital heart disease. *Genet Mol Res* 2011;29;10(4):2905-15.
62. Tu CT, Yang TC, Tsai HJ. Nkx2.7 and NKX2.5 Function Redundantly and Are Required for Cardiac Morphogenesis of Zebrafish Embryos. *PLoS One* 2009;4(1):e4249.
63. Elliott DA, Kirk EP, Yeoh T, Chandar S, McKenzie F, Taylor, P et al. Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2003;4;41(11):2072-6.
64. Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, Shen J, Manichaikul A, Tomita-Mitchell A, et al. Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43(6):677.
65. Maitra M, Schluterman MK, Nichols HA, Richardson JA, Lo CW, Srivastava D, Garg V. Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development. *Dev Biol* 2009;326(2):368.
66. Garg V, Kathiriyai 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.
67. Hirayama-Yamada K, Kamisago M, Akimoto K, Aotsuka H, Nakamura Y, Tomita H, et al. Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am J Med Genet* 2005;135:47–52.
68. Okubo A, Miyoshi O, Baba K, Takagi M, Tsukamoto K, Kinoshita A, et al. A novel GATA4 mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japanese family. *J Med Genet* 2004;41:e97.
69. Sarkozy A, Conti E, Neri C, D'Agostino R, Digilio MC, Esposito G, et al. Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors. *J Med Genet* 2005;42:e16.

70. Nemer G, Fadlalah F, Usta J, Nemer M, Dbaibo G, Obeid M, Bitar F. A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat* 2006;27:293.
71. Zhang L, Tumer Z, Jacobsen JR, Andersen PS, Tommerup N, Larsen LA. Screening of 99 Danish patients with congenital heart disease for GATA4 mutations. *Genet Test* 2006;10:277.
72. Schluterman MK, Krysiak AE, Kathiriya IS, Abate N, Chandalia M, Srivastava D, Garg V. Screening and biochemical analysis of GATA4 sequence variations identified in patients with congenital heart disease. *Am J Med Genet* 2007;143A:817.
73. Maslen CL, Babcock D, Robinson SW, Bean LJ, Dooley KJ, Willour VL, Sherman SL. CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome. *Am J Med Genet* 2006;140(22):2501-5.
74. Ghosh P, Bhaumik P, Ghosh S, Ozbek U, Feingold E, Maslen C, et al. Polymorphic haplotypes of CRELD1 differentially predispose Down syndrome and euploids individuals to atrioventricular septal defect. *Am J Med Genet Part A* 2012; 158A:2843.
75. Li H, Cherry S, Klinedinst D, DeLeon V, Redig J, Reshey B, et al. Genetic modifiers predisposing to congenital heart disease in the sensitized Down syndrome population. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5(3):301-8.
76. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, Maslen CL. Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 2003;72(4):1047-52.
77. Délot EC, Bahamonde ME, Zhao M, Lyons KM. BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart. *Development* 2003;130(1):209-20.
78. McCulley DJ, Kang JO, Martin JF, Black BL. BMP4 is required in the anterior heart field and its derivatives for endocardial cushion remodeling, outflow tract septation, and semilunar valve development. *Dev Dyn* 2008;237(11):3200-9
79. Hosseinkhani M, Hosseinkhani H, Khademhosseini A, Bolland F, Kobayashi H, Gonzalez SP. Bone morphogenetic protein-4 enhances cardiomyocyte differentiation of cynomolgus monkey ESCs in knockout serum replacement medium. *Stem Cells* 2007;25(3):571-80.
80. Posch MG, Perrot A, Schmitt K, Mittelhaus S, Esenwein EM, Stiller B, et al. Mutations in GATA4, NKX2.5, CRELD1, and BMP4 are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects. *Am J Med Genet* 2009;146A: 251.
81. Salazar M, Consoli F, Villegas V, Caicedo V, Maddaloni V, Daniele P, et

- al. Search of somatic GATA4 and NKX2.5 gene mutations in sporadic septal heart defects. *Eur J Med Genet* 2011;54(3):306-9.
82. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;15;30.
83. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 2004;(6): 1155.
84. Ahani A, Akbari MT, Saliminejad K, Behnam B, Akhondi MM, Vosoogh P, et al. Screening for large rearrangements of the RB1 gene in Iranian patients with retinoblastoma using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mol Vis*. 2013;19:454-62.
85. Pham Thanh D, Tran Vu Thieu N, Tran Thuy C, Lodén M, Tuin K, Campbell JI, et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhi genotypes by use of rapid multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Clin Microbiol* 2013;51(9):2950-8.
86. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* 2006;52(7):1276-83.
87. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 2004; 91(6): 1155–9.
88. Wang J, Liu Z, Liu H, Li N, Li S, Chen X, et al. Rapid detection of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements by subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification in fetuses with congenital heart disease. *Fetal Diagn Ther* 2013;34(2):110-5.
89. Sørensen KM, El-Segaier M, Fernlund E, Errami A, Bouvagnet P, Nehme N, et al. Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: Early diagnosis of syndromic patients. *Am J Med Genet* 2002. 158A:720.
90. Guida V, Lepri F, Vijzelaar R, De Zorzi A, Versacci P, Digilio MC, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of GATA4 gene copy number variations in patients with isolated congenital heart disease. *Dis Markers* 2010;28(5):287-92.
91. Beuten J, Gelfond JA, Franke JL, Shook S, Johnson-Paris TL, Thompson IM, et al. Single and multivariate associations of MSR1, ELAC2 and RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men 2010;19(2):588-99.