

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

**DOĞUMSAL SİYANOTİK KALP HASTALIKLARINDA
VE SİTUS ANOMALİLİ HASTALARDA CFC1 GENİNİN
R78W POLİMORFİZM SIKLIĞI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlknur AKTAŞ KÖŞKER

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rana OLGUNTÜRK**

ANKARA-2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
İnsan Embriyolojisi	4
Kardiyovasküler Sistem Embriyolojisi.....	6
Kardiyak Dönüş.....	8
Kalp Gelişimi ve Moleküler Biyoloji	9
Doğumsal Kalp Hastalıkları	13
Sol Sağ Aksın Belirlenmesinde Etkili Genetik Mutasyonlar	19
Multifaktöriyel Hastalıkların Kalıtım Genetiği	28
GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
Çalışma Grubu.....	31
Yöntem	32
Araç ve Gereçler.....	34
Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34
Genetik Yöntem.....	37
BULGULAR	40
TARTIŞMA.....	50
SONUÇLAR.....	55
ÖZET	56
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	57
KAYNAKLAR.....	58

KISALTMALAR

ASD	: Atriyal septal defekt
AVSD	: Atrioventriküler septal defekt
AV	: Atrioventriküler
BAT	: Büyük arter transpozisyonu
bç	: Baz çifti
ÇÇSV	: Çift çıkımlı sağ ventrikül
DKH	: Doğumsal kalp hastalığı
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EKG	: Elektrokardiyografi
EKO	: Ekokardiyografi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patent duktus arteriyozus
TGF α	: Transforming büyüme faktörü α
TGF β	: Transforming büyüme faktörü β
VSD	: Ventriküler septal defekt

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlar ve tüm omurgalı hayvanların vücut yapıları (gözler, kulaklar, bacaklar gibi) orta çizgi etrafında simetriktir. İnsan vücudu dış görünüşte simetrikken, çoğu iç organlar sol ve sağ olarak asimetriktir. Örneğin kalp solda, karaciğer sağda, sağ akciğer soldan daha fazla loba sahiptir. Bu asimetri embriyonun oluşumu sırasında belirlenmektedir. Bu sırada oluşan anormallikler lateralite defektleri olarak ortaya çıkmaktadır.

Birçok doğumsal kalp anomalisinin, kalp gelişimi sırasında ve sol-sağ aksın belirleme sürecindeki hatalarla ilgili olduğunun kanıtları bulunmaktadır (50). Doğumsal kalp anomalilerinin %8'inin genetik bir defekt ile ilgisi saptanabilir (3). Fakat bu hastalıkların moleküler genetik yapısı ile ilgili bilgilerimiz çok yetersizdir (3). Ayna görüntüsünün tam karşılığı ile sonuçlanan "situs inversus totalis" durumuna sahip sadece 1/7000-10 000 görülen nadir normal bireyler de bulunmaktadır (3,50)

Situs solitus: kalp ve diğer organların normal yerleşimini (kalp solda karaciğer sağda mide solda) ifade eder.

Situs inversus ise normalin ayna imajıdır. Heterotaksi ya da situs ambiguous organların situs solitus ya da inversus'daki bilinen yerleşimleri dışındaki anormal pozisyonlarıdır. Genellikle dalağın çok sayıda olması ya da yokluğu ile beraberdir (3).

İnsan lateralite defektlerinin çok küçük bir kısmıyla ilişkili, az sayıda gen bulunmaktadır. Bunlar ZIC3, LeftB, ACVR2B, (aktivin reseptör 2B'yi kodlar) genleridir. EGF-CFC genlerinden olan CFC1 geni bu gen ailesindendir. Sol-sağ aksın gelişiminden sorumlu diğer bir gruptur. Bu genler nodal ilişkili sinyallerde balıktan insana kadar kofaktör olarak rol oynamaktadır (2).

İnsan CFC1 geninin mutasyon taraması, heterotaksi fenotipi olanlarda CFC1 mutasyonlarında fonksiyon kaybı olduğunu göstermiştir. Goldmuntz ve arkadaşları, büyük arter transpozisyonu (BAT) ve çift çıkımlı sağ ventrikül (ÇÇSV) anomalisi olan, heterotaksisi olmayan iki hastada CFC1 gen mutasyonu saptandığını bildirmiştir (17).

Literatürdeki bilgiler ve deneysel saptamalar ışığında lateralite defekti olmayan bazı doğumsal kalp hastalıklarında da CFC1 gen mutasyonlarının bulunabileceğini düşünerek doğumsal siyanotik kalp hastalığı ve/veya lateralite defekti olan hastalarda CFC1 geninin en sık görülen polimorfizmi olan R78W sıklığını araştırmak amacıyla bu çalışmayı planladık.

GENEL BİLGİLER

Tüm omurgalılarda kardiyak apeks, mide ve dalak sola, karaciğer ve safra kesesi sağa yerleşerek karakteristik asimetri gösterir. Sol-sağ aks anormallikleri ve lateralite defektleri insanlarda 1/7000-10000 sıklığında görülür. Embriyo saat yönünün tersine bükülürken diğer organların ve tüm vücudun sol-sağ asimetrisi meydana gelir. Sol-sağ asimetrisi embriyonun gelişiminde erken dönemde organların oluşumundan önce olmaktadır. Sol-sağ asimetrisini düzenleyen yollar kardiyak gelişimde de etkilidir (3,50)

Genel populasyonda doğumsal kalp hastalıkları canlı doğumların %0.8'inde ortaya çıkarken bu insidans heterotaksik bireyler için %90'a yükselir. Yine situs inversus totalis olan kişilerde doğumsal kalp hastalığı insidansı situs solitus olan kişilere göre artmıştır (%0.8'e karşı %3) (15,34). Vücut ekseninin sol-sağ saptamasını yönlendiren mekanizmalar lateralite hastalığı ile ilişkilendirilen doğumsal kalp hastalıklarının yaygınlığını büyük ölçüde etkiler (38).

Sol-sağ asimetrisini düzenleyen yollardaki karışıklıklar heterotaksi olarak bilinen lateralite defektine, anatomik uyumsuzluğa, yapıların kaybına (aspleni), simetri ya da lateralizasyon bozukluğuna (sağ atriyal izomerizm, sol atriyal izomerizm), simetrik embriyonik organların gerilememesine (persistan sol superior vena kava) ve yetmezliğine yol açar (4).

İnsan Embriyolojisi (52)

İnsan gelişimi fertilizasyon (döllenme) ile başlar ve doğuma kadar çeşitli dönemlerden geçer. Bunlar:

Fertilizasyon (döllenme), zigotun yarıklanması, blastosist oluşumu (1. HAFTA)

Bilaminar embriyonik disk ve koryonik kese oluşumu (2. HAFTA)

Germ tabakalarının oluşumu, doku ve organların farklılaşmaya başlaması (3.HAFTA)

Organogenezis dönemi (4-8. HAFTALAR)

Fetal dönem (9. HAFTADAN DOĞUMA KADAR)

Döllenme olduktan üç hafta sonrası gastrulasyon dönemidir. Gastrulasyon, bilaminer diskin trilaminer embriyonik disk haline dönüşmesidir. Üçüncü hafta içinde gelişen en önemli olay olan gastrulasyon, morfogenezin (vücut şeklinin oluşması) başlangıcıdır. Gastrulasyon embriyonik diskin epiblast tabakası yüzeyinde primitif çizginin oluşumu ile başlar.

Üç germ tabakasının her biri (ektoderm, mezoderm ve endoderm) özel doku ve organları oluşturur. Epiblastların çizgisel bant halinde kalınlaşmasıyla oluşan opasite, primitif çizgi olarak bilinir ve embriyonik diskin dorsalinde, orta çizgi üzerinde ve kaudalde yerleşiktir. Primitif çizgi, kaudal ucuna hücrelerin eklenmesiyle bu yönde uzanırken, kranial ucunda hücre çoğalmasıyla primitif düğüm (Hansen's nod) oluşur.

Bu sırada primitif çizgide primitif oluk gelişir. Primitif oluk, primitif düğümde oluşan bir çöküntü ile devam eder ve bu çöküntüye primitif çukur denir. Primitif çizgi belirir belirmez embriyonun kaudal eksenini, kranial ve kaudal yönleri, dorsal ventral yüzü, sağ ve sol tarafı belirlenir.

Primitif çizginin derinindeki hücreler ayrılarak mezenşim ya da mezoblast denilen gevşek bağ dokusunu oluştururlar. Mezenşimal hücrelerin bir kısmı ise hipoblast tabakasını işgal eder. Bu tabakaya endoderm denir. Bu iki hücre tabakasının en üstteki tabakasına ektoderm adı verilir.

Primitif düğümden mezenşim hücreleri kraniale doğru göç ederek notokordu oluştururlar. Notokord oluşuktan sonra nöral plak, nöral tüp ve nöral krista oluşur.

Notokord ve nöral tüp oluştuğunda bunların her iki yanındaki intraembriyonik mezoderm proliferasyon olarak kalın ve longitudinal paraksiyel mezoderm kolonlarını oluşturur. Her bir kolon lateralde ara mezoderm ile bu da giderek incelen lateral mezoderm tabakası ile devam eder.

Paraksiyel mezoderm farklılaşarak somitleri bunlar da aksiyel iskeletin (kafa kemikleri, omurga, kostalar ve sternum) büyük kısmını oluştururlar. Lateral mezoderm içinde intraembriyonik solum (vücut boşluğu) oluşur. Bu boşluk daha sonra peritoneal boşluk gibi diğer vücut boşluklarının kökenini oluşturur. Gastrulasyon dönemi, kan damarları, kanın oluşması ve koryon villuslarının oluşumunun tamamlanması ile sonlanır.

Kardiovasküler Sistem Embriyolojisi (52)

Kalbin primordiumu ilk olarak 18. günde belirir ve 22-23. günde atmaya başlar. Kardiyojenik alanda perikardiyal sölom'un ventralindeki splanknik mezenşimal hücreler toplanırlar ve iki longitudinal hücrese kardiyak primordiyı–anjioblastik kordonları yaparlar.

Bu kordonlar kanalize olarak iki adet ince duvarlı endokardiyal kalp tüplerini oluştururlar. Lateral embriyonik katlanmalar oluştuğunda endokardiyal tüpler birbirine yaklaşır ve tek bir endokardiyal tüp yapmak üzere birleşir. Endokardiyal tüplerin birleşmesi, gelişen kalbin kranial ucundan başlar kaudale doğru uzanır.

Kalp tüpleri birleşince, embriyonik kalbin dış tabakası, primordium miyokardiyale, perikardiyal sölom'u saran splanknik mezodermden oluşur. Bu aşamada gelişen kalp ince endotelial bir tüptür. Endotelial tüp, kalbin iç endotelial örtüsünü yapar yani endokardiyumu oluşturur. Primordium miyokardiyale, miyokardiyumu oluşturur. Visseral perikardium veya epikardium ise sinus venosus'un dış yüzünden köken alan ve miyokardiyumun üzerine dağılan mezotelial hücrelerden farklılaşır. Tübüler kalp uzar, genişleme ve daralmalar oluşur.

Tübüler trunkus arteriozus aorta yaylarının çıktığı sakkus aortikus ile devam eder. Kalp kendi üzerine kıvrılır ve bu şekilde bulboventriküler kıvrımı yapar. Kanalis atriyoventrikularisin bölmelenmesi; yani primordium atriya ve ventrikulare oluşumu

dördüncü haftanın ortalarında başlar ve beşinci haftanın sonunda tamamlanır. Kalbin primordiumu dört oda içerir:

1. Bulbus kordis 2. Ventrikül 3.Atriyum 4.Sinus venozus

Sinus venozus, primitif atriyumun dorsal duvarının ortasına açılır. Sağ ve sol olmak üzere iki boynuzu vardır. Sol boynuz koroner sinüs olur. Sağ boynuz ise genişler, sağ atriyum duvarıyla birleşerek vena kava superior, vena kava inferioru oluşturur ve plasentadan gelen kanı alır.

Dördüncü haftanın sonundan başlayarak primordium atriya, iki septanın (septum primum ve septum sekundum) oluşumuyla sağ ve sol atriyumlar olarak bölünür. Sol atriyum genişledikçe, primordium vena pulmonalis ve ana dalları sol atrium duvarıyla birleşir ve sonuç olarak 4 pulmoner ven oluşur. Primordium ventrikülare iki septumun (muskuler septum ve membranöz septumun) oluşumuyla sağ ve sol ventriküller olarak bölünür. Kalp dördüncü ve yedinci haftalar arasında dört boşluğa bölünür. Septum aortiko pulmonale ile aorta ve trunkus pulmonalis iki arteriyel kanala ayrılır.

Trunkus arteriosus'un bölmelenmesi hemen hemen tamamlandığında, aorta ve trunkus pulmonalis açıklıklarının etrafındaki subendokardiyal dokudaki 3 şişkinlikten valva semilunaris (valva aortika ve valva pulmonalis) gelişmeye başlar. Valva atrioventrikularis (valva trikuspidalis ve valva mitralis) benzer olarak AV kanallarının çevresindeki dokunun bölgesel çoğalmasından meydana gelir. Kalp büyüdükçe sağa doğru

kıvrılır ve erişkin görünümünü alır. Kalbin gelişiminin kritik dönemi fertilizasyondan sonraki 20-50. günlerdir. Bu zamanda normalden herhangi bir sapma, bir veya daha fazla doğumsal kalp defekti oluşturabilir.

Kalbin Dönüşü

Gelişim süresince sağ-sol asimetrisi gösteren vücuttaki ilk yapı kalptir ve bu asimetrinin ilk belirtisi primitif kalp tüpünün öne ve sağa dönüşüdür. Bu da d-loop adını alır. Gelecekteki sol ventrikülü oluşturacak primitif ventrikül de sola doğru değiştirir. Dönüş sonrası kalp, gelişen sağ ventrikülü oluşturmak için solun önüne doğru döner. Kalp sağ yerine sola döndüğünde (l-loop) ventriküllerin normal pozisyonu toraksta yer değiştirir. Morfolojik sağ ventrikül sola, morfolojik sol ventrikül de sağa uzanır. Bu sol-sağ yer değişimi diğer tüm organlarda sol-sağ aks değişimine eşlik eder.

Sonuçta situs inversus oluşur. Belirgin olarak birçok situs inversuslu vakada daha sonraki kalp gelişimi normaldir. Buna rağmen normal situslu l-loop'u olan hastalarda ciddi kalp defektleri meydana gelir. Sıklıkla l-loop AV kapak göçünde yetersizliğe neden olur. Bu da çift çıkımlı sol ventrikül ile sonuçlanır. Eğer AV kapak göçü olursa sol ventrikül sağ atriyum ve sol atriyum da sağ ventrikülü takip eder. Bu koşulda eğer konus ve turunkus gelişimi normalse (sağ ventrikül pulmoner artere ve sol ventrikül aortaya açılıyorsa) sonuç izole ventriküler inversiyondur. Daha sık olarak l-loop ventrikülo-arteriyel bağlantıyı yanlış takip edebilir. Sağ ventrikül aortaya, sol ventrikül de pulmoner

artere açılır. Tam sonuç; sol ventrikül, sağ atriyum ve pulmoner arter arasında, sağ ventrikül de sol atriyum ile aorta arasındaki interpozisyonudur. Bu da doğumsal olarak düzeltilmiş büyük arterlerin transpozisyonudur (L-Transpozisyon). (6)

Kalp Gelişimi ve Moleküler Biyoloji (1)

Erken Kalp Gelişiminin Düzenlenmesi

Kardiyak gelişimin en kolay ve en sık kullanılan belirleyicilerinden biri başlangıçtaki kas protein gen ekspresyonu olup mRNA'ya uyan birikim olarak tanımlanır. Bundan başka kontraktıl protein geninin düzenlenmesinde çeşitli anahtar faktörler içeren transkripsiyonel faktör tanımlanmıştır. Bunlar kas kreatin kinaz genini düzenleyen MEF-2 (miyosit spesifik arttırıcı faktör 2) olarak bulunmuştur ve birçok kontraktıl protein geninin düzenlenmesini içerir. Dört adet mef-2 gen bulunmuştur. Her biri çok sayıda izoformları kodlar.

Farede mef-2C döllenmeden 7,5 gün sonra ön splanknik mezoderimde ve 11,5 gün sonra kalp tüpünün miyokardiyumunda, venöz sinüste açığa çıkar. mef-2A ve mef-2D 8. günde (kardiyak dönüş safhasında) ve 13,5 güne kadar devam eder. Erken kalp gelişiminde açığa çıkan diğer ailesel faktör GATA faktörüdür. GATA-4'ün açığa çıkması için kontraktıl protein genine ihtiyaç vardır ve iskelet kasını oluşturan α miyozin ağır zincirinin gen promotor bölgesini aktive eder. GATA-4 kardiyak spesifitenin belirlenmesinde rol oynar. Bu gen majör iskelet kaslarında normal açığa çıkmayan α miyozin ağır zincir geni

olarak kardiyak spesifitenin belirlenmesinde rol oynar. Farede GATA-4 ekspresyonun başlaması 7,5 günde anterior endodermde ve mezodermde olur.

Kalp içinde bu dönemde kaudalde venöz sinüsün sonu ve splanknik mezoderm ile ekspresyon sınırlandırılmıştır. GATA-4, 8. günde kalp tüpü boyunca meydana gelmektedir. Bu ailenin diğer üyeleri kalpte açığa çıkan GATA-5, endokardiyum ve miyokardiyumun her ikisinde, lateral plağın diğer derivelerinde açığa çıkar. Çok uzak ilişkili homeobox genlerinin tersine, gelişen kalbin çevresinde açığa çıkmaktadır. Nkx2.5 ya da Csx olarak adlandırılan iki grup bağımsız homeobox geni gösterilmiştir. Gelişmekte olan kalpte ve erişkin miyokardiyumda açığa çıkar. Daha sonra miyokardiyal tüp ve sinüs venozus boyunca gözlenir. Fonksiyonel rolü kesin olarak bilinmemektedir.

Diğer homeobox genleri kalp içinde açığa çıkar. Bunlar Msx-1, Msx-2, MHox genleridir. Msx-2 kuşlarda, gelişen miyokardiyum alanında gözlenir ve iletim sisteminin gelişimine katkıda bulunur. Msx-1 endokardiyal yastık dokularında açığa çıkar ve bu dokudaki mezenşimal hücre popülasyonunun oluşmasında rol alır. Atriyovenriküler bağlantıda kenar doku mezenkimi, endokardiyum hücrelerinin tabaka halinde diziliminden oluşur. Msx-1'in ekspresyonu mezenşimin gelişiminin devamında gözlenir. MHox kas kreatin kinaz geninin düzenlenmesinde rol oynayan adenin-timinden zengin sekans motifine bağlanmada bir faktör olarak tanımlanmıştır. Fetal hayattan erişkin döneme kadar kardiyak kas geninin düzenlenmesinde rol oynar.

Dominant fonksiyonel özellik olarak ayrılan miyokardiyum, erken kalp tüpünden daha ileri dönemde yavaş impuls üretir. Pacemaker aktivitesi erken dönemde kardiyak tüp içinde vardır.

İmpulsların yavaş üretilmesi tübüler kalpte karakteristik olan peristaltoid form kontraksiyonlara yol açar. Kalbin üst kısımları hızlı, alt kısımları yavaş kontraksiyonlarla karakterizedir. Kısa zamanda hızlı miyozin formları (α -MHC) ve sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATP az (SERCA-2), uzun zamanda da yavaş miyozin formları (β -MHC) ve az miktarda SERCA-2 açığa çıkar.

Embriyonik ventrikül, trabeküler ve kompakt miyokardiyal komponentler olarak ayrılmışlardır. Erken ventrikül miyokardiyumunun hepsi trabekülerdir. Majör kardiyak “gap junctional protein connexin 43” ventriküler trabekülasyonlarda en yüksek seviyede açığa çıkmaktadır. SERCA-2 trabeküler komponentte düşük olmaktadır. Benzer mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında kompakt miyokardiyumda oldukça düşüktür. Connexin 40 iletim sisteminin bir kısmında baskın gap junctional proteindir.

Kontraktil komponentler tek genle kodlanmaz. Bu multigen ailenin her bir üyesinin farklı protein izoformları vardır. Bunlardan biri olan miyozinin, iki adet miyozin ağır zinciri iki adet miyozin hafif zincir tipleri vardır. (Miyozin hafif zincir 1 (MLC1), miyozin hafif zincir 2 (MLC2)). Bu proteinlerin her birinin çok sayıda izoformu vardır ve tek genle kodlanarak ayrılırlar. Kardiyak kasta açığa çıkan iki miyozin ağır zincir

izoformları (α -MHC ve β -MHC) birbirine yakın bağı genle kodlanırlar. α -MHC en yüksek oranda kalbin giriş yolunda, β -MHC ise kalbin çıkış yolunda bulunur.

Atriyumlarda α izoform ventriküllerde β izoform bulunmaktadır. β -MHC atrioventriküler bağlantı sınırında açığa çıkmaktadır. Fakat yeni oluşan kalpte atrioventriküler sınırda olmamaktadır. Küçük memelilerde ilk haftada ventriküllerde açığa çıkan β -MHC gelişim esnasında α -MHC ile yer değiştirir. Büyük memelilerde ve insanlarda β -MHC ventriküler kaslarda baskın izoform olarak açığa çıkıp gelişimde ve ergenlikte devam etmektedir. Ayrılan genlerin kodladığı yetişkinlerdeki miyozin hafif zincirin atriyal izoformları MLC1A, MLC2A ve yetişkin ventriküler izoformları MLC1V, MLC2V'dir.

Tip 1 miyozin hafif zincirleri başlangıçta kardiyak tüp boyunca açığa çıkar. Atriyal tip 2 miyozin hafif zincir konsantrasyonu kalbin giriş yollarından çıkış yollarına doğru azalır. Ventriküler Tip 2 miyozin hafif zinciri buna rağmen bölgesel sınırlanmış ekspresyon paterni gösterir. MLC2A ve MLC2V miyokardiyumda, kalbin giriş yollarında, atrioventriküler kanalda, kalbin çıkış yollarında erişkin hayata kadar eksprese olurlar.

İnce filament protein olan α aktinin üç izoformu kalp kasında açığa çıkmaktadır ve ayrı genlerle kodlanmaktadır. İnsan kalbinde α iskelet aktini ilk papiller kaslarda bulunmuştur. Diğer izoformlarının gelişimsel değişimleri henüz aydınlatılamamıştır.

İnce filament proteinleri olan troponin kompleksin troponin I, troponin T, ve troponin C olmak üzere üç izoformu vardır. İki farklı troponin C geni vardır. Hızlı iskelet ve yavaş iskelet / kardiyak izoformları kodlar. Yavaş kardiyak izoform her iki atriyal ve ventrikül miyokardında gelişimde ve erişkinlikte açığa çıkar.

Troponin I'nın iki geni gelişen kalpte açığa çıkar. Bunlar erişkin kalp izoformu (TnIc) ve yavaş iskelet kas izoformunu kodlar. Erişkin atriyal ve ventriküler miyokardiyumda bulunan tek izoform kardiyak izoformdur. Tek genle açığa çıkan troponin T, kalbin gelişimi boyunca eksprese olmaktadır.

Doğumsal Kalp Hastalıkları (DKH) (3)

Doğumsal kalp hastalıkları (DKH) genel olarak 1000 doğumda 6-8 olgu olarak bildirilmiştir. Doğumsal kalp anomalilerinin etiyolojisi henüz iyi bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu, multifaktöriyel olarak açıklanmaya çalışılmıştır. DKH'nın %2-4'ü çevresel ya da maternal ve teratojenik etkilerle oluşmaktadır. Bunlar, iyonize radyasyon, maternal diabetes mellitus, maternal fenilketonüri, maternal sistemik lupus eritematozus, konjenital rubella sendromu, annenin sigara, alkol kullanımı ve ilaçlar (lityum, etanol, varfarin, talidomit, antimetabolitler, antikonvülzif ajanlar)'dır. Vakaların %3-5'i ailevi ya da kalıtsal sendromların (Noonan, Holt Oram, Ellis van Creveld, tuberoz skleroz, Marfan sendromu) bir parçası olarak, %5'i kromozom anomalileri (trizomi, 21, 18, 13, Turner sendromu) ile birlikte görülür.

Vakaların %8'inde genetik bir defektle ilgisi saptanabilir, çoğu vakada ise etiyoloji belirlenemez.

Doğumsal Kalp Hastalıkları genel olarak üç gruba ayrılır (37):

1- Soldan sağa şanlı doğumsal kalp hastalıkları (Asiyanotik)

(Atriyal septal defekt, ventriküler septal defekt, patent duktus arteriozus, atriyoventriküler septal defekt, parsiyel pulmoner venöz dönüş anomali)

2- Sağdan sola şanlı doğumsal kalp hastalıkları (Siyanotik)

(Büyük arterlerin transpozisyonu, Fallot tetralojisi, çift çıkımlı sağ ventrikül, pulmoner atrezi, total anormal pulmoner venöz dönüş anomali, trikuspid atrezisi, Ebstein anomali, persistan trunkus arteriozus, tek ventrikül, hipoplastik sol kalp)

3- Obstrüktif Lezyonlar

(Pulmoner stenoz, aort stenozu, aort koarktasyonu, kesintili aorta)

Çalışma grubumuzda yer alan bazı doğumsal kalp hastalıkları ile ilgili kısa bilgiler aşağıda verilmiştir:

Büyük Arterlerin Transpozisyonu (3)

Kalbin embriyolojik gelişmesinde, kalpten çıkan ve trunkus denilen damar ikiye bölünerek pulmoner arteri ve aortayı oluşturur. Trunkusun bu bölünmesi, yukarıdan başlar aşağı doğru devam eder. Böylece yukarıda ve önde yer alan aorta, aşağıda ve arkada kalarak sol ventriküle bağlanır. Transpozisyonda bu spiral bölünme yerine düz bir bölünme olur.

Sonuçta yukarıda önde yer alan aorta aşağıda ve önde olan sağ ventriküle, yukarıda ve arkada olan pulmoner arter aşağıda ve arkada yer alan sol ventriküle bağlanmış olur. ASD, VSD, PDA gibi bağlantılardan hiç birisi yok ise yaşam söz konusu olamaz.

Fallot Tetroljisi (3)

Fallot tetroljisinde dört komponent bulunur:

1) Ventrikül septum defekti 2) İnfindubuler ve pulmoner stenoz 3) Aortanın ata biner şekilde septum üzerinde yer alması (aorta dekstropozisyonu) 4) Sağ ventrikül hipertrofisi

Ventrikül septum defekti her zaman subaortik membranöz septum bölgesindedir ve çoğu kez geniştir. Pulmoner darlık sağ ventrikül çıkışında olup, infindibulum denilen bölgedeki kasların hipertrofisi sonucu gelişir. Ek olarak çoğu kez pulmoner arter ve dallarında değişik derecede hipoplazi olabilir.

Hipoplastik Sol Kalp (3)

Sol ventrikül küçük ve fonksiyonsuzdur. Sağ ventrikül hem pulmoner hemde sistemik dolaşımı sağlar. Kalbin sol yarısının az gelişmişliğine ek olarak, aorta veya mitral kapaklarda atrezi ve çıkan aortada hipoplazi vardır. Kan ASD'den geçer veya dilate foramen ovale aracılığıyla kalbin solundan sağına geçer burada sistemik venöz kan ile karışır.

Trikuspit Atrezisi (3)

Trikuspit kapak agenezisi nedeni ile sağ atriyum, sağ ventriküle açılmaz. Sağ atriyum için tek çıkış yolu, genellikle geniş bir foramen ovale veya ASD' dir. Sağ ventrikül hipoplaziktir ve genellikle pulmoner arterlerde hipoplazik olur. Sol ventrikülden VSD ya da PDA yolu ile indirekt olarak akciğerlere kan gönderilir.

Trikuspit atrezisinin sınıflaması pulmoner stenozun varlığına ve büyük arterlerin pozisyonuna göre yapılır.

Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül (3)

Hem aort hem pulmoner arter sağ ventrikülden çıkar. Aort genellikle pulmoner arterin sağındadır. Aortik ve pulmoner kapaklar aynı seviyededir. Konus septum aortik ve pulmoner arterler arasında bulunmaktadır. VSD, sol ventrikülün tek çıkışıdır.

Total Anormal Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi (3)

Pulmoner venlerin sol atriyum yerine ya doğrudan olarak ya da V. kava superior, azigos veni, sol innominat ven, koroner sinüs, duktus venozus aracılığı ile dolaylı olarak sağ atriyuma açılmalarıdır. Genellikle pulmoner venler bir araya gelerek, sol atriyumun arkasında bir ortak venöz odacık oluşturur ve bu odacık doğrudan ya da dolaylı olarak sağ atriyuma açılır. Böylece kalbe gelen tüm oksijenlenmiş kan sağ atriyumda toplanır.

Dekstrokardi (3)

Eğer kalp tüpü sağa değil sola kıvrılırsa kalp sağda yerleşir. Yani kalp ve damarlar soldakinin ayna görüntüsü şeklinde sağda yerleşir. Dekstrokardi kalbin en sık görülen pozisyonel anomalisidir.

Situs inversus totalis sıklığı 1/7000-10 000 iken izole dekstrokardi daha nadir olup sıklığı 1/29000'dir. Situs solitus ile birlikte olan dekstrokardi genellikle majör intrakardiyak anomalilerle birlikte dir.

Situs inversus totalisde kalp ile birlikte karaciğer, dalak, mide gibi iç organların da yer değiştirmesi söz konusudur, o zaman kalp hastalıklarının görülme sıklığı daha azalır.

Bazı Genetik Terimlerin Tanımlanması (35)

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

Alellik Heterojenite: Genetik heterojenite nedeni bir lokusta çok sayıda alel bulunmasıdır, buna alellik heterojenite denir.

Lokus Heterojenitesi: Genetik heterojenitenin hastalığın birden fazla lokusla ilişkisinden kaynaklanmasına lokus heterojenitesi denilmektedir.

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

Bir DNA dizisindeki tek bir nükleotid değişimi (veya nokta mutasyonu) üçlü bazdaki kodu değiştirebilir ve gen ürününde bir aminoasidin diğeriyle yer değiştirmesine sebep olur; **buna yanlış anlamlı mutasyonlar (missense mutasyonlar)** adı verilir. İnsanlarda genetik hastalığa neden olan mutasyonların yarısı bu mutasyonlardır.

Üç ‘dur’ kodonundan birini meydana getiren mutasyona **nonsense (anlamsız mutasyon)** adı verilir. Bu mutasyonlar, hastalığa neden olan mutasyonların %12’ sini içerir.

Polimorfizm: Belli bir kromozom bölgesi (lokus) üzerinde, bilinen DNA dizileri allel olarak adlandırılmıştır. Herhangi bir lokusta toplumdaki sıklığı %1'den fazla olan iki tane yaygın bulunan allel varsa, bu lokusun polimorfizm sergilediği söylenir ve bu allel polimorfik olarak adlandırılır.

Sol – Sağ Aksın Belirlenmesinde Etkili Genetik Mutasyonlar

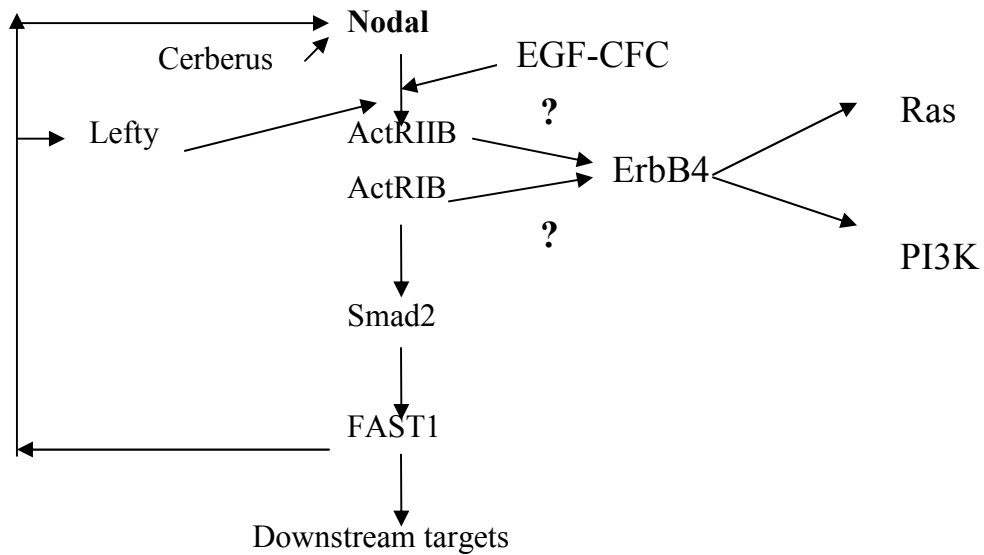
İnsan situs defektlerinin küçük bir yüzdesiyle ilişkili az sayıda gen bulunmaktadır. Bunlar ZIC3, LEFTB (önceden LEFTY2), ACRV2B, EGF-CFC gen ailesinden CFC1 genidir. Model organizmada ise Ebaf, pitx2, Nodal, FRL-1, oep olarak tanımlanmıştır (7,9,26,43) (Tablo I).

Tablo1. Lateralitede Ve Kardiak Dönüşte Etkili Mutasyonlar (23)

GEN	ORGANİZMA	LATERALİTE VE KARDİAK FENOTİP
Nod komponentleri		
İv/LRD	Fare	Heterotaksi, kalp dönüşünün oluşumu
KIF3A	Fare	Heterotaksi, kalp dönüşünün oluşumu
KIF3B	Fare	Heterotaksi, kalp dönüşümünün oluşumu
Sinyal molekülleri		
Shh	Fare	Kalp dönüşünün sağlanması ve anormal kalp pozisyonu
FGF-8	Fare	Sağ akciğer izomerizm, kalp dönüşümünün oluşumu
Aktivin reseptör 2B	Fare	‘Aspleni sendrom’, kalp pozisyonun oluşumu, sağ atrial izomerizm, BAT, VSD, ASD
ACRV2B	İnsan	Çeşitli situs anormallikleri
Cryptik	Fare	Sağ akciğer izomerizm, kalp dönüşümünün oluşumu, BAT
CRYPTİK	İnsan	AV septal defektler Çeşitli situs anormallikleri
Lefty-1 (LEFTYB)	Fare	‘Polispleni sendromu’ sol torasik izomerizm, sol atriyal izomerizm
LEFTYA (Lefty-2)	İnsan	Çeşitli situs anormallikleri
Nodal+/- Smad2+/-	Fare	Sağ akciğer izomerizm, BAT
Cyclops (Nodal)	Zebrabalığı	Orta hat defektleri, kalp dönüşümünün oluşumu
Transkripsiyon faktörleri		
Pitx2	Fare	Sağ akciğer izomerizm, birleşik atriyoventriküler kanal
ZIC3	İnsan	X geçişli situs anormallikleri
Smad5	Fare	Kalp dönüşünün oluşumu, embriyo dönüşünün yapılamaması
Momo	Zebrabalığı	Orta hat defektleri, kalp dönüşümünün oluşumu
Inv/inversin	Fare	Situs inversus

İlk EGF-CFC geni 1989’da c-DNA’nın füzyon transkripti olarak izole edildi. EGF-CFC genleri uzun yıllar Epidermal Growth Faktör benzeri büyüme faktörleri ile uzaktan ilişkili olarak kabul edildi (10). EGF ilişkili faktörler EGF, TGF α , neuregulin, amphregulin, betacellulin, epiregulin, tomoregulin ve heparin bağlayıcı EGF’yi içerir (25,49).

EGF-CFC proteinleri balıktan insana kadar nodal ilişkili sinyallerde ekstrasellüler kofaktör olarak rol oynar (Şekil 1). Bu sinyaller de sol-sağ aks gelişimiyle ilişkilidir (7,9,26).



Şekil 1. Nodal Sinyal Yolunda EGF-CFC Fonksiyonunun Modeli (44)

EGF-CFC genlerinin diğ er görevleri arasında germ tabakalarının oluşumu, anterior–posterior aks oryantasyonu ve bu genin mutasyonu ile kanser (criptonun mutasyonu ile insan meme, kolorektal, gastrik, ve pankreas kanseri) oluşumu görülmektedir (44).

EGF- CFC gen ailesinin proteinleri, Epidermal Growth Faktör benzeri motif, yeni sisteinden zengin motif (CFC motif) ve C terminal hidrofobik bölgeden oluşmuştur (13,18,24,53). EGF-CFC proteinleri 171-202 aminoasit, EGF benzeri motif yaklaşık 40 aminoasit içerir. Tüm EGF benzeri motifler, criptik, cripto ve FRL1’de benzerdir. Bu EGF benzeri motifler 3 dis lf t bağından oluşan 6 sistein içerirler ve ilk iki sisteinleri komşudur (45).

EGF-CFC gen ailesinin  yeleri (Tablo II):

- İnsan ve farede criptik ,
- İnsan, fare ve tavukta cripto,
- Kurbağıada FRL1,
- Zebrabalığıında da oep genidir (2,10,11,13,24,45).

Criptik, cripto, FRL1 arasında sekans benzerlikleri olup bunun kodladıkları proteinleri EGF ilişkili genlerin yeni ailesi olan CFC ailesi olarak adlandırılır (45).

EGF-CFC (Epidermal Growth Factor - Cripto, FRL1, Criptik) olarak adlandırılmıştır (45).

Tablo II. EGF-CFC Gen Ailesinin Üyelerinin Fonksiyonları Ve Ekspresyon Biçimi (41,44)

GEN	TÜR	EKSPRESYON BİÇİMİ	FONKSİYON VE MUTANT FENOTİP
Cripto	Fare	İmplantasyon öncesi epiblastta proksimal-distal ve kaudal-sırt bölgesinde, mezoderm oluşum döneminde, kalp çıkış yolu oluşum döneminde	Ön-arka aks oluşumu ve pozisyonu, primitif çizginin oluşumu, germ yapraklarının oluşumu, kardiyomyosit gelişimi / anterior visseral endoderm markırlarının distalde, posterior primitif çizgi markırlarının proksimalde ekspresyonu, primitif çizginin yokluğu, embriyonik mezoderm ve endodermin yokluğu
Criptik	Fare	Nöral plak döneminde aksiyal ve lateral plak mezoderminde, nod, notokord, prospektif zemin tanakada ve lateral plak mezoderminde	Sol-sağ aks spesifikasyonu, sağ izomerizasyon, kalp defektleri / sağ pulmoner izomerizm, BAT, vasküler heterotaksi lateral plak mezoderminde sol taraftaki genlerin ekspresyonunun olmaması, hipospleni
FRL1	Kurbağa	RT-PCR analizle düşük seviyede maternal ekspresyon ve gastrula döneminde her yerde eksprese olur.	Mezoderm ve nöroektoderm oluşumu
Oep	Zebrabalığı	Zigotun dorsal ve ventral bölgesinde, gastrulasyonda; aksiyal ve paraksiyal hipoblastta, gastrulasyon sonunda beyinde ve aksiyal orta çizgide, notokord, lateral plak, dorsal diensefalik bölgede	Ön-arka aks oluşumu ve pozisyonu, mezoderm ve endoderm oluşumu, ventral nöroektoderm, sol-sağ aks oluşumu / endodermin yokluğu, kafada ve gövdede endoderm ve mezodermin yokluğu, anormal ön-arka aks oluşumu, lateral plak mezoderminde sol taraf spesifik genlerin olmaması, sol-sağ aks spesifikasyonunun bozulması

Cripto, ön-arka aks ve gastrulasyonda germ tabakalarının oluşumunda görev alır. İnsan ve farede criptik, sol-sağ aksın belirlenmesinde rol alır. Zebrabalığında oep, bu süreçlerin (sol-sağ aks ve ön-arka aks oluşumu) tümünde kofaktör olarak rol oynamaktadır (44). Kurbağada, FRL1 posterior mezodermle ilgili yapıların ve ön kafa yapılarının gelişiminde rol alır (41).

Cripto ve FRL1 tanımlanması fare gastrulasyonu süresince mezoderm oluşumu çalışmalarından elde edilmiştir. Bu da yeni EGF-CFC geni olan criptik proteinin izolasyonuna neden olmuştur (45). Bundan kısa bir süre sonra zebrabalığında oep geni pozisyonel klonlama çabalarıyla tanımlanmıştır (14,19,42,46).

Criptik, insitu hibridizasyonla gastrulasyon sırasında aksial ve lateral plak mezodermde eksprese olur. Ayrıca primitif çizginin önü, kafa sürecinde, nod, notokordal plak ve ara mezodermde de eksprese olur. Criptik, nöral tüpün zemin plakasının erken belirleyicisidir. Criptik ekspresyonu gastrulasyon sonunda biter ve sonraki embriyonik dönemlerde ya da erişkin dokularda gözlenmez. Böylece criptik, gastrulasyon sırasında mezoderm ve nöral oluşumda sinyal molekülü olarak da görev alır (45).

EGF-CFC genleri CFC1 (criptik protein)'i kodlamaktadır. CFC1, 2. kromozomun uzun kolunda 2q21.1 lokalizasyonunda bulunmaktadır. Fare criptik proteiniyle insanınki karşılaştırıldığında insanda C terminalinde 29 aminoasit fazlalığı vardır (33).

Günümüzde sol-sağ aks ile ilgili yayınlar ve hayvan model sistemleri vardır.

Çeşitli bağlantı yöntemleri kaskat oluşum düzenine aracılık eder. Bunlar:

- 1) Simetrik kırılma
- 2) Noddan sol lateral plak mezodermine sağ-sol pozisyonel bilginin iletimi
- 3) Spinal yüzeyel tabaka, prekordal tabaka ve notokord olan orta hat tabakalarının fiziksel, moleküler olarak sürdürülmesi
- 4) Nod ve orta hat yapılarının fonksiyonları yoluyla sol lateral plak mezodermindeki lateralize oluşumun sürdürülmesi
- 5) Nodal ilişkili indüksiyon ile sol lateral plak mezoderminin farklılaşması
- 6) Hücre proliferasyonu ve / veya hücre ölümünün farklılaşmış kontrolü yoluyla pozisyonel bilginin organ primerlerine transferidir (5,47).

Embriyoda, orta hat pozisyonunda asimetrik sol-sağ gen ekspresyonunun sol lateral plak mezoderminden kurulumunu kontrol için Hansen's nod belirlemiştir (27).

Nodun lateral kenarındaki nodal bölgesinde sentezlenen nodal gen tarafından sol-sağ asimetrik ekspresyon bilgisi EGF-CFC genleri ile sol lateral plak mezodermine iletilmektedir (21,39). Bu bilgi iletildikten sonra sol lateral plak mezoderminde nodal, pitx2, lefty-2 genleri asimetrik olarak eksprese olur. Genler asimetrik eksprese olduktan sonra sol-sağ asimetrisi sağlanmış olur (16).

Nodal, nodun büyüme düzenleyici ürünüdür. TGF β ailesinin sinyal molekülüdür (20). Nodal, sol-sağ aksın kurulumunda rol oynar ve *pitx2*'nin asimetrik ekspresyonunu sağlar (8,12,29,30,40). Nodal, nodun çevresinde ve lateral plak mezoderminde eksprese olmaktadır (16).

Nodal, organ asimetrisine sebep olan sol taraftaki bir takım genleri harekete geçirir. Bunun için bir takım hipotezler öne sürülmüştür (50). Tavuk embriyosunda ileri sürülen mekanizma, $H/K^+ - ATP$ az aktivitesi zar potansiyellerinde bir meyil yaratır. Bu da dolayısıyla sol / sağ ekseninde farklı bir demir akımı yaratabilir. Böylelikle solda kalsiyum toplanır (28).

Farede ise sol tarafta kalsiyum birikmesi için gerekli oldukça farklı bir mekanizma ileri sürülmüştür. Fare nodunda ve onun kadar da insanlarda, iki tip silia popülasyonu vardır. Silianın kendiliğinden hareket edebilen tiplerinden biri sağ taraftan sol tarafa sıvı aktarır ve bu sol taraftaki hareket edemeyen siliayı bükür. Bu da dolayısıyla nodal hareketlilik ve kalsiyum serbest salınımıyla sonuçlanır (22).

Sol-sağ aks belirlenmesindeki kavramsal yolda sol-sağ simetrisini kıran başlangıç olay embriyonik nod ve derivelerinde oluşur (51). Lefty-2, TGF- β ailesinin bir üyesi olarak lateralite tayininde rol oynamaktadır (31,32). Lateral plak mezoderminde ve prospektif taban plaklarında açığa çıkmaktadır (16).

Pitx-2, pozisyonel bilginin organ primerlerine aktarımında aracılık eder. Kardiyak büyümede, kalp tüpünün dönüşünün sağlanmasında önemli role sahiptir (4). Pitx-2 embriyonun başında ve lateral plak mezoderminde açığa çıkmaktadır (16).

Esansiyel kofaktör olarak rol oynayan EGF-CFC proteinleri lateral plak mezodermindeki sol-sağ asimetric gen ekspresyonunu aktive eden sinyal yoluna aracılık ettikleri gösterilmiştir (18,51).

Sol-sağ asimetrisini düzenleyen yollar kardiyak gelişimde de etkilidir. Kalpte kalp tüpünün sol tarafındaki pitx2'nin hedefi kardiyak tüpün dönüşümünün ve kardiyak gelişimin sağlanmasıdır (40).

Criptik mutant embriyolarda nodal, lefty2 ve pitx2'nin sol-sağ asimetric ekspresyonu lateral plak mezoderminde oluşmaz. Nodun lateral kenarlarındaki nodalin, sol-sağ asimetric ekspresyonu criptik mutantlarda gözlenir. Bu da sol-sağ spesifikasyonu nodda oluşurken sol lateral plak mezoderminde oluşmadığını gösterir (51). Heterotakside görülen kardiyovasküler malformasyonlar sıklıkla komplekstir. Bunlar kombine malpozisyon ve BAT, ASD, VSD, bilateral superior vena kava, parsiyel anormal pulmoner venöz dönüş, çift çıkımlı sağ ventrikül, birleşik atrium, AVSD, pulmoner atrezi ve stenozu, tek ventrikül, sol ventrikül çıkım yolu obstrüksiyonudur (4).

Criptik homozigot mutantlarda abdominal kavitede mide, karaciğer, dalak ve pankreası içeren visseral organların situs inversusları ile buna zıt olarak aspleni veya ciddi

hipospleni görülebilmektedir (50).Toraks kavitesinde tüm homozigotlarda sağ pulmoner izomerizm, dekstrokardi veya mezokardi görülmektedir (50).

Önceleri CFC1'in mutasyonu (Tablo III), lateralite defektli hastalarda kompleks kalp hastalıklarının varlığında gösterilmiştir. Fakat günümüzde yapılan araştırmalarda izole kalp hastalıklarında da (ÇÇSV ve BAT) gösterilmiştir. Böylece CFC1 geninin kalbin dışa çıkış yollarının gelişmesine de katkıda bulunduğu desteklenmiştir (2,17).

Kardiyak situsa bakılmaksızın tüm homozigotlarda kardiyak anomaliler gösterilmiştir. En sık BAT ve ciddi ASD'ler olup, ÇÇSV, AVSD, VSD'ler görülmektedir (51).

Multifaktöriyel Hastalıkların Kalıtım Genetiği (35)

Sık görülen insan hastalıklarının çoğunda kalıtımın rolü vardır. Miyokard enfarktüsü, konjenital kalp hastalıkları, diyabet, Alzheimer hastalığı, kanser ve akıl hastalığı yaklaşık her üç kişiden ikisinin yaşamında morbiditeye veya erken mortaliteye neden olur.

Bu hastalıklar bazı ailelerde tek bir gendeki bir mutasyon nedeniyle oluşsalar da genel olarak tek gen hastalıkları değildir. Aksine bu hastalıklar bir ya da daha fazla lokustaki genotipi ve hastalık sürecini, tetikleyen, hızlandıran, alevlendiren çeşitli çevresel etkileri içeren bir dizi yatkınlık faktörü arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucudur. Bu

durumda ailelerde hastalık oluşumu basit mendelyen kalıtım şekillerinden birine uymaz; bunun yerine karmaşık veya multifaktöriyel bir kalıtım şeklini izlediği söylenir.

Konjenital kalp hastalıkları heterojen bir gruptur, bazı vakalarda tek gen veya kromozomal mekanizmayla ve bazılarında da rubella enfeksiyonu veya maternal diyabet gibi teratojen etkisiyle oluşurlar. Nedeni genellikle bilinmez ve vakaların çoğunun multifaktöriyel kaynaklı olduğuna inanılır.

Tablo III. CFC1 Genin Mutasyonları (2)

334C → T R112C	Kompleks kardiyak anomaliler, sağda olan mide intestinal malrotasyon
552delC G17del	Dekstrokardi, BAT, akciğerlerin sol izomerizmi transvers karaciğer, polispleni, intestinal malrotasyon
552delC G17del1	Dekstrokardi, BAT, akciğerlerin sağ izomerizmi, bilateral superior vena kava, sağda olan mide, aspleni
562C → T R189C	Sol atriyal izomerizm ile kompleks kardiyak anomaliler VSD, polispleni
232C → T R78W	Kompleks kardiyak anomaliler, ÇÇSV, komplet AV kanal total anormal pulmoner venöz dönüş anomalisi, PDA, akciğerlerin sağ izomerizmi, intestinal malrotasyon, aspleni
232C → T R78W	Sol atriyal izomerizm, mitral kapağın displazisi, sol ventriküler çıkış yolu anormallikleri, akciğerlerin sağ izomerizmi, ekstrahepatik bilier atrezi, polispleni
232C → T R78W	Dekstrokardi, BAT, tek atriyum, VSD
232C → T R78W	Dekstrokardi, ASD, VSD, PDA, hipoplastik arkus aorta
232C → T R78W	Membranöz VSD,

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı kliniğinde izlenen hastalar ile Sosyal Sigortalar Kurumu Çocuk Hastanesi ve Doktor Sami Ulus Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesinde izlenen hastalar üzerinde yapılmış olup Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülmüştür. Çalışmaya başlanmadan önce Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan 10.07.2006 tarihinde onay alınmıştır.

Çalışma Grubu:

Bu çalışma 0-16 yaş arası siyanotik doğumsal kalp hastalığı olan 107 olguda yapılmıştır. Şubat 2005 ile Kasım 2006 tarihleri arasında sağlık kurumlarına başvuran hastalarda tanıları kesinleştiği tarih sırasına göre kan örnekleri alınarak CFC1 gen polimorfizmi açısından araştırılmıştır.

Hastalar, %80'i Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesine başvuran hastalardan %20'si ise diğer hastanelerden alınan hastalardan oluşmaktadır.

Tanılarına göre olguların sınıflandırılması:

Büyük arter transpozisyonu: 18 olgu

Çift çıkımlı sağ ventrikül : 18 olgu

Fallot tetralojisi : 34 olgu

Situs İnversus Totalis : 12 olgu

Dekstrokardi : 10 olgu

Diğer : 15 olgu

(Trikuspit atrezisi, hipoplastik sol kalp, total anormal pulmoner venöz dönüş anomali)

Kontrol grubu olarak, 0-16 yaş arası pediatrik kardiyoloji bölümüne başvuran sağlıklı veya masum üfürüm saptanan kardiyak incelemeleri normal bulunan 100 olgu çalışma kapsamına alınmıştır.

YÖNTEM

Hastaların tanısı aşağıdaki yöntemlerle konulmuştur:

- 1- Her hastadan iyi bir anamnez alınarak, ayrıntılı fizik inceleme, gerekli olan hastalara ileri laboratuvar tetkikleri uygulanmıştır (Abdominal USG, CT, MR gibi).
- 2- Elektrokardiyogram, telekardiyogramlar ve tam kan sayımları rutin laboratuvarlardan elde edilmiş ve değerlendirilmiştir.
- 3- Ekokardiyogramlar, General Electric Medical Systems firmasının ViVid 7 cihazı ile uzman pediatrik kardiyolog tarafından yapılmıştır.
- 4- Hemodinamik çalışma ve anjiyokardiyogramlar uzman pediatrik kardiyolog tarafından yapılmıştır.

5- Hastaların kesin tanısı yukarıdaki incelemelerin ışığında Pediatrik Kardiyoloji konseyinde konulmuştur.

Hastaların yapılan anjiyokardiyografilerinde, sağ femoral ven, gerekli olgularda sağ femoral artere perkütan teknikle girilerek uygun kılıflar (sheath) yerleştirildikten sonra yine uygun kateterler ile vena kava inferior yolu ile sağ atriyum, sağ ventriküle, patent foramen ovale varlığında sağ atriyumdan sol atriya, aorta yolu ile sol ventrikül ve aortaya, ayrıca pulmoner artere girilebilen olgularda pulmoner artere geçilerek basınç kayıtları ve kan örnekleri alındı. Sağ ventrikül, sol ventrikül, aorta ve vena kava superior enjeksiyonları yapılarak sine-anjiyokardiyogramlar ve nefrogramlar alındı.

İki boyutlu renkli doppler ekokardiyografi ile 3 ve 5 megahertz probalar kullanılarak subkostal, parasternal, uzun ve kısa aks, apikal 4 boşluk ve suprasternal pozisyonlarda incelemeler yapıldı. Parasternal uzun aks pozisyonunda M-mode ile interventriküler septum sistolik-diyastolik kalınlık, sol ventrikül sistolik ve diyastolik çapı, sol ventrikül arka duvar sistolik-diyastolik kalınlıklar ölçüldü. Ejeksiyon fraksiyonu (EF), fraksiyonel kısalma (FK) otomatik olarak hesaplandı. Çıkan, inen aorta ve pulmoner arter doppler akım hızları, mitral ve trikuspid E-A (diyastolik fonksiyonlar) oranları, aorta/sol atriyum, aorta/pulmoner arter ölçümleri yapıldı.

Tanısı kesinleşen tüm olgulardan 2 cc EDTA'lı tüpe kan alınmış, alınan kanlar -30 °C'de derin dondurucuda saklanmış ve Tıbbi Genetik Anabilimdalı tarafından CFC1 gen polimorfizmi restriksiyon analizli PCR tekniği ile araştırılmıştır.

- 1- Araç ve gereçler
- 2- Kullanılan kimyasal maddeler
- 3- Genetik çalışma

1- Araç ve Gereçler

- DNA Thermal Cyclers 480 (MWG)
- Mikrof j (Nüve DT 024)
- Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Sigma ve LKB)
- Ultraviyole ışık kaynağı (LKB)
- Hassas terazi (AND-ER-182A)
- Vorteks (Assistent)
- Etüv (Nüve)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Mikro Pipetler (Biohit, Proline)

2- Kullanılan kimyasal maddeler

- EZ-DNA DNA izolasyon kiti (Dr. Zeydanlı, Türkiye)
- Primer sentezleri (Biotech, Almanya)
- PCR tamponu (Bioron, Almanya)
- dNTP karışımı (Bioron, Almanya)
- Taq DNA polimeraz (Bioron, Almanya)
- MgCl₂ (Bioron, Almanya)
- Sma I restriksiyon enzim ve tamponu (Bioron, Almanya)

- Agaroza (Sigma, ABD)
- Tris baz (Sigma, ABD)
- Borik asit (Sigma, ABD)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit) (Sigma, ABD)
- Sükröz (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)
- PBR322 Moleküler ağırlık belirteci (Amresco, Almanya)

Kullanılan tamponlar

PCR’da kullanılan tampon:

- Tepkime Tamponu (10X)
 - 25 mM MgCl₂
 - Taq Polimeraz (5 ünite/µl) Tampon
 - dNTP (10X)= Her bir deoksiribonükleotidden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 10 mM

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon:

- Agaroza %3.5’l
- 3.5 g agaroz
- 100 ml 1X TBE

TBE tamponu (10X)

- 108 g Tris Base
- 55 g Borik Asit
- 9.3 g EDTA

Toplam hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı.

TBE tamponu (0.5X)

- 14 ml 10X TBE tamponu
- 13.5 µl Etidyum bromür

Toplam hacim distile su ile 280 ml'ye tamamlandı.

Yükleme tamponu

- % 0.25 Bromfenol Mavisi
- % 40 (w/v) süktroz

Etidyum bromür

- 10 mg Etidyum Bromür
- 1 ml distile su

Primerler

Hedef bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri aşağıda belirtildiği gibidir.

CFC1 R78W (232 C-T) polimorfizmini belirlemek için;

İleri primer 5' CTC CAG TCA TTT CGG AGA GG 3'

Geri primer 5' CAA AAT GCT CTC CTT GGA TTT T 3'

primerler sentezletildi.

Fotoğraf çekimi Canon Powershot G5 ile yapıldı.

3-Genetik Yöntem

DNA Saflaştırılması

Çalışma kapsamına giren hasta ve kontrol gruplarına ait kanlar EDTA'lı tüplere alındı. Kan örneklerinden hemen izolasyon yapılmayacak ise -30° C'de bekletilip daha sonra test kitinin öngördüğü şekilde izole edildi (EZ DNA).

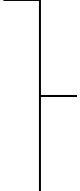
PCR ve Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

DNA'nın PCR ile Çoğaltılması

CFC1 geni R78W (232 C-T) polimorfizminin hedef bölgelerini çoğaltılması için seçilen primerlere göre PCR'ın koşulları aşağıda belirtildiği gibidir.

Belirlenmiş primer çifti için; PCR tüpünde son hacim 50 µl olup içeriği şu şekildedir: her iki çift primerden 0.6 µl, MgCl₂ (25 mM) 8 µl, dNTP (10 mM) 2 µl, PZR tamponu 5 µl, Taq DNA polimeraz (5 U / 50 µl) 0.3µl, DNA 5 µl (250 ng), 34.1µl distile su.

PCR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle ayarlandı.

Başlangıç Denatürasyonu;	94 °C' de 5 dk	(1 Döngü)
Denatürasyon aşaması;	94 °C' de 15 sn	
Hibridizasyon aşaması;	60 °C' de 15 sn	
Sentez (Uzama) aşaması;	72 °C' de 30 sn	
Son sentez aşaması;	72 °C' de 7 dk	(1 Döngü)

PCR için hazırlanan karışım 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Bu şekilde elde edilen tepkime karışımı otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tüm PCR'larda negatif kontrol olarak DNA içermeyen steril su kullanıldı.

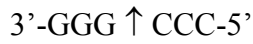
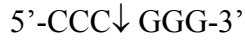
Çoğaltılmış DNA'ların Elektroforezde Değerlendirilmesi

PCR sonucu oluşan DNA'ları yürütmek için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 10 µl PCR ürünü 2 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 90 voltta 90 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Ultraviyole lamba altında PCR'da kullanılan primer çiftlerine göre oluşan DNA bantları incelendi. CFC1 geni R78W (232 C-T) polimorfizmi için 194 bp'lik 1 adet bant gözlemlendi.

PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

CFC1 geni R78W (232 C-T) polimorfizmini tanımlamak için, özgül primerler kullanılarak çoğaltılan 194 bp'lik hedef gen bölgesi Sma I restriksiyon enzimi ile kesildi.

Hinf I restriksiyon enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir:



Deneyin Yapılışı:

0.2 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü, 1.6 µl tampon, 10 ünite Sma I restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 37°C'lik etüvde bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası tüplerden alınan 8 µl kesim ürünü ile 3 µl Bromfenol mavisi ile karıştırılarak %3'lük agaroz jele yüklendi. %3'lük agaroz jelde PBR322 moleküler ağırlık belirteci ve enzim kesimi yapılmamış PCR ürünü eşliğinde 45 dakika 90 volt sabit akımda yürütülüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekildi.

BULGULAR

Yüzyedi siyanotik hastanın 49'u kız, 58'i erkek' ti. Kontrol grubunun 45'i kız 55'i erkekti. Hastaların yaş aralığı 0 – 16 yaş, yaş ortalaması 4 ± 4.8 , kontrollerin yaş aralığı 0 – 16 yaş, yaş ortalaması 3.5 ± 3.2 idi.

Kontrol gruplarında fizik incelemede hiçbir anomali saptanmadı. Hasta grubunda iki hastada kalp dışı anomali saptandı. Fallot tetrolojili (Şekil 5,6,7) bir hasta özafagus atrezisi tanısı almıştı. Çift çıkımlı sağ ventrikülü olan bir olguda ek anomali olarak sakral agenezisi ve nörojenik mesane mevcuttu. Diğer hasta ve kontrol gruplarında ek anomali yoktu.

Hastaların özgeçmişlerinde prenatal teratojenlerle ilgili bir öykü alınamadı. Soygeçmişlerinin incelenmesinde anne baba akrabalığı hasta gruplarının dokuz tanesinde birinci dereceden (dört Fallot tetrolojisi, iki büyük arter transpozisyonu, bir çift çıkımlı sağ ventrikül, iki situs inversus totalis), üç hastada uzak akrabalık (bir çift çıkımlı sağ ventrikül, bir dektrokardili, bir trikuspit atrezi) olarak saptandı. Toplam akrabalık oranı %11.2 olarak bulundu.

Hastaların büyümeleri incelendiğinde beş hastada üç persentil altında büyüme geriliği görüldü. Bu beş hastada, iki Fallot tetrolojisi, bir büyük arter transpozisyonu, bir

Çift ıkımlı sağ ventrikül, bir situs inversus totalis saptandı. Hastaların çoğunluğu 3-25 persentil civarında büyüme gösteriyordu.

Hastaların elektrokardiyogramlar (EKG) ve telekardiyogramları incelendiğinde, hastalıklar ile uyumlu bulgular elde edildi. Fallot tetrolujili olgularda EKG’de sağ aks, sağ ventrikül hipertrofisi telekardiyogramlarında, pulmoner konus çöküklüğü, azalmış akciğer vaskülaritesi, 10 olguda kardiyomegali saptandı. Büyük arter transpozisyonlu olgularda EKG’de sağ aks, sağ ventrikül hipertrofisi; telekardiyogramlarında artmış akciğer vaskülaritesi, dört olguda da kardiyomegali saptandı. Çift ıkımlı sağ ventrikülü olan olguların hepsinde EKG’de sağ aks, sağ ventrikül hipertrofisi, telekardiyogramlarında akciğer damarlanmasında artış, iki olguda ise kardiyomegali bulundu. Dekstrokardili olguların EKG’lerinde D1’de P dalgaları negatif, normal aks, telekardiyogramlarında akciğer vasklariteleri normal, kalp apeksi sağda, üç olguda kardiyomegali görüldü. Situs inversus totalisli olguların hepsinde, EKG’lerinde normal aks, D1’de P negatifliği, telekardiyogramlarında iki olguda akciğer vaskülaritesi azalması, mide, kalp apeksinin sağda, karaciğerin solda yerleştiği, iki olguda pulmoner konusun çökük olduğu görüldü. Trikuspit atrezili olguların EKG’lerinde sol aks, sol ventrikül hipertrofisi; telekardiyogramlarında kardiyomegali ve akciğer vaskülaritesi artışı saptandı. Hipoplastik sol kalp olgularında EKG’de sağ aks, sağ ventrikül hipertrofisi, telekardiyogramlarında akciğer vaskülaritesi artışı, üç olguda kardiyomegali görüldü. Total anormal pulmoner venöz dönüşlü olguların EKG’lerinde sağ aks, sağ ventrikül hipertrofisi telekardiyogramlarında akciğer vaskülaritesi artmış ve kardiyomegali görüldü.

Büyük arter transpozisyonu olan bir olguda mezokardi ve visseral situs inversus bulunmaktaydı. Situs inversus totalis tanısı konulan üç olgunun ikisinde düzeltilmiş transpozisyon (atriyoventriküler–ventriküloatriyal diskordans), diğerinde ise çift çıkımlı sağ ventrikül ve büyük arter transpozisyonu bulunmaktaydı (Şekil 8-13).

Dekstrokardili olguların birinde tek ventrikül, ikisinde çift çıkımlı sağ ventrikül, birinde büyük arter transpozisyonu, birinde çift çıkımlı sağ ventrikül (Şekil 14) ve hipoplastik sol kalp, birinde büyük arter transpozisyonu ve çift çıkımlı sağ ventrikül saptandı. Çalışmaya alınan hastalar ve kontrol grubu CFC1 geninin R78W polimorfizmi açısından incelendiğinde her iki grupta da bu polimorfizm saptanmadı.

CFC1 geninin en sık görülen polimorfizmi olan R78W (232C→T) polimorfizminde 78. kodondaki arjinin triptofana, 232. aminoasit olan sitozin, timine dönüşmüştür (Şekil 2).

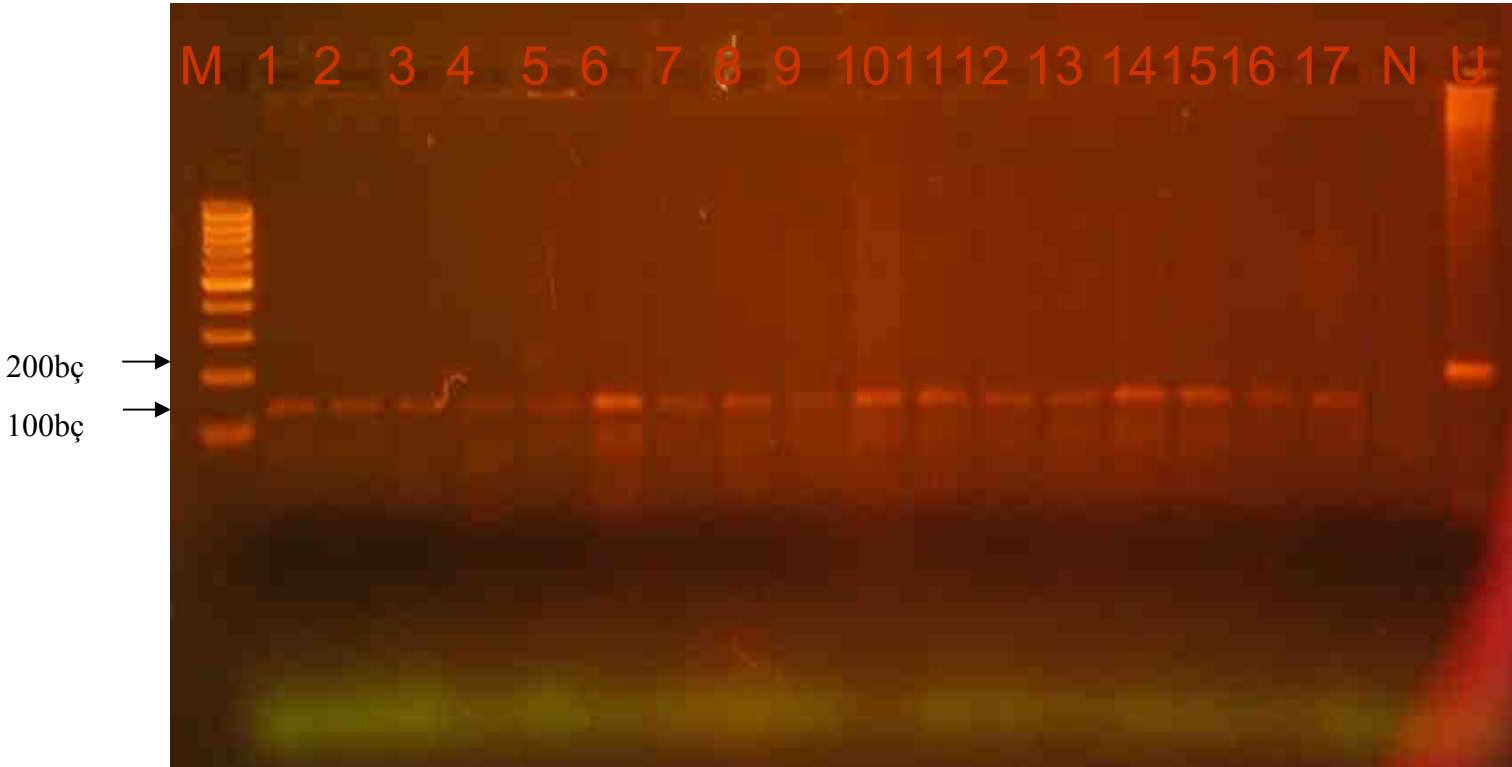
CTCCAGTCATTTTCGGAGAGGTGACTGGGAGCGCCGAGGGCTGGGGGCCGGAG
GAGCCGCTCCCCTACTCC **C** GGGCTTTCGGAGAGGGTAAGTTGCAGCGCTGCC
CACAAAATCCGGGGCGTCATCTCAGTCTGCGGACTCAGAGTTTAGGACCT
GAGAATATGTAGGATAAATTCAGGATAAAATCCAAGGAGAGCATTTTG

Arjinin	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Triptofan	W	TGG

CFC1 R78W 232 C-T
5-CGG-3 (Arjinin) – TGG (Triptofan) Missense mutasyon

Şekil 2. CFC1 geninde 3.ekson 3.intron

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 194 bç uzunluğunda amplifikasyon ürünü elde edildi. PCR ürünü SmaI restriksiyon enzimi ile kesildi. Hem yaban hemde mutant genotipe sahip olan bireyler enzim için tanıma bölgesine sahipti. Enzimle kesim sonrası oluşan ürün agaroz jele yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jelin fotoğrafı çekildi. Enzim kesim ürünleri jelde yürütülmesini takiben oluşan bantlar incelendiğinde yaban tip genotipe sahip olan bireylerde yaklaşık yaklaşık 123+71 bç büyüklüğünde bant izlendi. Mutant bireylerde 194 bç büyüklüğünde bant izlenmesi gerekiyordu fakat bizim çalışmamızda gözlenmedi (Şekil 3 ve 4).



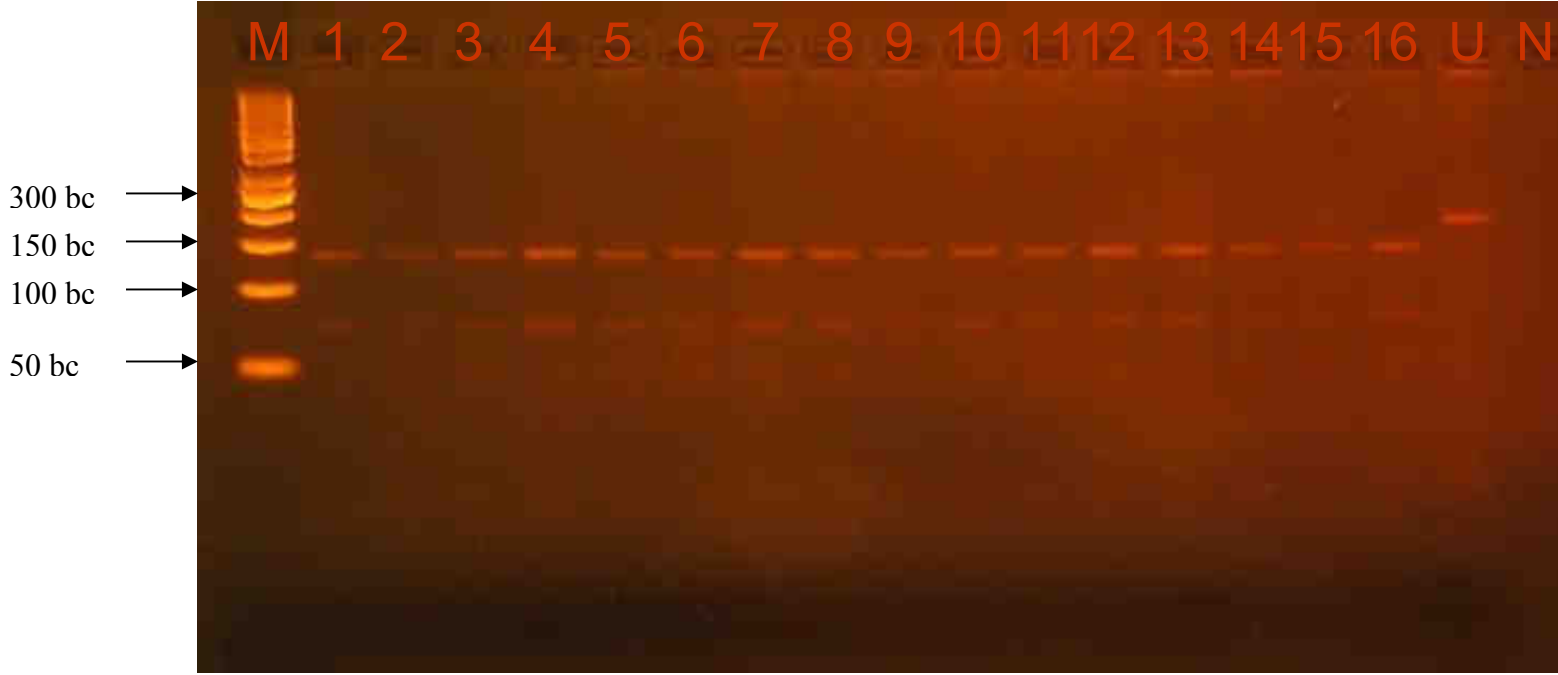
M-100 baz çifti (bç)

U- Uncut (194 bç)

1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17 Wild Type Hastalar (123 +71 bç)

N-negatif kontrol

Şekil 3. *CFC1 R78W 232 C-T (Hasta)*



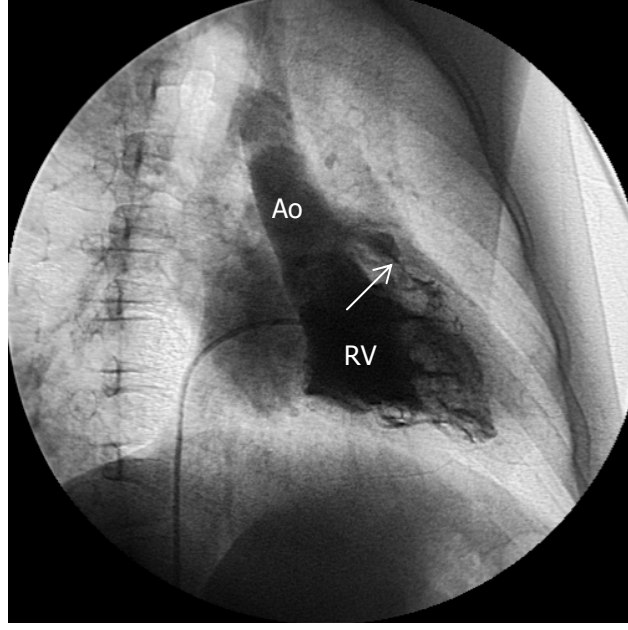
M-50bç

1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16 Wild type hastalar (123 +71 bç)

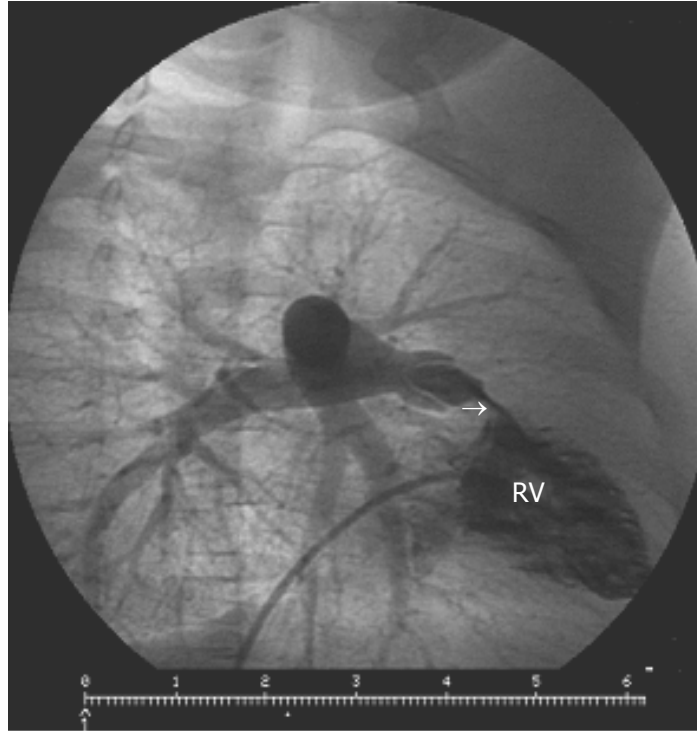
U- Uncut (194 bç)

N-negatif kontrol

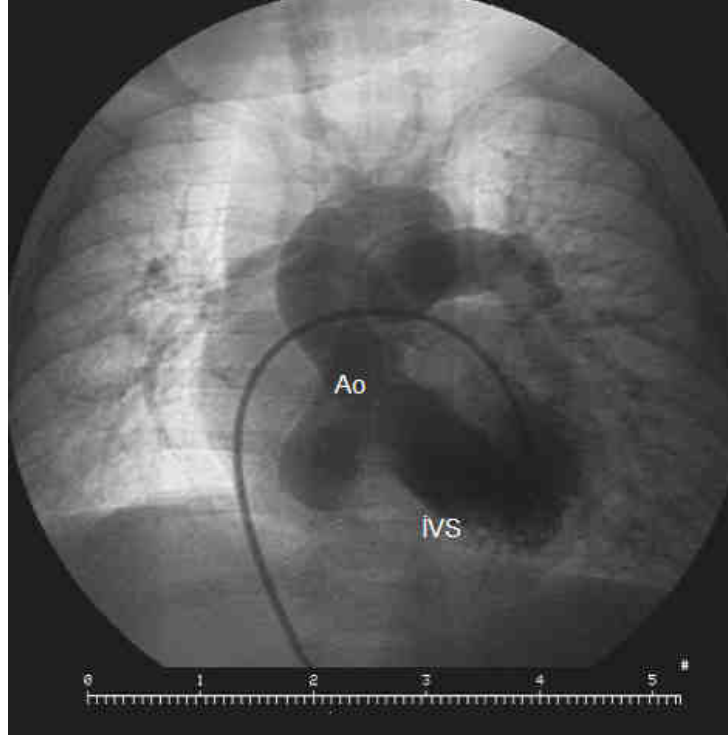
Şekil 4. *CFC1 R78W 232 C-T (Kontrol)*



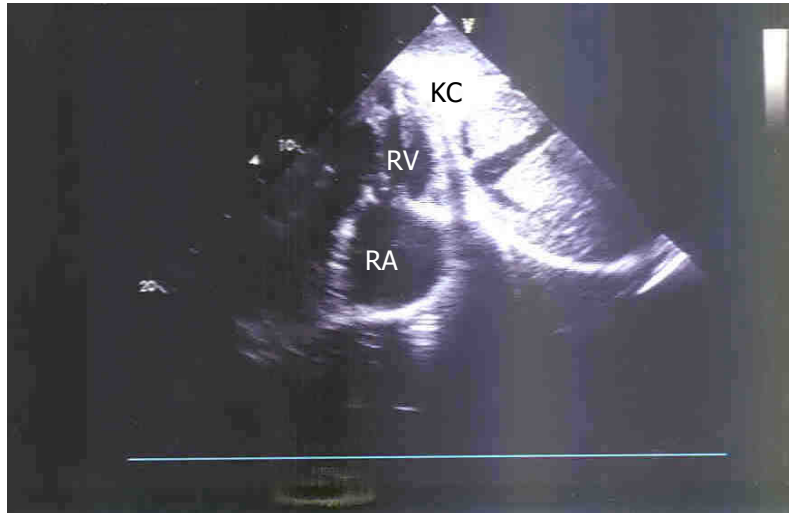
Şekil 5. Fallot tetrololojisi olan hastanın sağ ventriküle kontrast madde enjeksiyonu sonrasında aortun dolduğu, pulmoner arterin infundubuler bölgede dar olduğunun anjiyografi görüntüsü



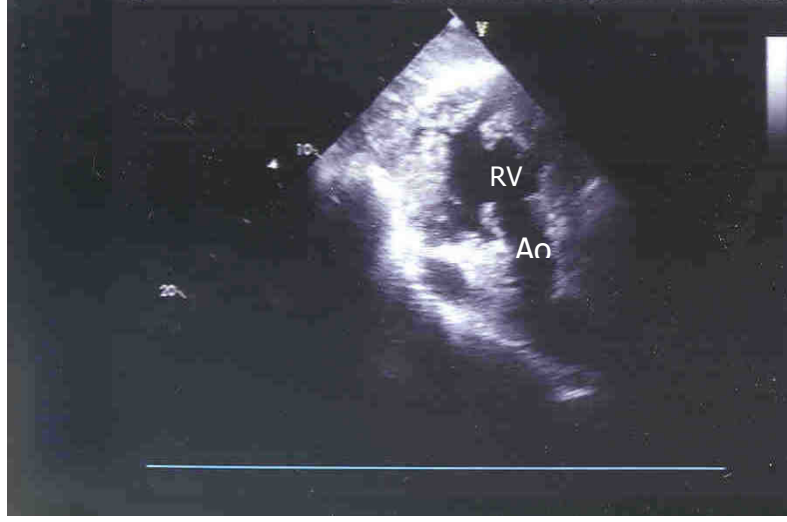
Şekil 6. Fallot tetrolojili hastanın sağ ventriküle kontrast madde enjeksiyonu sonrasında pulmoner arterin dolduğu ve infundubuler bölgede daraldığının anjiyografi görüntüsü



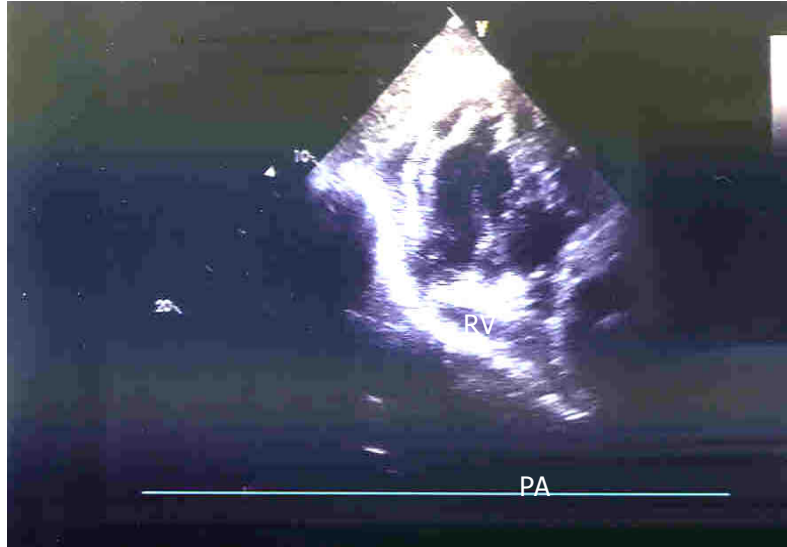
Şekil 7. Fallot tetrolojili hastada sol ventriküle kontrast madde enjeksiyonu sonrasında aortanın dekstropozisyonunun anjiyografi görüntüsü



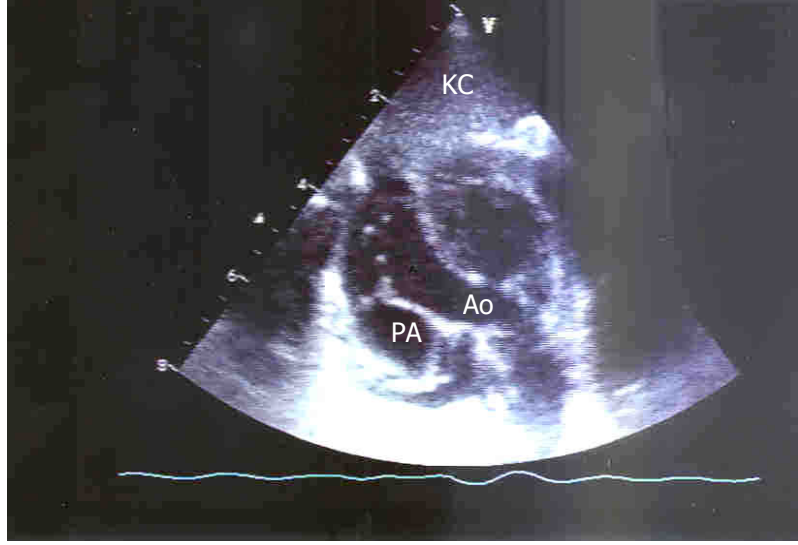
Şekil 8. Situs inversus totalisli hastanın sol tarafta karaciğer, sağ tarafta olan kalp apeksinin ekokardiyografi görüntüsü



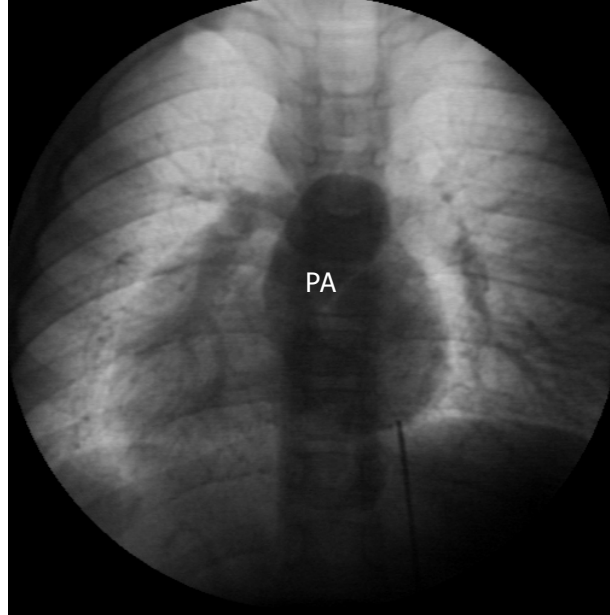
Şekil 9. Situs inversus totalis ve çift çıkımlı sağ ventrikülü olan hastada sağ ventrikülden çıkan aortanın ekokardiyografi görüntüsü



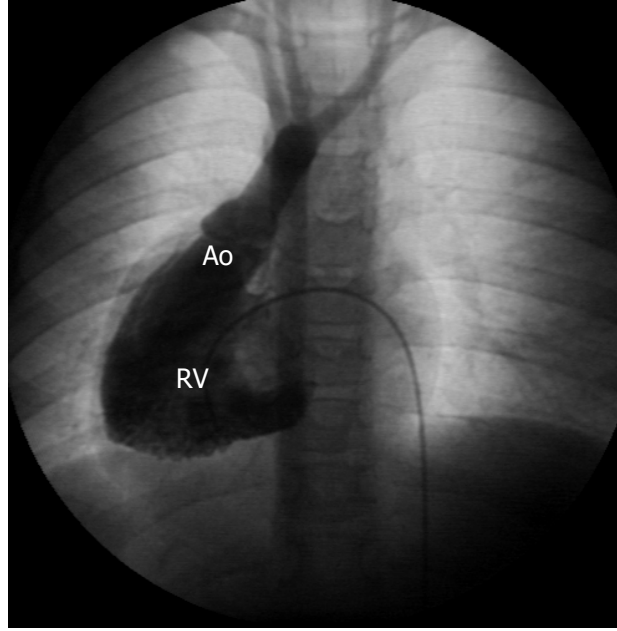
Şekil 10. Situs inversus totalis ve çift çıkımlı sağ ventriküllü hastanın sağ ventrikülden çıkan pulmoner arterin ekokardiyografi görüntüsü



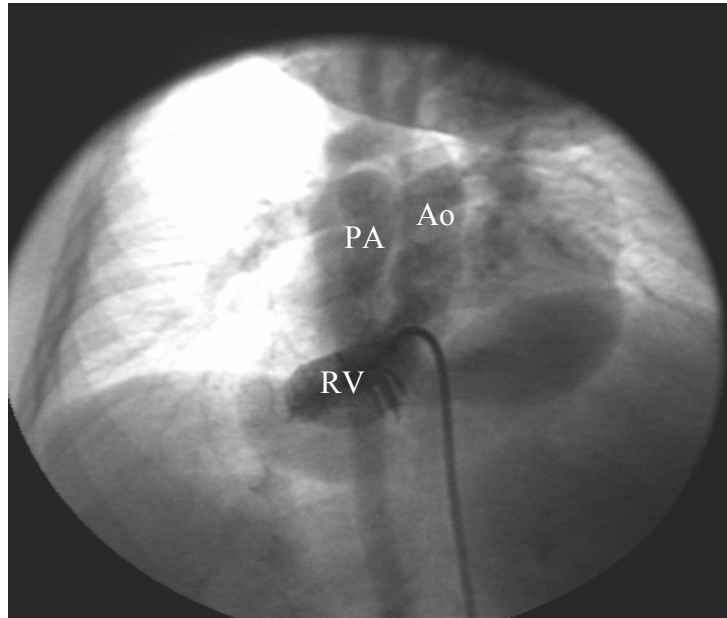
Şekil 11. Situs inversus totalisi ve büyük damar transpozisyonu olan hastanın kalp apeksi sağda, karaciğer solda, aortun sağından ve arkasından çıkan pulmoner arterin ekokardiyografi görüntüsü



Şekil 12. Situs inversus totalis ve büyük arter transpozisyonu olan hastanın sol ventrikül kontrast madde enjeksiyonu sonrasında sol ventrikülden çıkan pulmoner arteri anjiyografi görüntüsü



Şekil 13. Situs inversus totalis ve büyük arter transpozisyonu olan hastanın sağ ventrikül kontrast madde enjeksiyonu sonrasında kalp apeksi sağda, sağ ventrikülden çıkan aortun anjiyografi görüntüsü



Şekil 14. Dekstrokardi ve çift çıkımlı sağ ventriküllü hastada sağ ventriküle kontrast madde enjeksiyonu sonrasında sağ ventrikülden birlikte çıkan aortanın ve pulmoner arterin anjiyografi görüntüsü

TARTIŞMA

Polimorfizm kavramı mutasyon gibi genetik materyaldeki değişikliği gösterir. Herhangi bir lokusta toplumdaki sıklığı %1'den fazla olan iki tane yaygın allel varsa bu lokusun polimorfizm sergilediği söylenir. Polimorfizm genetik değişikliği gösterir, fakat çoğu zaman mutasyonda olduğu gibi fenotipik değişikliklerle sonlanmaz. Polimorfik değişiklikler toplumda yaygın olarak gördüğümüz değişikliklerdir, nadir allel oranı 0.01'dir. Bu araştırmada, çalışmaya alınan 107 hasta ve 100 kontrol grubunda, CFC1 geninin R78W polimorfizmi araştırıldı ve bu polimorfizm hasta ve kontrol grubunda saptanmadı.

Yapılan çalışmalarda, farelerde cfc1 geninin homozigot mutasyonlarının visseral lateralite defektlerine ve kompleks kardiyak malformasyonlara yol açmakta olduğu bildirilmiştir (17). CFC1 embriyolojik gelişim sırasında konoturunkusun gelişmesi için önemli bir role sahiptir. EGF-CFC proteinleri nodal sinyalizasyonda da önemli bir rol oynamaktadır (17).

Litaratürdeki bir çalışmada 64 BAT, 22 çift çıkımlı sağ ventriküllü toplam 86 hasta (heterotaksisi olmayan) çalışılmış, çift çıkımlı sağ ventrikülü olan Afrika kökenli bir Amerikalı bir hastada CFC1 geninin R78W polimorfizmi bulunmuştur. Yine bu çalışmada R78W polimorfizmi, Avrupa kökenlilerde saptanmazken, Afrika kökenli Amerikalılarda

%3 oranında saptanmıştır. Ayrıca Afrika kökenli Amerikalılarda %13.6 oranında bu polimorfizm taşıyıcılığı saptanmıştır (17).

Bizim çalışmamızda heterotaksisi olmayan BAT 18 olgu ve çift çıkımlı sağ ventriküllü 18 olguda bu polimorfizm bulunmamıştır.

Başka bir çalışmada; criptik homozigot farelerin yarısında (22/49) visseral organların situs inversus olduğu, homozigotların yaklaşık yarısında (24/50) ise dekstroardi olduğu gösterilmiştir (51).

Bizim çalışmamızdaki situs anomalisi olan toplam 22 olguda bu polimorfizm gösterilememiştir. Situs inversus ve dekstroardi ile birlikte büyük arter transpozisyonu ve / veya çift çıkımlı sağ ventrikül anomalisi olan olgularda da polimorfizm çıkmaması ilginç bulunmuştur. Çünkü daha önce yapılan bir çalışmada, 7 criptik mutantın histolojik analizinde, 5'inde BAT, birinde çift çıkımlı sağ ventrikül, bir mutantta da normal konfigürasyon görülmüştür (16). Yine bir çalışmada sol-sağ aks anormalliği ve kompleks kardiyak anomalisi olan 144 hastanın 5'inde R78W polimorfizmi, 4 hastada da CFC1 geninin diğer mutasyonları gösterilmiştir (2). Bizim çalışmamızda CFC1 geninin diğer mutasyonları çalışılmamıştır.

Hasta grubunu farklı patolojilere göre ayırdığımız zaman her gruba düşen hasta sayısı az olmakla birlikte hepsi siyanotik doğumsal kalp hastalıklarıdır ve her bir hastalık

birden fazla anomali içermesi nedeni ile kompleks kardiyak bir hastalık grubunu oluşturmaktadır. Amaç kompleks siyanotik DKH'nı bir grup altında toplamaktır. 107 olgu toplumda oldukça iyi bir grup oluşturmakla birlikte hiçbir olguda R78W polimorfizminin saptanmaması bizim toplumumuzda bu polimorfizmin az görüldüğü fikrini desteklemektedir. Bu polimorfizmin hep Afrika kökenlilerde saptanması bir raslantı değildir.

CFC1 geninin mutasyonları başlangıçta lateralite defektli hastalarda kompleks kardiyak defektlerin varlığında gösterilmiştir. Fakat daha sonra yapılan araştırmalarda çift çıkımlı sağ ventrikül ve BAT gibi izole kalp hastalıklarında da gösterilmiştir (36). CFC1 geni dışa çıkım yolunun gelişiminde de katkıda bulunur. Literatürde yapılan bir çalışmada heterotaksisi olmayan çeşitli kardiyak bulguları olan toplam 167 hasta içerisinde Afrikalı izole atriyal septal defektli bir hastada R78W polimorfizmi saptanmıştır (36). Çalışmamıza atriyal septal defektli hasta grubu alınmamıştır. Siyanotik olmayan hastalar bu çalışmanın devamında araştırılacak hasta grubunu oluşturacaktır.

Literatürde son yapılan bir çalışmada lateralite defektli konjenital kalp hastalığı olan 42 hasta ve 250 kontrol grubunda CFC1 geninin N21H, R47Q, ve R78W polimorfizmi çalışılmış. N21H polimorfizmi beyaz ırkta %7.9, Afrika kökenli Amerikalılarda %5, kontrol grubu olarak Afrika kökenli Amerikalılarda %9 oranında, R47Q polimorfizmi beyaz ırkta %5.3, Afrika kökenli Amerikalılarda %10, kontrol grubu olarak Afrika kökenli Amerikalılarda %13 oranında, R78W polimorfizmi Asya

kökenlilerde %25, Meksika kökenlilerde %4.5, kontrol grubu olarak Afrika kökenli Amerikalılarda %3, Asya kökenlilerde %2 oranında saptanmış, beyaz olgularda görülmemiştir (48). Bu çalışmada da görüldüğü gibi R78W polimorfizmi Afrika kökenli Amerikalılarda ve Asya kökenlilerde daha sık oranda saptanmaktadır.

Literatürdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi CFC1 geninin R78W polimorfizmi toplumda sık görülmemektedir. Bizim çalışmamız da bununla uyumlu bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada bu polimorfizmin saptanmaması, genetik heterojeniteye bağlı olabilir. Özellikle CFC1 geninde farklı mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmış olabilirler (allel heterojenite), ya da diğer bir neden ise farklı genlerden meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmış olabilir (lokus heterojenitesi) (35). Aynı zamanda CFC1 geninin bu missense mutasyonu çok önemli bir mutasyona yol açmamış olabilir. Bu mutasyonun bizim olgularda görülmemesi, mutasyonun bu hastalıklarla doğrudan ilişkili olmamasından da kaynaklanabilir.

Kalp hastalıkları multifaktöriyel hastalık gurubundandır (35). Çalışma grubuna aldığımız kalp hastalıklarının bu mutasyon dışında başka etkilerle meydana gelmiş olma olasılığı vardır. (Örneğin radyasyon, ilaçlar, konjenital enfeksiyonlar vb) (3). Ayrıca genetik hastalıklarda etnik köken de farklılık gösterebilir. Nitekim daha önce pozitiflik saptanan olgular çoğunlukla Afrika kökenli Amerikalılardır (17).

Bu alışmada R78W polimorfizminin saptanmaması literatür bulguları ile paralellik göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda gerek DKH’da gerekse kontrol gruplarında R78W polimorfizmi beyazlarda hiç saptanmamıştır. Genel olarak Türk toplumundaki sıklık daha geniş olgu serileri yapılarak araştırılabilir. Ancak doğumsal kalp hastalıklarında farklı polimorfizmlerin araştırılmasının genetik etiyolojiyi bulmada daha uygun olacağı düşünölmektedir. Literatürdeki lateralite defektleri ve kompleks kardiyak anomaliler ile ilgili araştırmaların meta-analizleri yapılarak bu konuda daha anlamlı sonuçlara ulaşılabilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- 1- Doğumsal siyanotik kalp hastalığı ve situs anomalisi olan 107 olgu ile 100 kontrol olguda CFC1 geninin R78W polimorfizmi araştırılmıştır.
- 2- Hastaların 49'u kız, 58'i erkek, yaş ortalamaları ise 4 ± 4.8 olarak bulunmuştur.
- 3- Olguların 34'ü Fallot tetralojisi, 18'i BAT, 18'i ÇÇSV, 12'si situs inversus totalis, 10'u dektrokardi , 15'i diğer (Trikuspit atrezisi, hipoplastik sol kalp, total anormal pulmoner venöz dönüş anomalisi) olarak gruplandırılmıştır.
- 4- Kesin tanıya ulaşmada fizik inceleme, ekokardiyografi ve anjiyokardiyografi yöntemleri kullanılmıştır.
- 5- CFC1 geninin R78W polimorfizmi restriksiyon analizli PCR tekniği ile araştırılmıştır.
- 6- 107 hasta ve 100 kontrol olguda CFC1 geninin R78W polimorfizmi saptanmamıştır.
- 7- Toplumumuzda ve dünyada CFC1 geninin R78W polimorfizmi sık görülmemesi yalnız Afrika kökenli Amerikalılar ve Asya kökenlilerde saptanmış olması bu mutasyonun belki doğumsal kalp hastalıkları ile doğrudan ilişkili olmadığını düşündürmüştür.

ÖZET

DOĞUMSAL SİYANOTİK KALP HASTALIKLARINDA VE SİTUS ANOMALİLİ HASTALARDA CFC1 GENİNİN R78W POLİMORFİZM SIKLIĞI

GİRİŞ VE AMAÇ: Doğuştan gelen çoğu kalp anomalilerin kalp gelişimi sırasında ve sol-sağ aks belirleme sürecindeki hatalarla ilgili olduğunun kanıtları bulunmaktadır. Doğumsal kalp anomalilerinin %8'inin genetik bir defektle ilgisi saptanabilir. EGF-CFC gen ailesinden olan CFC1 geni sol sağ aksın gelişiminden sorumlu bir gendir. Ayrıca heterotaksisi olmayan kompleks kalp hastalığı olan (BAT ve ÇÇSV) bireylerde CFC1 gen mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışmada kompleks kalp hastalığı olan dekstrotrokardi ve situs inversus totalisli hastalarda CFC1 geninin R78W polimorfizm sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Klinik değerlendirme, ekokardiografi ve anjiyokardiografi ile kesin tanı konulan 0-16 yaş grubu 107 olgu, 0-16 yaş grubu 100 normal çocuk çalışmaya alınmıştır. CFC1 geninin R78W polimorfizmi restriksiyon analizli PCR tekniği ile değerlendirilmiştir.

SONUÇLAR: 107 hasta grubunda, 100 kontrol grubunda CFC1 geninin R78W polimorfizm sıklığı çalışılmış, hasta ve kontrol gruplarında bu polimorfizm gösterilememiştir.

TARTIŞMA: Bu çalışmada CFC1 geninin R78W polimorfizminin hasta ve kontrol grubu olarak 207 olguda hiç gösterilememiş olması gen sıklığının toplumda az saptanması ve kompleks kalp hastalığı olan çocuklarda ise daha çok Afrika kökenli Amerikalılarda bulunması, literatür bulgularını desteklemektedir. Daha önce yapılmış araştırmalarda siyanotik ve kompleks kalp hastalıklarında R78W polimorfizminin çok az gösterilmiş veya hiç gösterilememiş olması belki de bu mutasyonun bu hastalık grubu ile doğrudan ilişkili olmadığını düşündürmektedir. İleride daha geniş hasta grupları ile yapılacak çalışmalar ve/veya meta-analizlerle bu ilişki daha açıklık kazanabilecektir.

Anahtar kelimeler: CFC1 gen, heterotaksi, criptik

SUMMARY

CONGENITAL CYANOTIC CARDIAC DISEASES AND R78W POLYMORPHISM FREQUENCY OF CFC1 GENE IN PATIENTS WITH SITUS ANOMALY

INTRODUCTION AND PURPOSE: There is evidence that most congenital cardiac anomalies are associated with failures during heart development or process of determination of left-right axis. Association with a genetic defect can be detected in 8% of congenital heart anomalies. CFC1 gene, which belongs to EGF-CFC gene family, is a gene responsible for left-right axis. Also, mutation of CFC1 gene has been detected in individuals with complex cardiac disease without heterotaxia (BAT and DORV). The purpose of this study is to determine the R78W polymorphism frequency of CFC1 gene in congenital cyanotic cardiac diseases and patients with dextrocardia and situs anomaly.

METHOD: Hundred and seven patients with cyanotic congenital heart disease at the age range of 0-16 years were included in the study. The diagnoses were confirmed by clinical and laboratory (ECG, chest x-ray, echocardiography, cardiac catheterisation) examinations. Age matched 100 normal children were included as controls. R78W polymorphism of CFC1 gene was evaluated using PCR with restriction analysis technique in both groups.

RESULTS: R78W polymorphism frequency of CFC1 gene could not be shown in patient and control groups.

DISCUSSION: In this study, R78W polymorphism of CFC1 gene was not detected in 207 events which include patient and control groups. This result is parallel to the findings of the literature which indicates that this polymorphism is rare in caucasians and usually detected in African-Americans and Asians. As this mutation is rarely detected in congenital cardiac defects, it may not be directly related to the etiology of this disease group. Following investigations with larger groups and/or meta-analysis of the previous studies will bring solutions to this issue.

Key words: CFC1 gene, heterotaxia, cryptic

KAYNAKLAR

1. Anderson HR, Baker JE, Macartney JF, Rigby ML, Shinebourne EA, Tynan M. Molecular biology and cardiac development. In Pediatric Cardiology, 2. baskı, Churchill Livingstone London, Edinburgh, NY, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 2002, s:215-33
2. Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Şaplakoğlu U. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left- right laterality defects. Nat Genet. 26: 365-369, (2000)
3. Behrman ER, Congenital Heart Disease, In Nelson Textbook of Pediatrics, Kliegman J (ed), 16. baskı. WB Saunders, Philadelphia, 2000, s: 1362-1411
4. Belmont JW, Mohapatra B, Towbin JA. Molecular genetics of heterotaxy syndromes. Curr Opin Cardiol 19: 216-220, (2004)
5. Brennan J, Norris DP, Robertson EJ. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. Genes Dev. 16: 2339-2344, (2002)
6. Hoffmann JIE. The Circulatory System Embriology (Cardiac Looping), In Rudolph's Pediatrics. Abraham M Rudolph, Colin D Rudolph (eds), McGraw-Hill, 21. baskı, USA, 2002, s:1745
7. Burdine R, Schier AF. Conserved and divergent mechanisms in left- right axis formation. Genes Dev. 14:763-776, (2000)

8. Campione M, Steinbeisser H, Schweickert A, Deissler K, Lowe LA, et al. The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126:1225-1234, (1999)
9. Capdevilla J, Vogan KJ, Tabin C, Izpisua Belmonte JC. Mechanisms of left right determination in vertebrates. *Cell* 101:9-21, (2000)
10. Ciccodicola A, Dono R, Obici S, Simeone A, Zollo M, Persico MG. Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 8:1987-1991, (1989)
11. Colas J, Schenwolf GC. Subtractive hybridization identifies chick – *Cripto*, a novel EGF-CFC ortholog expressed during gastrulation, neurulation and early cardiogenesis. *Gene* 255:205-217, (2000)
12. Collignon J, Varlet I, Robertson EJ. Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* 381:155-158, (1996)
13. Dono R, Scalera L, Pacifico F, Acampora D, Persico MG, Simeone A. The murine *cripto* gene: expression during mesoderm induction and early heart morphogenesis. *Development* 118:1157-1168, (1993)
14. Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123:37-46, (1996)
15. Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JJ, Neill CA, Perry L. Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington infant study. *Am J Epidemiol* 121:31-36, (1985)

16. Gaio U, Schweickert A, Fischer A, Garrat AN, Müller T, Özçelik C. A role of the cryptic gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr Biol.* 9:1339-1342, (1999)
17. Goldmuntz E, Bamford R, Karkera JD, Cruz J, Roessler E, Muenke M. CFC1 Mutations in Patients with Transposition of the Great Arteries and Double-Outlet Right Ventricle. *Am J Hum Gen* 70:776-780, (2002)
18. Gristman K, Zhang J, Cheng S, Heckscher E. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97:121-132, (1999)
19. Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish. (*Danio rerio*). *Development* 123:1-36, (1996)
20. Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet.* 3:103-113, (2002)
21. Harvey RP. Links in the left-right axial pathway. *Cell* 94:273-276, (1998)
22. McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueck M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114:61-73, (2003)
23. Kathiriyia IS and Srivastava D. Left-Right Asymmetry and cardiac looping. *Am J Med Genet.* 97:271-279, (2000)
24. Kinoshita N, Minshall J, Kirschner MW. The identification of two novel ligands of the FGF receptors by a yeast screening method and their activity in *Xenopus* development. *Cell* 83:621-630, (1995)

25. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv in Cancer Res* 77:25-79, (2000)
26. Kosaki K, Casey B. Genetics of human left-right axis malformation. *Cell Dev. Biol.* 9: 89-99, (1998)
27. Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82:803-814, (1995)
28. Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, and Mercola M. Asymmetries in H/K ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111:77-89, (2002)
29. Logan M, Pagan-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ. The transcription factor Pitx2 mediates situs specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94:307-317, (1998)
30. Lowe LA, Supp DM, Sampath K, Yokoyama T, Wright CV, Potter SS. et al Conserved left-right asymmetry of nodal expression and the direction alterations in murine situs inversus. *Nature* 381:158-161, (1996)
31. Meno C, Gristman K, Ohishi S, Ohfuji Y, Heckscher E, Mochida K et al. Mouse lefty-2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell* 4:287-298, (1999)
32. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, et al. Lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* 94:287-297, (1998)

33. Minchiotti G, Parisi S, Liguori G, Signore M, Lania G, Adamson ED, Lago CT, Persico MG. Membrane-anchorage of Cripto protein by glycosylphosphatidylinositol and its distribution during early mouse development. *Mech Dev* 90:133-142, (2000)
34. Nugent EW, Plauth WH, Edwards JE, Williams WH. The pathology, pathophysiology, recognition and treatment of congenital heart disease. In *Hurst's The Heart* (R.C. Schlant and R. Alexander eds), New York: McGraw-Hill, 1994, s:1773-1777
35. Nussbaum R, McInnes R, Willard H, Tibbi Genetik (çeviri). Nobel Kitap Evleri, İstanbul. 6.Baskı, 2005, s:17-87
36. Özçelik C, Avragim NB, Panek A, Gaio U, Geier C, Lange P. Mutations in the EGF-CFC gene cryptic are an infrequent cause of congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 27:695-698, (2006)
37. Park MK, Specific Congenital Heart Defects, In *Pediatric Cardiology for Practitioners*, Troxler GR (ed) 4.baskı, Elsevier, Philadelphia, 2002, s:129-235
38. Ramsdell AF, Bernanke JM and Trusk TC. Left-right lineage analysis of the embryonic *Xenopus* heart reveals novel framework linking congenital cardiac defects and laterality disease. *Development* 133:1399-1410, (2006)
39. Ramsdell AF, and HJ Yost. Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *Trends Genet.* 14:459-465, (1998)
40. Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, et al. *Pitx2* determines left- right asymmetry of internal organs in vertebrates. 394:545-551, (1998)
41. Salomon DS, Bianco C, Ebert AD, Khan NI, Santis MD, Normanno N. The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. *Endoc Rel. Cancer* 7:199-226, (2000)

42. Schier AF, Neuhauss SC, Helde KA, Talbot WS, Driever W. The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development* 124:327-342, (1997)
43. Schier AF, Shen MM. Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403:385-389, (2000)
44. Shen MM, Schier AF. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. The EGF-CFC gene family. *Reviews*. 16: 303-309, (2000)
45. Shen MM, Wang H, Leder P. A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF- related gene expressed in axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* 124:429-442, (1997)
46. Strahle U, Jesuthasan S, Blader P, Garcia-Villalba P, Hatta K, Ingham PW. One-eyed pinhead is required for development of the ventral midline of the zebrafish (*Danio rerio*) neural tube. *Genes Funct.* 1:131-148, (1997)
47. Tabin CJ, Vogan KJ. A two-cilia model for vertebrate left-right axis specification. *Genes Dev.* 17:1-6, (2003)
48. Tierney ES, Marans Z, Rutkin M, Chung W. Variants of the CFC1 gene in patients with laterality defects associated with congenital cardiac disease. *Cardiol Young* 17:268-274, (2007)
49. Uchida T, Wada K, Akamatsu T, Yonezawa M, Noguchi H, Mizoguchi A, et al. A novel epidermal growth factor- like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Com* 266:593-602, (1999)
50. Wolpert L. Development of the asymmetric human. *European Review* 13, Supp. No. 2:97-103, (2005)

51. Yan Y, Gristman K, Ding J, Burdine RD. Conserved requirement for EGF- CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes Dev.* 13: 2527-2537, (1999)
52. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. İnsan Embriyolojisi. 6.Baskı. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul. 2002, s:63-79, 349-369
53. Zhang J, Talbot WS, Schier AF. Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as permissive EGF- related ligand required during gastrulation. *Cell* 92:241-251 (1998)