



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

NON-SENDROMİK KONJENİTAL KALP HASTALARINDA
GENOMİK KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

BÜŞRA ÖZKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF.DR. SEVİLHAN ARTAN

Eskişehir
2021



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**NON-SENDROMİK KONJENİTAL KALP HASTALARINDA
GENOMİK KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

BÜŞRA ÖZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

Eskişehir

2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Büşra ÖZKAN'ın Yüksek Lisans olarak hazırladığı

“Non-Sendromik Konjenital Kalp Hastalarında Genomik Kopya Sayısı Varyasyonlarının Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

Tarih:

... / ... / ...

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / ... tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Selma METİNTAŞ

Enstitü Müdürü

ÖZET

NON-SENDROMİK KONJENİTAL KALP HASTALARINDA GENOMİK KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Konjenital Kalp Hastalığı (KKH); kalpte doğumda var olan yapısal veya fonksiyonel anomalilerdir ve toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlar olup, yaklaşık %1-1.2 yenidoğanı etkiler. Her ne kadar KKH'nin altında yatan nedenler nispeten az anlaşılmış olsa da genetik ve çevresel faktörlerin etkisi olduğu düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar genetik ve çevresel nedenlerin KKH vakalarının %20-30'unda gözlendiğini göstermiştir. Bu nedenle KKH'nin multifaktoriyel kalıtmı olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca ailesel izole KKH ile ilgili veriler, KKH'nin genetik temelini de olduğunu ortaya koymaktadır. İzole/non-sendromik KKH tek gen veya kromozomal sendromlar dışında kalan, etiyopatogenezi henüz net olarak aydınlatılamamış, en yaygın KKH formudur. Bununla birlikte, izole/non-sendromik konjenital kalp hastalıklarının sadece % 20'si açıklanabilmektedir. Farklı DNA tamir mekanizmalarının neden olduğu submikroskopik değişiklikler; kopya sayısı varyasyonları (KSV) olarak tanımlanır ve konjenital anomaliler, sendromik/non-sendromik entelektüel yetersizlik ve otizm gibi birçok hastalığın oluşumunda rol oynar. Kromozom mikroarray analizi (KMA); tüm genomu yüksek rezolüsyonda inceleyerek dengesiz anomalilerin yanısıra varyantlarının da tespiti için kullanılan, genom çapında bir tarama tekniğidir. KSV'ler, izole/non-sendromik KKH etiyolojisinin %3-10'luk kısmından sorumludur. Non-sendromik KKH'li sporadik hastaların KMA ile incelenmesi, bu patolojilere katılan yeni genleri tanımlamak için klasik aile çalışmalarına bir alternatiftir. Sınırlı sayıda çalışmada, izole/non-sodromik KKH'li hastalarda bu yöntemi kullanarak ilişkili birkaç KSV tanımlanmıştır. Çalışmalar, submikroskopik KSV'lerin doğrudan veya genetik risk faktörleri olarak hastalık patogenezinde önemli bir rol oynadığına dair kanıt sağlamıştır. Türk popülasyonunda izole/non-sendromik KKH ile ilişkili KSV'lerin sıklığı ile ilgili veri bulunamamıştır.

İzole/non-sendromik KKH tanısı alan olgularda, KSV'lerin incelenmesi, frekanslarının belirlenmesi ve olgularda saptanan bu KSV'lerin KKH tipleri arasındaki

dağılımları ile hastalık gelişimi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla toplam 64 (40 olgu, 24 kontrol) olgunun periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde aCGH+SNP yöntemi ile KSV'ler analiz edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda toplam 33 olguda 62 KSV'nin 28 tanesi kayıp, 34 tanesi kazanç olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda saptanan beş KSV'nin dört tanesi kayıp olup bir tanesi kazanç olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda KSV saptanan kontrol grubu ile araştırma grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.000243$).

Anahtar Kelimeler: Konjenital Kalp Hastalıkları, Kromozomal Mikroarray, Kopya sayısı varyasyonları

SUMMARY

EVALUATION OF GENOMIC COPY NUMBER VARIATIONS IN NON-SYNDROMIC CONGENITAL HEART PATIENTS

Congenital Heart Disease (CHD) is a structural or functional anomalies present at birth and it is the most common congenital malformations in the population, affecting about 1-1.2% newborns. Although the underlying causes of CHD remains relatively poorly understood, and it has been thought to have both genetic and environmental contributions. Epidemiological studies have shown that genetic or environmental causes are were in 20-30% of CHD cases. Therefore, it is accepted that CHD has a multifactorial inheritance. Isolated/ nonsyndromic CHD is the most prevalent form of CHDs in which etiopathogenesis has not been clearly elucidated except for single gene or chromosomal syndromes. Data on familial isolated CHD cluster reveal the genetic basis of CHD. However, only 20% of isolated/nonsyndromic congenital heart diseases can be explained. Alterations of different DNA repair mechanisms causes submicroscopic changes which called copy number variants (CNV). CNVs plays a critical role during the various disease development which include congenital anomalies, syndromic/nonsyndromic intellectual insufficiency and autism. Chromosome microarray analysis (CMA) is a genome-wide screening technique that is used for the detection of unbalanced anomalies as well as copy number variants by examining the whole genome at high resolution. CNVs are responsible for 3-10% of the etiology of isolated/nonsyndromic CHDs. The study of sporadic patients with nonsyndromic CHD with CMA is an alternative to classic family studies to identify new genes involved in these pathologies. A limited number of studies have identified several associated CNVs using this method in patients with isolated/nonsyndromic CHD. Studies provided evidence that submicroscopic CNVs play an important role for disease pathogenesis, either directly or as genetic risk factors. No data could be found about the frequencies of isolated/nonsyndromic CHD related CNVs in Turkish population.

In patients diagnosed with isolated / nonsyndromic CHD, in order to examine CNVs, to determine their frequencies, and to evaluate the distribution of these CNVs

among CHD types and their effects on disease development, DNA samples obtained from the peripheral blood samples of 64 (40 cases, 24 controls) CNVs were analyzed by the aCGH + SNP method.

As a result of our study, 28 of 62 CNVs in a total of 33 cases were found to be lost and 34 were found to be gain. 4 of 5 CNV detected in the control group were loss and 1 was found as gain. As a result of the statistical analysis, a significant difference was found between the control group with CSV and the study group. ($p = 0.000243$).

Key words: Congenital Heart Disease, Chromosomal Microarray, Copy Number Variation

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	v
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI	4
2.1.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Tanımı ve Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Sınıflandırılması	5
2.1.2.1. Septal defektler	7
2.1.2.1.1. Atrial septal defektler	7
2.1.2.1.2. Ventriküler septal defektler	7
2.1.2.2. Konotrunkal anomaliler.....	8
2.1.2.3. Atriyoventriküler kanal defektleri (AVKD)	9
2.1.2.4. Sol ventrikül çıkım yolu darlıkları	10
2.1.2.5. Sağ ventrikül çıkım yolu darlıkları	11
2.1.2.6. Pulmoner venöz dönüş anomalileri.....	12
2.1.2.7. Heterotaksi.....	12
2.1.2.8. Kompleks anomaliler	12
2.1.3. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezi.....	12
2.1.4. İzole/Non Sendromik Konjenital Kalp Hastalıkları.....	13
2.2. KOPYA SAYISI VARYASYONLARI (KSV)	14
2.2.1. Kopya Sayısı Varyasyonları Etki Mekanizmaları	15
2.2.1.1. Kantitatif etki (Dozaj):	15
2.2.1.2. Genlerin bölünmesi	15
2.2.1.3. Regülatör bölgelerin etkilenmesi:	15
2.2.1.4. Heterozigosite kaybı:	16
2.2.2. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Sınıflandırılması ve Kullanılan Veritabanları.....	17
2.2.2.1. DGV:.....	18
2.2.2.2. DECIPHER:	18
2.2.2.3. OMIM:	18
2.2.3. Kopya Sayısı Varyasyonlarını Saptama Yöntemleri	18
2.2.3.1. Kromozom mikrodizin analizi (KMA)	18

2.3. KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA KSV	24
2.3.1. Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında KSV	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. OLGU/KONTROL GRUBU	28
3.2. KULLANILAN ALET VE MALZEMELER	30
3.2.1. Kullanılan Aletler	30
3.2.2. Kullanılan Malzemeler.....	30
3.3. YÖNTEM	31
3.3.1.DNA İzolasyonu.....	31
3.3.2. Genomik DNA'nın Niceliksel ve Niteliksel Analizi	32
3.3.3.Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi	32
3.3.4.Genomik DNA'nın Floresan İşaretlemeşi	34
3.3.5.Etiketlenmiş gDNA'nın Temizlenmesi	35
3.3.6.Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması.....	35
3.3.7.Hibridizasyon Öncesi Hazırlık	36
3.3.7.1.Etiketlenmiş gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması	36
3.3.8.Mikroarray Hibridizasyonu	37
3.3.9.Hibridizasyon Sonrası Yıkama İçin Hazırlık	38
3.3.10.Hibridizasyon Sonrası Yıkama	38
3.3.11.Mikroarray Taratılması	38
3.3.12.Kromozom Mikroarray Analizi	39
3.3.12.1.Kopya sayısı varyasyonlarının değerlendirilmesi	39
3.3.13.İstatistiksel Analiz:	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Olguların Demografik Özellikleri	42
4.2. Olguların Klinik Özellikleri	42
4.3. Kontrol bireyleri ve KKH Olgularında Saptanan Varyantlar.....	43
4.3.1. Saptanan varyantların delesyon-kazanç durumları	45
4.3.2. DGV ile örtüşen varyantlar	45
4.3.3. Gen İçermeyen Varyantlar	50
4.3.4. DGV İle Örtüşmeyen Ve Gen İçeren Varyantlar	51
4.3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	52
5. TARTIŞMA.....	53
5.1. Çalışmamıza Ait Demografik ve Klinik Verilerinin Literatürle Karşılaştırılması	53
5.2.Çalışmamızda Saptanan Varyant Verilerinin Literatür Verileri ile Karşılaştırılması.....	53

5.2.1.DGV veritabanıyla örtüşen KSV'ler.....	54
5.2.2.DGV veritabanıyla örtüşmeyen KSV'ler	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
EKLER DİZİNİ	83
EK-1: ETİK KURUL	83
ÖZGEÇMİŞ	86

TABLO DİZİNİ

TABLO 2.1. KKH Sınıflandırılması	6
TABLO 2.2. VSD'de Görülen KSV'ler	8
TABLO 2.3. Konotrunkal Anomalilere İlişkin Bildirilen KSV'ler	9
TABLO 2.4. AVKD'lerde Görülen KSV'ler	10
TABLO 2.5. Sol Ventrikül Çıkım Yolu Darlıklarında Görülen KSV'ler	11
TABLO 2.6. KSV'lerin ACMG'ye Göre Klinik Sınıflandırılması	17
TABLO 2.7. Array CGH Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları	21
TABLO 2.8. CGH Array, SNP Array ve aCGH+SNP Array'lerin Yöntemsel Karşılaştırılması	22
TABLO 2.9. Farklı Array Platformları İle Saptanabilen Genomik Anomaliler	24
TABLO 2.10. Non-Sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Saptanan KSV'ler	25
TABLO 3.1. Restriksiyon Kesim Karışımı (RKK)	33
TABLO 3.2. Restriksiyon Kesimi İçin PCR Programı	33
TABLO 3.3. DNA Denatürasyonu ve Fragmantasyonu İçin PCR Programı	34
TABLO 3.4. Floresan İşaretleme Karışımı (FİK)	34
TABLO 3.5. DNA Etiketlemesi İçin PCR Programı	34
TABLO 3.6. Hibridizasyon Karışım Tablosu	36
TABLO 3.7. Hibridizasyon İçin PCR Programı	37
TABLO 4.1. Olguların Cinsiyetlere Göre Dağılımı	42
TABLO 4.2. Kontrol Grubuyla Ortak Olarak Saptanan Varyantlar	44
TABLO 4.3. DGV'de Yer Alan ve Çalışmamızda Saptadığımız Polimorfik Varyantlar	45
TABLO 4.4. Gen İçermeyen Varyantlar	50
TABLO 4.5. DGV'de Yer Almayan ve Gen İçeren Diğer Varyantlar	51
TABLO 4.7. Toplam Saptanan Varyanta Göre Olgu/Kontrol Sayıları ve p Değeri	52
TABLO 4.8. DGV İle Örtüşmeyen Varyantların Olgu/Kontrol Sayıları ve p Değeri	52
TABLO 5.1. DGV Veritabanında ≥ 2 Olguda Saptanan KSV'ler	54

TABLO 5.2. Saptadığımız Polimorfik Olmayan KSV'lerin İçerdiği OMIM Genleri	62
TABLO 5.3. Çalışmamızın Literatür Verileri İle Karşılaştırılması	66

ŞEKİL DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. Atriyal Septal Defekt (ASD)	7
ŞEKİL 2.2. Ventriküler Septal Defekt (VSD)	8
ŞEKİL 2.3. Atriyovenriküler Kanal Defekti (AVKD)	9
ŞEKİL 2.4. Hipoplastik Sol Kalp Sendromu (HSKS)	10
ŞEKİL 2.5. Biküspit Aorta (BA)	11
ŞEKİL 2.6. Ebstein Anomalisi	12
ŞEKİL 2.7. KSV'lerin Yıllara Göre Artışı	15
ŞEKİL 2.8. Regülatör Bölge Etkilenmesi	16
ŞEKİL 2.9. (A) Bir Genin Heterozigosite Kaybı, (B) KSV'lerin Çift Vuruş Tek Vuruş Fenotipe Etkisi	16
ŞEKİL 2.10. Array CGH Yöntemi	20
ŞEKİL 2.11. (A) CGH Array İle (B) SNP Array Karşılaştırılması	23
ŞEKİL 3.1. A) 4X180K Mikroarray Slaytı İçin Contalı Lam, B) Mikroarray Slaytının Contalı Lam Üzerine Yerleştirilmesi, C) Hibridizasyon Haznesinin Sıkıştırılması	37 37 37
ŞEKİL 4.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Takip Formu	41
ŞEKİL 4.2. Hasta Grubunda Saptanan Kardiyak Defektler Grafiği	43
ŞEKİL 4.3. Varyant Sayılarının Olgulara Göre Dağılımı	44
ŞEKİL 5.1. Olgu 25'te Görülen 1q21.2 Bölgesinde Saptanan KSV'nin Mikroarray Sistemindeki Görüntüsü	56
ŞEKİL 5.2. Olgu 5 ve 21'de Görülen 9p12-p11.2 Bölgesinde, (A) Kazanç Olarak Saptanan, (B) Kayıp Olarak Saptanan KSV'lerin Mikroarray Sistemindeki Görüntüleri	58
ŞEKİL 5.3. Olgu 17'de Görülen 15q14 Bölgesinde Saptanan KSV'nin Mikroarray Sistemindeki Görüntüsü	59
ŞEKİL 5.4. Olgu 16'da Görülen 16p11.2 Bölgesinde Saptanan KSV'nin Mikroarray Sistemindeki Görüntüsü	60

ŞEKİL 5.5. Olgu 23'te Görülen 3q13.31 Lokusunda Saptanan KSV'nin Analiz
Sitemindeki Görüntüsü

64

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

KKH	:	Konjenital Kalp Hastalıkları
CGH	:	Congenital Heart Disease
KSV	:	Kopya Sayısı Varyasyonları
CNV	:	Copy Number Variation
KMA	:	Kromozom Mikrodizin Analizi
CMA	:	Chromosome Microarray Analysis
VSD	:	Ventriküler Septal Defekt
ASD	:	Atriyal Septal Defekt
HSKS	:	Hipoplastik Sol kalp Sendromu
BA	:	Biküspid Aorta
TOF	:	Fallot Tetralojisi
BAT	:	Büyük Arter Transpozisyonu
PDA	:	Patent Duktus Arteriyozus
PS	:	Pulmoner Stenoz
DORV	:	Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül
DOLV	:	Çift Çıkımlı Sol Ventrikül
AVKD	:	Antriyoventriküler Kanal Defekti
TPVDA9	:	Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi
PAPVDA	:	Parsiyel Venöz Dönüş Anomalisi
SNP	:	Tek Nükleotid Polimorfizm
DGV	:	Database of Genomic Variations DGV
DECIPHER	:	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
UCSC	:	University of California, Santa Cruz

NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
OMIM	:	Online Mendelian Inheritance in Man
ACMG	:	American College of Medical Genetics
aCGH	:	Array CGH
UPD	:	Uniparental Disomi
TE	:	Tris-EDTA
RKK	:	Restriksiyon Kesim Karışımı
FİK	:	Floresan İşaretleme Karışımı
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Cy3	:	Cyanine 3
Cy5	:	Cyanine 5
bç	:	Baz Çifti
μ l	:	Mikrolitre

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Toplumda oldukça sık görülen konjenital malformasyon grubu olan izole/non-sendromik KKH, tedavi ve izlem açısından hem hasta birey üzerinde hem de toplum üzerinde önemli bir sorun oluşturmaktadır (Zaidi & Brueckner, 2017). Terapötik ilerlemelere rağmen, KKH yüksek oranda uzun süreli morbidite ile ilişkilidir. Yeni doğanlarda ilk yıl içerisinde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (J. I. E. Hoffman, Kaplan, & Liberthson, 2004)(Van Der Linde vd., 2011). Sendromik KKH ile ilgili çok sayıda çalışma ve rutin uygulamalarda da araştırılmasına rağmen, izole/non-sendromik olgularda yapılan sadece birkaç genetik çalışma bulunmaktadır. Toplumdaki sıklığına rağmen, şimdiye kadar izole/non-sendromik KKH için bazı lokus ve aday genler tanımlanmış olsa da, genetik alt yapısının hala bilinmezliğini koruması, non-sendromik KKH'yi çalışılması gereken önemli alanlardan biri haline getirmektedir. Ailesel geçişin sık izlenmesi de bu hastalığın genetik altyapısını destekler niteliktedir (Pierpont vd., 2018). Kromozom mikrodizin analizi (KMA); genom çapında bir tarama tekniğidir. Tüm genomu yüksek rezolüsyonda inceleyerek dengesiz anomalilerin ve KSV'lerin tespiti için kullanılır (Erzurumluoğlu, 2018).

American College of Medical Genetics and Genomics, sendromik KKH için ilk basamak tanı testi olarak KMA kullanılmasını önermektedir (Manning & Hudgins, 2010). 2017'de yapılan geniş örneklem grubunu içeren çalışmada, sendromik KKH olan çocuklarda KMA aracılığıyla KSV oranının (% 63,2) yüksek olduğu, izole KKH'li çocuklarda da nispeten yüksek tespit oranda (% 17,9) rapor edilmiştir. Araştırmacılar KKH'li çocuklarda, özellikle sendromik KKH başta olmak üzere, non-sendromik KKH vakaları için de KMA'yı ilk basamak testi olarak önermişlerdir (Wu vd., 2017). Bunun yanı sıra 2016 yılında Kim ve ark, izole/non-sendromik KKH olgularında yaptıkları çalışmada olguların %12.2'sinde ortak KSV bölgeleri rapor edilmiştir (Kim vd., 2016). Ancak KMA'nın izole-non-sendromik KKH olgularında rutin olarak çalışabilmesi, yerel pratik ve finansal kısıtlamalara bağlıdır. Bu yöntemin rutin olarak kullanılabilmesi için o popülasyondaki KSV'lerin belirlenmesi ve tespit oranının ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Literatür verileri göz önünde bulundurulduğunda Türk toplumunda izole/non-sendromik KKH olgularında KSV analizine yönelik bir çalışma rapor edilmemiştir.

Bu nedenle izole/non-sendromik KKH tanısı alan olgularda, KMA yöntemi ile KSV'lerin değerlendirilmesinin hedeflendiği çalışmamız bilgilerimiz dahilinde ülkemizde non-sendromik KKH genetiği ile ilgili KSV verilerinin değerlendirileceği ilk araştırma niteliği taşımaktadır. Sonuçlar ile birlikte belirlenecek KSV'lerin hastalığın oluşumu ve klinik çeşitlilik üzerindeki etkisinin yanı sıra, KMA'nın non-sendromik KKH vakalarında rutin olarak kullanılabilirliği de değerlendirilecektir. Planladığımız araştırmanın araştırma soruları ile çalışmanın amaç ve hedefleri aşağıda özetlenmiştir:

Araştırma soruları:

1. Etiyolojide rol oynayan genler açısından normal olan izole/non-sendromik KKH olgularında saptanan rekürren KSV'lerde ortak bir genetik lokus belirlenebilir mi?
2. KMA'nın izole/non-sendromik KKH vakalarında rutin olarak kullanılması ne kadar efektiftir?
3. Belirlenen lokuslardaki genler KKH moleküler patolojisi ile ne kadar ilgilidir?

Çalışmanın amacı: Bugüne kadar saptanan literatür verileri doğrultusunda çalışmamızdaki temel amaç; izole/non-sendromik KKH tanısı alan olgularda, KMA yöntemi ile KSV'leri inceleyerek, frekanslarını belirlemek ve olgularda saptanan bu KSV'lerin KKH tipleri arasındaki dağılımları ile hastalık gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

Çalışmanın hedefleri:

1. İzole/non-sendromik klinik tanısı almış 40 olgu ve yaş ile uyumlu 24 kontrol bireyinde KMA yöntemiyle KSV'lerin belirlenmesi
2. Patojenik, olası patojenik ve önemi bilinmeyen varyant (VUS) saptanan olguların ebeveynlerinde varyantların değerlendirilmesi ve varsa klinik özelliklerinin birlikte değerlendirilmesi
3. Rekürren ve nadir KSV'lerin tespiti, hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırma yapılması

4. Olguların klinik verileriyle birlikte saptanan varyasyonların değerlendirilmesi, klinik ve prognostik açıdan öneminin belirlenmesi
5. Analizi yapılan hastalara ve aile bireyelerine genetik danışma verilmesi

Elde edilecek veriler ışığında multifaktöriyel kalıtım gösterdiği bilinen izole KKH'ların altında yatan moleküler etiyopatogenezin aydınlatılması KSV blgerinde lokalize olan genlerin bu malformasyon açısından ileri moleküler yöntemlerle değerlendirilmesine temel veri olarak ışık tutabilecektir. Bunun yanı sıra non-sendromik KKH formlarında etkili olan yeni genlerin tanımlanması, etkilenmiş bir çocuğa sahip çiftler için genetik danışmanlık verilmesi ve hastalığın önlenmesi için yapılan toplum sağlığına yönelik çalışmalara yardımcı olacaktır. Diğer taraftan, KKH etiyolojisinde olan genler açısından patojenik bir mutasyona sahip olmayan olgularda saptanacak KSV'lerin özelliklerine göre ebeveynlerin de değerlendirilmesi ve genetik danışma olarak bilgilendirilmeleri de rutinde uygulanan bir yaklaşım olmadığı için çalışmaya özgünlük katmakta olup, koruyucu hekimlik açısından da yararlı olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI

2.1.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Tanımı ve Epidemiyolojisi

Konjenital Kalp Hastalığı (KKH); kalpte doğumda var olan yapısal veya fonksiyonel anomalilerdir. Enfeksiyöz etiyolojilerden sonra KKH'ı infant mortalitesine en çok sebep olan durumdur. Konjenital kalp hastalıkları, ventriküler septal defekt (VSD), atriyal septal defekt (ASD), endokardiyal yastık defektleri, pulmoner venöz dönüş anomalileri, hipoplastik sol kalp, biküspid aorta, aort stenozu, pulmoner stenoz, fallot tetralojisi (TOF), büyük arter transpozisyonu (BAT), heterotaksi, ebstein anomalisi, triküspit atrezisi veya kompleks kardiyak anomalilerin de içerisinde yer aldığı bir hastalık grubudur. Bunlardan ASD, VSD, patent duktus arteriyozus (PDA), pulmoner stenoz (PS), foramen ovale apertum (FoA) basit defektler olarak tanımlanmakta ve genellikle iyi prognozla seyretmektedirler. Buna karşılık, fallot tetralojisi, hipoplastik sol kalp (HSKS), univentricular kalp, daha kompleks ve ağır KKH formlarıdır, uygun olması durumunda çok sayıda cerrahi girişimin gerektiği, uzun dönemdeki sonuçlarının net olarak ortaya konmadığı durumlardır. Olgular; dismorfik özellikler, gelişme ve büyüme geriliği, majör yapısal malformasyonlar gibi ekstrakardiyak klinik tablonun gözlemlendiği sendromik KKH veya diğer organ sistemlerinde belirlenebilen konjenital malformasyonları olmayan izole KKH olarak gruplandırılmaktadır (Fahed, Gelb, Seidman, & Seidman, 2013).

Konjenital kalp hastalıkları (KKH) toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlar olup, yenidoğanlar arasındaki sıklığı %1-1.2 dolaylarındadır (Zaidi & Brueckner, 2017). Toplumlar arasında değişkenlik göstermekle birlikte dünya genelinde her 1000 doğumdan 9'unda gözlenmekte, yani her yıl yaklaşık 1.35 milyon yenidoğanın tanı aldığı bilinmektedir (Fahed vd., 2013). Medikal ve cerrahi yaklaşımların gelişmesi, çok ağır KKH vakalarının bile sürvisinin artmasını sağlamakta ve aynı zamanda büyük çocuklar ile erişkinler arasındaki KKH prevalansının yaygınlığının artmasına büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır (J. I. E. Hoffman vd., 2004)(Van Der Linde vd., 2011). Olguların tümünün erken yaşlarda saptanamaması nedeniyle gerçek prevalansı belirlemek güçtür. Ancak, Kanada'da

yapılan bir çalışmada genel prevalans çocuklarda 13.1/1000 ve erişkinlerde de 6.1/1000 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca 2000-2010 yılları arasında KKH prevalansının çocuklarda %11, erişkinlerde de %57 arttığı belirtilmektedir (Marelli vd., 2014).

Gelişmekte olan ülkeler arasında KKH, iskemik kalp hastalığı veya inmeye (strok) nazaran kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı engelli yaşamın en büyük nedenlerinden biri olarak belirtilmektedir. Gelişmiş ülkelerde hastaların çoğunun başarılı operasyonlar geçirmelerinin yanısıra, çocuklarında kardiyak malformasyon gözlenme riskinin genel popülasyondan anlamlı derecede daha yüksek olmasının en büyük nedeninin genetik defektler olduğu bildirilmektedir (Sanchez-Castro vd., 2016). Dünya genelinde KKH insidansının yüksek olduğu bilinmektedir. Son yıllarda epidemiyolojik çalışmalar, klinik gözlemler ile moleküler genetikteki gelişmelerle birlikte konjenital kalp defekti etiyolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunmasına rağmen bu malformasyonların patogenezeine ilişkin bilgiler henüz çok sınırlıdır.

Birinci derece yakınında KKH öyküsü bulunan bireylerde risk, genel popülasyona oranla daha fazladır (Marelli, Mackie, Ionescu-Ittu, Rahme, & Pilote, 2007). KKH için monogenik bir çok örnek bildirildiği halde, kardeşlerdeki rekürrens riskinin nispeten düşük olmasının sebebi (%2.7) *de novo* mutasyonlar, multigenik kalıtım ve penetrans eksikliği ile açıklanabilir (Sifrim vd., 2016).

2.1.2. Sınıflandırılması

Konjenital Kalp Hastalıkları, 2008 yılında Botto ve ark.'larının Doğumsal Anomalileri Önleme Çalışmaları (NBDPS) için öne sürdüğü gelişimsel ve klinik bazlı etiyolojik sınıflandırma kullanılarak yapılmıştır. KKH'lar; septal defektler, konotrunkal anomaliler, antrioventriküler kanal defektleri, sol ventrikül çıkım yolu darlıkları, sağ ventrikül çıkım yolu darlıkları, pulmoner venöz dönüş anomalileri, heterotaksi ve kompleks anomaliler olmak üzere sekiz ana başlıkta sınıflandırılmıştır (Botto, Lin, Riehle-colarusso, Malik, & Correa, 2007). Tablo 2.1.'de KKH sınıflandırılması verilmiştir.

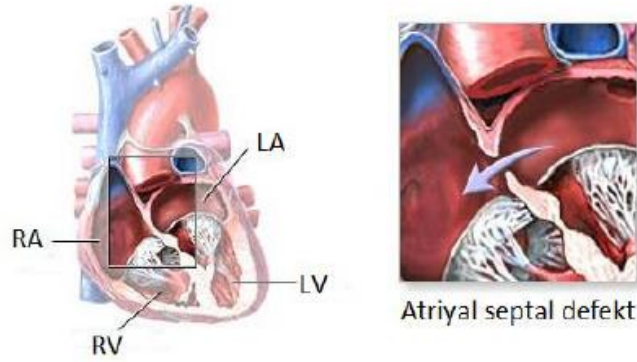
Tablo 2.1. KKH Sınıflandırılması

SEPTAL DEFEKTLER	Atrial Septal Defektler (ASD)
	Ventriküler Septal Defektler (VSD)
KONOTRUNKAL ANOMALİLER	TOF ve TOF varyantları
	Kesintili aortik arkus tip B
	DORV (Çift çıkımlı sağ ventrikül)
	DOLV (Çift çıkımlı sol ventrikül)
	d-TGA, c-TGA
	Konoventriküler septal defektler
	Trunkus arteriozus
ANTRİYOVENTRİKÜLER KANAL DEFEKTLERİ (AVKD)	Komplet AVKD
	Parsiyel AVKD
	Transizyonel AVKD
SOL VENTRİKÜL ÇIKIM YOLU DARLIKLARI	Hipoplastik sol kalp sendromu
	Biküspid aorta (BA)
SAĞ VENTRİKÜL ÇIKIM YOLU DARLIKLARI	Ebstein Anomalisi
PULMONER VENÖZ DÖNÜŞ ANOMALİLERİ	Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalileri (TAPVDA)
	Parsiyel Pulmoner Venöz Dönüş Anomalileri (PAPVDA)
HETEROTAKSİ	
KOMPLEKS ANOMALİLER	3 veya daha fazla anomalinin birlikte izlendiği konjenital kalp hastalıkları

2.1.2.1. Septal defektler

2.1.2.1.1. Atrial septal defektler

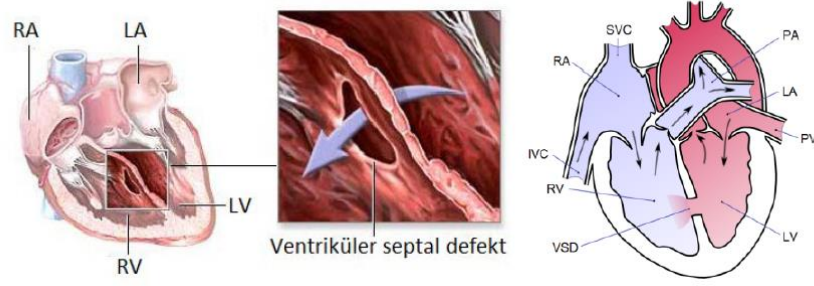
Atrial septal defekt (ASD), atriumları ayıran duvarın tam olarak kapanmamasındaki doğumsal bir kalp defektidir. Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Atriyal septal defektler en sık görülen konjenital kalp hastalıklarından biridir. Toplumda 1:1500 canlı doğumda görülmekte olup tüm KKH'ların %6-10'luk kısmını oluşturmaktadır (Theodoropoulos vd., 2018). ASD de görülen en sık KSV'ler 8p23.1 kromozomal lokusunda saptanmıştır (Fahed vd., 2013).



Şekil 2.1. Atriyal Septal Defekt (ASD). İnteratriyal septumdaki açıklığı gösteren şematik resim. LA, sol atrium; LV, sol ventrikül; RV, sağ ventrikül; RA, sağ atrium (Theodoropoulos vd., 2018)

2.1.2.1.2. Ventriküler septal defektler

Ventriküler septal defekt (VSD), kalbin sağ ve sol ventriküllerini ayıran duvarda oluşan defektir. Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Konjenital kalp hastalıklarının %20-40'ını oluşturan VSD'ler 1000 canlı doğumda 6 sıklığında izlenmektedir. Ventriküler interseptumu oluşturan membranöz, musküler, infundibular, atriyoventriküler ve inlet kısımlarının embriyonik dönemde gelişimi sırasında anormal gelişme veya füzyon hatalarına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Lopez vd., 2018). Tablo 2.2.'de VSD de görülen KSV'ler listelenmiştir (Fahed vd., 2013).



Şekil 2.2. Ventriküler Septal Defekt (VSD). İnterventriküler septumdaki açıklığı gösteren şematik resim. PA, pulmoner arter; LA, sol atrium; PV, pulmoner ven; LV, sol ventrikül; RV, sağ ventrikül; IVC, inferior vena kava; RA, sağ atriyum; SVC, süperior vena kava (Lopez vd., 2018)

Tablo 2.2. VSD’de Görülen KSV’ler (Fahed vd., 2013)

LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ
1q21.1	Kayıp, kazanç
4q32.3	Kazanç
8p23.1	Kayıp, kazanç
13q14.11	Kazanç
18q11.1-18q11.2	Kazanç

2.1.2.2. Konotrunkal anomaliler

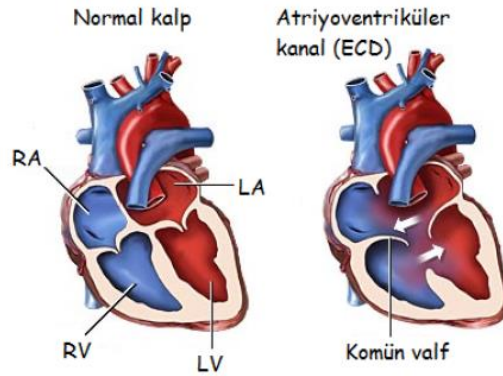
Konotrunkal anomaliler, Fallot Tetroljisi (TOF) ve TOF varyantları, kesintili aortic arkus tip B, DORV (Çift çıkımlı sağ ventrikül), DOLV (Çift çıkımlı sol ventrikül), d-TGA’lar, c-TGA’lar, Konoventriküler septal defektler ve Trunkus arteriozus’un dahil olduğu geniş bir KKH spektrumunu tanımlamaktadır. Sık izlenen KKH’lar olup tüm KKH’ların %10-12’sini oluşturduğu bildirilmektedir (Vaidyanathan, Kumar, Sudhakar, & Kumar, 2013). Konotrunkal anomalilere ilişkin bildirilen KSV’ler Tablo 2.3.’te özetlenmiştir (Fahed vd., 2013).

Tablo 2.3. Konotrunkal Anomalilere İlişkin Bildirilen KSV'ler

LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ
1q21.1	Kayıp, kazanç
3p25.1	Kazanç
4q22.1	Kazanç
5q35.3	Kazanç
8p23.1	Kayıp, kazanç
9q34.3	Kayıp
13q14.11	Kazanç
Xp22.2	Kazanç

2.1.2.3. Atriyoventriküler kanal defektleri (AVKD)

Şekil 2.3.'de gösterilen AVKD'ler, kalbin dört odacığını ayıran duvarın kötü şekillenmesi veya yokluğuyla karakterize bir KKH'dır. Kardiyak morfogenez aşamasında endokardiyal yastık gelişiminde ortaya çıkan hatalardan dolayı sık izlenen ve KKH'ların %4-5'inden sorumlu olduğu bilinen, toplamda 1000 canlı doğumda 0.19 sıklığında görülen anomalilerdir (Pugnaloni vd., 2020). Tablo 2.4.'de AVKD'lerde görülen KSV'ler listelenmiştir (Fahed vd., 2013).



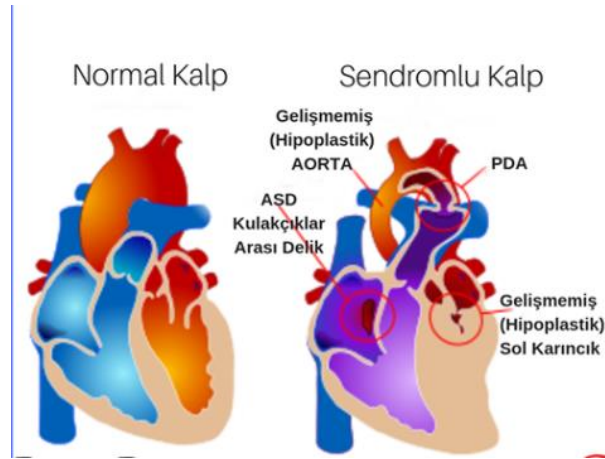
Şekil 2.3. Atriyoventriküler Kanal Defekti (AVKD) (Pugnaloni vd., 2020)

Tablo 2.4. AVKD’lerde Görülen KSV’ler

LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ
3q22.1-3q26.1	Kayıp, kazanç
8p23.1	Kayıp, kazanç
Xp22.2	Kazanç

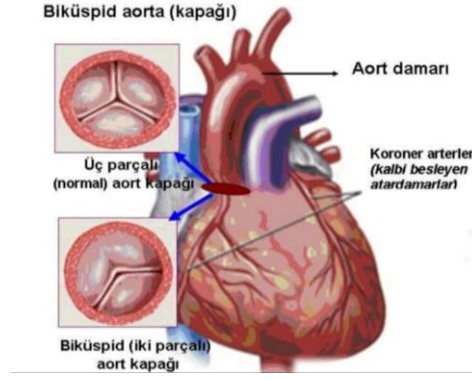
2.1.2.4. Sol ventrikül çıkım yolu darlıkları

Şekil 2.4.’de gösterildiği gibi hipoplastik sol kalp sendromunda (HSKS); mitral kapak, sol karıncık, aort kapağı ve aorta damarının, yani kalbin asıl güçlü olan sol tarafındaki tüm yapıların çeşitli derecelerdeki gelişme kusuru söz konusudur. Hipoplastik sol kalp sendromu ağır seyirli bir KKH’dır. Toplumda görülme sıklığının 1000 canlı doğumda 0.06-0.22 arasında olduğu düşünülmektedir. Tüm KKH’ların %4-8 kadarını oluşturmaktadır (Kelly & Editors, y.y.).



Şekil 2.4. Hipoplastik Sol Kalp Sendromu (HSKS) (Kelly & Editors, y.y.)

Biküspid aorta (BA), normalde kalpten çıkan aort damarına ait kapağın yapısında üç yaprakçık yerine birbirine eşit olmayan iki yaprakçık şeklinde olması diye tanımlanabilir. Biküspid aorta (BA) sık izlenen KKH olup erişkin popülasyonda görülme sıklığı %0,5-2 arasında izlenmektedir. Aort yetmezliği, aort stenozu, torasik assendan aorta dilatasyonu vb komplikasyonlara neden olduğu bilinmektedir (Pluchinotta vd., 2014). Şekil 2.5.’de şematik biküspid aorta, Tablo 2.5.’de da Sol ventrikül çıkım yolu darlıklarında görülen KSV’ler, özetlenmiştir (Fahed vd., 2013).



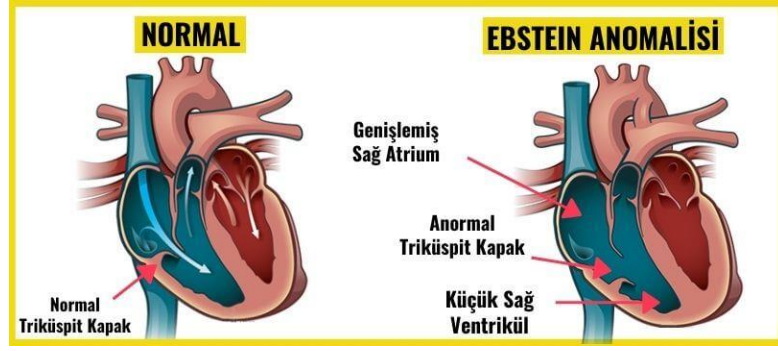
Şekil 2.5. Biküspit Aorta (BA) (Pluchinotta vd., 2014)

Tablo 2.5. Sol Ventrikül Çıkım Yolu Darlıklarında Görülen KSV'ler

LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ
7q11.23	Kazanç
9q34.3	Kayıp
16p13.11	Kazanç

2.1.2.5. Sağ ventrikül çıkım yolu darlıkları

Sağ ventrikül çıkım yolu darlıklarından olan ebstein anomalisi, triküspid kapak yaprakçıklarının yanlış konumlanması ve buna bağlı olarak gelişen disfonksiyonu ile ortaya çıkmaktadır. Şekil 2.6.'da gösterilmiştir. Ebstein anomalisi nadir görülen bir KKH'dır. Tüm KKH'ların %0,5'ini oluşturmaktadır ve toplumda görülme sıklığının 1/20.000 dolaylarında olduğu düşünülmektedir (Kelly & Editors, y.y.). Ebstein anomalisinde görülen KSV'ler, 7q11.23 kromozomal bölgesinde daha çok bildirilmiştir (Fahed vd., 2013).



Şekil 2.6. Ebstein Anomalisi (Kelly & Editors, y.y.)

2.1.2.6. Pulmoner venöz dönüş anomalileri

Pulmoner venöz dönüş anomalileri, pulmoner venlerin sol atriyum yerine sistemik venöz sisteme açılmasıyla karakterize nadir bir KKH'dır. Klinik seyir anomalinin total (TAPVDA)/parsiyel (PAPVDA) olması veya venöz dönüş obstrüksiyonun eşlik edip etmediği ile karakterizedir (Kelly & Editors, y.y.).

2.1.2.7. Heterotaksi

Heterotaksi/situs ambiguus, toraks ve abdomendeki organların anormal simetrik konumlanmasından dolayı ortaya çıkan bir anomalidir. Kardiyak heterotaksi saptanan olguların %50-95'inde ilave konjenital kalp anomalileri izlenmektedir (Lin vd., 2015). Eşlik eden kardiyak anomaliler sıklıkla büyük arter transpozisyonu, çift çıkımlı sağ ventrikül, atriyal septal defektler ve ventriküler septal defektlerdir (Manuscript, 2015).

2.1.2.8. Kompleks anomaliler

Kompleks kardiyak anomalileri, genellikle 3 veya daha fazla sayıda anomalinin birlikte izlendiği konjenital kalp hastalıklarıdır. Tek ventrikül, L-TGA ile birlikte Sol çıkım yolu defektlerinin izlendiği durumlar kompleks kardiyak anomalilere örnek olarak verilebilir (Kelly & Editors, y.y.).

2.1.3. Konjenital Kalp Hastalıkları Etiyopatogenezi

Kardiyogenez sırasında görev alan özellikle transkripsiyon faktörleri, hücre sinyal yolları, yapısal kardiyak proteinlerini kodlayan genlerin kesintiye uğramasına

neden olan patolojik varyantlar aracılığı ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (Nees & Chung, 2019b).

Genel olarak KKH etyolojisinde genetik ve genetik olmayan faktörlerin rol oynadığı kabul edilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, KKH olgularının %20-30 kadarında genetik veya çevresel nedenlerin gözlendiğini ortaya koymuştur (Pierpont vd., 2018).

Genetik nedenler arasında, kromozom anöploidiler, submikroskopik kromozom aberasyonları, nokta mutasyonları yer almaktadır. Sendromik KKH olgularının %3-5 kadarında tek gen düzensizliklerinin, %8-10'unun büyük kromozom anomalileri/anöploidilerinin ve %3-25 olguda da patojenik KSV'lerin bulunduğu bildirilmektedir (Pierpont vd., 2018). Genetik nedenler oldukça heterojen bir grup olup olguların yaklaşık %25-40'ında diğer konjenital malformasyonlar ve sendromların (trizomi 21, trizomi 18, trizomi 13, Williams sendromu gibi) eşlik ettiği bilinmektedir (Jin vd., y.y.)(Richards vd., 2008).

Çevresel faktörler ise olguların sadece %2 kadarında raporlanmıştır. Çevresel faktörler başlığı altında en sık teratojenik ajanlar ile maternal dönemde geçirilen enfeksiyonlar, maternal obezite, maternal diabetes mellitus ve maternal fenilketonüri yer almaktadır (Fahed vd., 2013)(Van Der Bom vd., 2011).

Ancak yukarıda belirtilen tüm bu nedenler KKH' li tüm olguların sadece %20-30 kadarının etyolojisini açıklayabilmektedir. Geri kalan %70-80 kadarının etyolojisine ilişkin bilgilerimiz henüz çok yetersizdir (Jin vd., y.y.).

2.1.4. İzole/Non Sendromik Konjenital Kalp Hastalıkları

İzole/non-sendromik konjenital kalp hastalıkları, tek gen veya kromozomal (mikroskopik/submikroskopik) sendromlar dışında kalan, gelişim geriliği, bilişsel gerilik veya herhangi bir ek konjenital malformasyonun eşlik etmediği etiopatogenezi henüz net olarak aydınlatılamamış gruptur. Kompleks mekanizmaların eşlik ettiği düşünülen bu grupta yapılan çalışmalarla birlikte altta yatan moleküler mekanizmalar da gün ışığına çıkmaktadır. Ancak izole/non-sendromik konjenital kalp hastalıklarının günümüz teknolojik imkanları ile birlikte bile sadece %20'lik kısmı

açıklanabilmektedir(Chung, 2017)(Blue, Kirk, Giannoulatou, Hil, & Sholler, 2018). Yapılan çalışmalarda şimdiye kadar, 20'den fazla genin sporadik veya familial sendromik olmayan KKH'da gösterildiği ve bu genlerdeki mutasyon oranının sendromik vakalardan iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Breckpot vd., 2011).

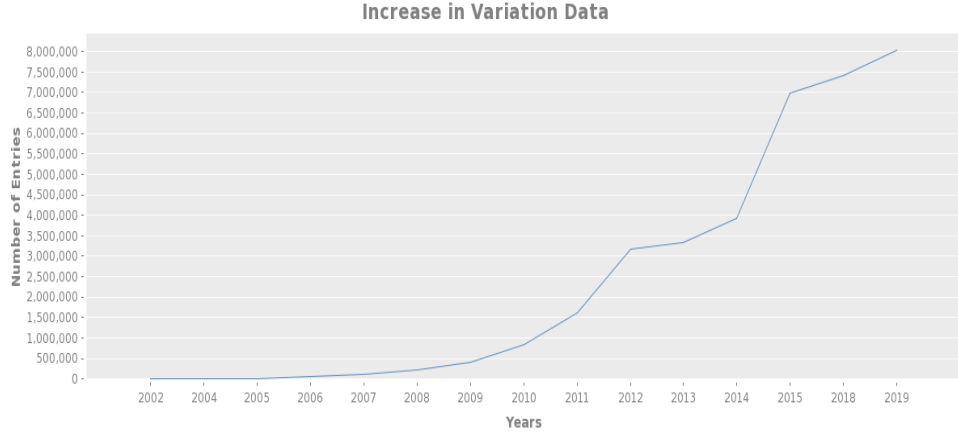
2.2. KOPYA SAYISI VARYASYONLARI (KSV)

Farklı DNA tamir mekanizmaları sonucu oluşan submikroskopik değişimler; kopya sayısı varyasyonları (KSV) olarak tanımlanmaktadır. DNA'da >1kb büyüklüğündeki delesyonları ve/veya duplikasyonları kapsayan bu KSV'ler, doğumsal anomaliler, sendromik/non-sendromik entellektüel yetersizlik, otizm gibi pek çok hastalığın oluşumunda rol oynayan genetik faktörlerden biridir. Bu KSV'ler, 1 Kb'dan onlarca MB'a kadar uzayabilir ve tüm genomda dağılmış halde bulunarak bireyler arasında oldukça farklılık gösterirler (Erzurumluoğlu, 2018)(Richards vd., 2008). Genel olarak, genlerdeki gen dozaj etkisine bağlı olarak haployetmezlik etkisi nedeniyle delesyonlar, duplikasyonlara göre daha zararlıdır. Multipl gen içeren KSV'ler, fenotipe yansımada her bir genin katkılı etkisi ve/veya bir genin multipl fenotipe neden olduğu pleiotrofik özelliğinden dolayı fenotipik etkileri çok çeşitli olabilmektedir. Aynı bölgede saptanan KSV'ler, klinik olarak bireyler arasında ve aile içerisinde dahi çeşitliliğe neden olabilmektedir.

Bireyler arasındaki genom çeşitliliği; Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP) ve KSV'ler ile açıklanabilir. KSV'ler, SNP'lerden daha fazla nükleotid kapsarlar ve boyutları ile farklılık gösterirler. Birçok gen ve geni düzenleyen bölgelerde yer alan KSV'ler gen dozajının ve gen ürününün bozulmasına neden olabilirken, genomun bazı bölgelerindeki KSV'ler belirgin bir fenotipe yol açmayabilirler. Aynı zamanda çevresel ya da diğer genetik faktörlerle de etkileşerek hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilirler. KSV'ler çok sayıda geni, bir genin tamamını, gen parçalarını, regülatör elementleri içerebilir veya gen içermeyen bölgelerde bulunabilir (Miller vd., 2010).

Otozomal genom %4,8-9,5 oranında KSV içermektedir (Sudmant vd., y.y.). KSV'lerin bulunduğu veri tabanı olan Database of Genomic Variations

(<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)'a göre son yıllarda tanımlanan KSV'lerin sayısı artmıştır. Artış Şekil 2.7.'de grafik olarak verilmiştir.



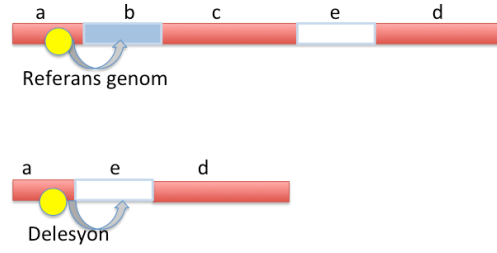
Şekil 2.7. KSV'lerin Yıllara Göre Artışı (DGV'den alınmıştır)

2.2.1. Kopya Sayısı Varyasyonları Etki Mekanizmaları

2.2.1.1. Kantitatif etki (Dozaj): Genomda meydana gelen delesyon ve duplikasyonlar dozaj-sensitif genlerin genomik kopya sayılarını değiştirirler. Böylece duplike genlerde ürün artışı meydana gelerek dengesizlikler oluşur ve ürünün yapısı, buna bağlı olarak da fonksiyonu bozulur. Bununla beraber; eğer KSV'ler üst düzey replikasyon bölgeleriyle ilişkili ise dozaj etkileri sabit olmamakla birlikte zamanla artış gösterebilmektedir (Lee & Scherer, 2010).

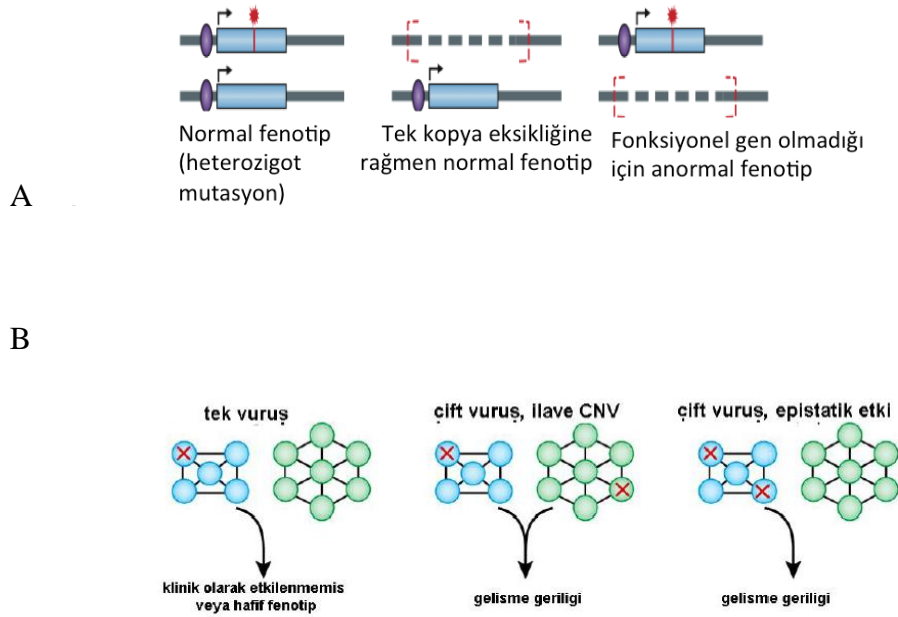
2.2.1.2. Genlerin bölünmesi: KSV oluşumu; genlerin bütünlüğünü bozarak gen içerisinde kırık nokta oluşumuna ve buna bağlı olarak gen ürününün fonksiyonunun bozulmasına sebep olabilmektedir (Lee & Scherer, 2010).

2.2.1.3. Regülatör bölgelerin etkilenmesi: Gen ürününü veya fonksiyonunu etkileyen faktörlerden bir diğeri promotör veya diğer regülatör bölgelerin kesintiye uğramasıdır. KSV'lerin %50'sinden daha fazlasında patojenite; promotör bölgelerin kesintiye uğraması sonucu meydana gelmektedir. Bu da gen transkripsiyonunun bozulması ile sonuçlanmaktadır (Stranger, 2014). Şekil 2.8.'de regülatör bölge etkilenmesi şematize olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Regülatör Bölge Etkilenmesi. Sarı yuvarlak olarak gösterilen “enhancer” bölge (b ve c) bölgelerinin silinmesi ile başka bir gen bölgesi olan ‘e’ ile etkileşerek farklı proteinlerin kodlanmasına neden olur. (Stranger, 2014)

2.2.1.4. Heterozigosite kaybı: Bir KSV’nin fenotipik sonuçları için; gen içeriği kadar genel genomik durum da oldukça önemli bir faktördür. Dozaj-insensitif bir genin delesyonu ile sonuçlanan bir KSV’nin fenotipe yansımaması beklenir fakat diğer alel fonksiyonel bir mutasyona sahip ise fenotipin etkilenmesi söz konusudur (Şekil2.9.-A). Bu durumda çift vuruş hipotezine göre; KSV’ler, otozomal resesif hastalıkların ortaya çıkma olasılığını arttırmaktadır (Şekil 2.9.-B) (Vissers, Vries, & Veltman, y.y.).



Şekil 2.9. (A) Bir Genin Heterozigosite Kaybı, (B) KSV’lerin Çift Vuruş Tek Vuruş Fenotipe Etkisi (Vissers vd., y.y.)

2.2.2. Kopya Sayısı Varyasyonlarının Sınıflandırılması ve Kullanılan Veritabanları

KSV'lerin sınıflandırılması ve tanımları American College of Medical Genetics (ACMG) kriterlerine göre Tablo 2.6.'de verilmiştir (Riggs vd., 2019).

Tablo 2.6. KSV'lerin ACMG'ye Göre Klinik Sınıflandırılması

Kategori	Tanım
Benign	Birçok sayıda ve sağlıklı bireylerin çalışıldığı veri tabanlarında benign olarak raporlanan KSV'ler veya polimorfizmler (sağlıklı populasyonun >%1'inde bulunan)
Olası Benign	Sağlıklı ebeveynden kalıtılmış ve benign olma ihtimalini artıran kanıtlar bulunan KSV
Klinik Önemi Bilinmeyen	Raporlama döneminde fenotipik etkisi bilinmeyen fakat laboratuvarın, raporlama kriterlerine uyan, ileride benign yada patojenik olarak olarak gruplandırılması beklenen KSV
Olası Patojenik	Saptanan değişim delesyon, homozigot bir delesyon veya bir amplifikasyon gibi patojenik olma ihtimalini arttıran kanıtların bulunduğu KSV
Patojenik	Birçok yayına ve veritabanına göre kesin bir şekilde fenotipe yansıyan KSV

Bazı KSV'ler popülasyonda çok yaygın olarak saptanmaktadır ve bazıları benign varyantlar olarak kabul edilirken, bazıları ise analiz edilen hastanın fenotipinde içerip içermediği ve fenotipik sonuçların neler olabileceği bilinmeyen çok sayıda nadir KSV'ler de mevcuttur. Sonuç olarak, varyantların yorumlanması büyük bir zorluğa neden olmaktadır. Bu yüzden çok veri toplamak ve bilgiyi uzmanlar arasında paylaşmak için uluslararası veri tabanları kurulmuştur. Bu veri tabanları, KSV'lerin

daha iyi yorumlanmasına yardımcı olmaktadır. Kullanılan veri tabanları aşağıda verilmiştir.

2.2.2.1. DGV: Bu veri tabanı, insan genomunda yapısal değişikliklerin kapsamlı bir şekilde özetini sunmaktadır. Fenotipik verilerle genomik değişiklikleri ilişkilendirip çalışmalarda kontrol verisi sağlamaktadır. Veri tabanının içeriği sağlıklı kontrol örneklerinde tanımlanan yapısal varyasyonlarından oluşmaktadır. Bu veri tabanı, yapılan çalışmalardan elde edilen yeni verilerle sürekli olarak güncellenmektedir (Macdonald, Ziman, Yuen, Feuk, & Scherer, 2014).

2.2.2.2. DECIPHER: Olgularda bulunan varyantlarla ilgili çeşitli biyoinformatik kaynaklardan bilgi alınarak klinik tanının geliştirilmesine yardımcı olur. Hem normal varyantları hem de o lokusta rapor edilen patojenik varyantları sunmaktadır. Ayrıca, genomik varyantın sonuçlarının analizi (örneğin fonksiyon kaybı veya fonksiyon kazanımı), hastalığın mekanizması ve potansiyel terapötik hedefler hakkında bilgi sağlar (<https://decipher.sanger.ac.uk/>).

2.2.2.3. OMIM: 15000'den daha fazla gen hakkında bilgi içeren, genlerin ve genetik fenotiplerin kapsamlı bir özetini veren veri tabanıdır. OMIM, fenotip ve genotip arasındaki ilişkiye odaklanır (Amberger, Bocchini, Scott, & Hamosh, 2015).

2.2.3. Kopya Sayısı Varyasyonlarını Saptama Yöntemleri

2.2.3.1. Kromozom mikrodizin analizi (KMA)

KMA; tüm genomu yüksek rezolüsyonda inceleyerek dengesiz anomalilerin yanısıra KSV'nin de tespiti için kullanılan, genom çapında bir tarama tekniğidir. Konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle saptanan büyük (5-10 Mb) dengesiz anomalilerin yanısıra KSV olarak ifade edilen submikroskopik delesyon ve duplikasyonları, genom genelindeki gen dozajı farklılıklarını, çeşitli fizyolojik veya patolojik süreçlerde gen ekspresyon paternlerindeki değişimleri belirleyebilen bir teknik olması nedeniyle günümüzde gerek araştırma gerekse tanı amaçlı yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır (Erzurumluoğlu, 2018). Tüm genomdaki genomik kopya değişimlerinin incelendiği kromozom mikrodizin analizinde, CGH temelli array veya tek nükleotid polimorfizimlerinden oluşan SNP arrayler kullanılmaktadır.

2.2.3.1.1. Array CGH (a-CGH)

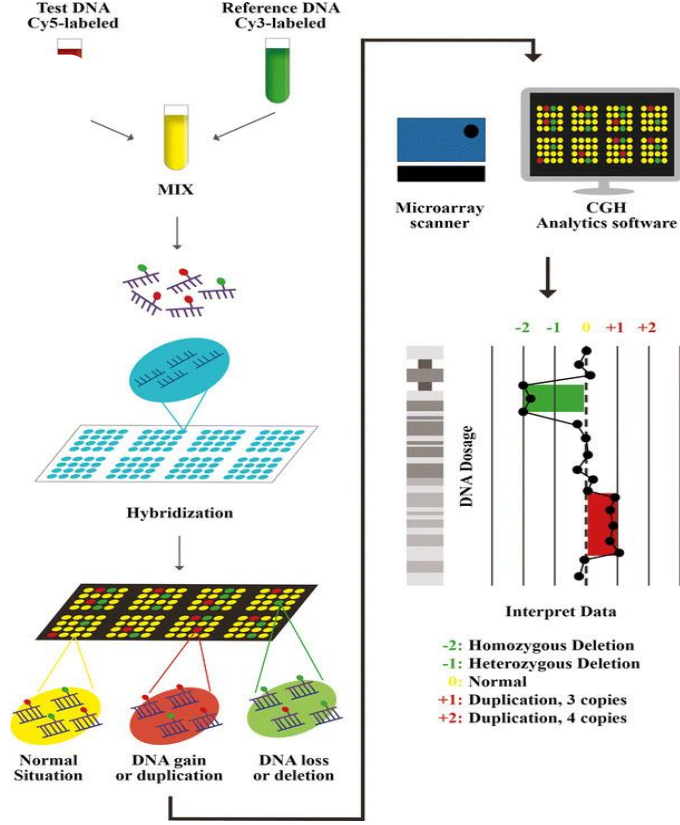
Array CGH (aCGH) tekniği oligonükleotid problar kullanılarak genomdaki dizi artış ve azalmalarını yüksek çözünürlükte tüm genom boyunca taranabilmesine olanak sağlayan moleküler karyotipleme tekniğidir. İlk olarak 1997'de Solinas-Toldo ve ark. hedef (target) diziyi cam matriks üzerine immobilize ederek aCGH'nin temelini attılar (Solinas-toldo, Lampel, Stilgenbauer, Nickolenko, & Benner, 1997)(Salvador, Arigita, Carreras, Lladonosa, & Borrell, 2011) .

aCGH yöntemi ile kopya sayı varyantları olarak tanımlanan delesyon veya duplikasyonlar referans DNA ile karşılaştırılarak ortaya çıkarılmaktadır. Bu KSV'ler kilobaz boyutundan megabaz boyutuna kadar ya da tüm kromozomu içeren (trizomi ve monozomiler) boyutlardaki anomalileri saptamaktadır. Böylelikle hastalıkla ilişkisi gen boyutunda ortaya çıkarılmaktadır (Cappuccio vd., 2016)(E. P. Hoffman & Ph, 2012). Array CGH yöntemi Şekil 2.9.'da özetlenmiştir.

CGH Array'in rezolüsyonu ve tanı yeteneği;

- Kullanılan probun fragment uzunluğuna,
- Gen sayısına,
- Hedefe yönelik veya tüm genoma spesifik olmasına göre değişmektedir.

aCGH yüzeyindeki (cam yüzey, chip) prob yoğunluğu arttıkça rezolüsyonu artmaktadır. Örneğin orta düzeyde rezolüsyona sahip array çipi (180 K) ile 50kb ve daha büyük aberasyonlar belirlenebilmektedir. Çipteki gen bölgelerinin sayısı arttıkça (450 K, 1M K gibi) daha küçük KSV'ler saptanabilir (Mazzei, National, Cavallaro, & National, 2016).



Şekil 2.10. Array CGH Yöntemi (Mazzei vd., 2016)

aCGH yönteminde, test DNA'sı ile referans DNA hibridize edilerek karşılaştırılır ve test DNA'sındaki değişimler belirlenir. Test ve referans DNA örnekleri fragmentlere ayrıldıktan sonra her bir DNA örneği farklı renklerdeki florokromlarla (Cyanine 3 ve Cyanine 5) işaretlenir ve prob imbolize edilmiş array lamı ile hibridize edilir. Fragmentler karışımı, sadece arraydeki tam komplementer olan problara bağlanmaktadır. Lamlar mikroarray tarayıcısı kullanılarak imaj dosyalarına çevrilir. Floresan yoğunlukları ölçülür ve imaj dosyaları özellik çıkartma yazılımları kullanılarak logaritmik oranları metin dosyaları (.txt) şeklinde elde edilir ve kopya sayısı analizi için yazılımın içine aktarılır (Lu vd., 2007). Array CGH yönteminin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Floresan ışımının yoğunluğuna göre:

- Test = Referans → 1 NORMAL
- Test > Referans → >1 DUPLİKASYON

- Test < Referans →<1 DELESYON şeklinde yorumlanmaktadır (Erzurumluoğlu, 2018).

Tablo 2.7. Array CGH Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Yüksek çözünürlük	Pahalı olması
Tüm genomun tek testle ve kısa sürede incelenebilmesi	Dengeli yapısal yeniden düzenlenmeleri saptayamaması
Submikroskopik delesyon ve duplikasyonların saptanabilmesi	Düşük oranlı mozaisizmlerin tanısında yetersiz olması (< %10)
Birden fazla genomun karşılaştırılabilmesi	Düşük oranda da olsa hata payının (hibridizasyon sorunları) olması
Hücre bölünmesine gerek yok	Saptanan değişimlerin teknikten kaynaklı bir hataya bağlı olup olmadığının ya da fenotipik etkisinin kesin olarak bilinmemesi
Az miktarda DNA	

2.2.3.1.2. SNP array

SNP, tek nükleotid polimorfizimdir. Yani DNA dizisinde tek bir nükleotidin farklı olmasıdır. İnsan genomunda en yüksek sıklıkta gözlenen varyantlar olup 1000-2000 nükleotidde bir görülür. SNP'ler genlerde ve genler arası kodlanmayan bölgelerde bulunabilmektedirler ve gen fonksiyonlarında herhangi bir etkisi olmadığı gibi bazı SNP'ler protein fonksiyonunu etkileyerek patojenik özellik kazanabilirler (Popova vd., 2015).

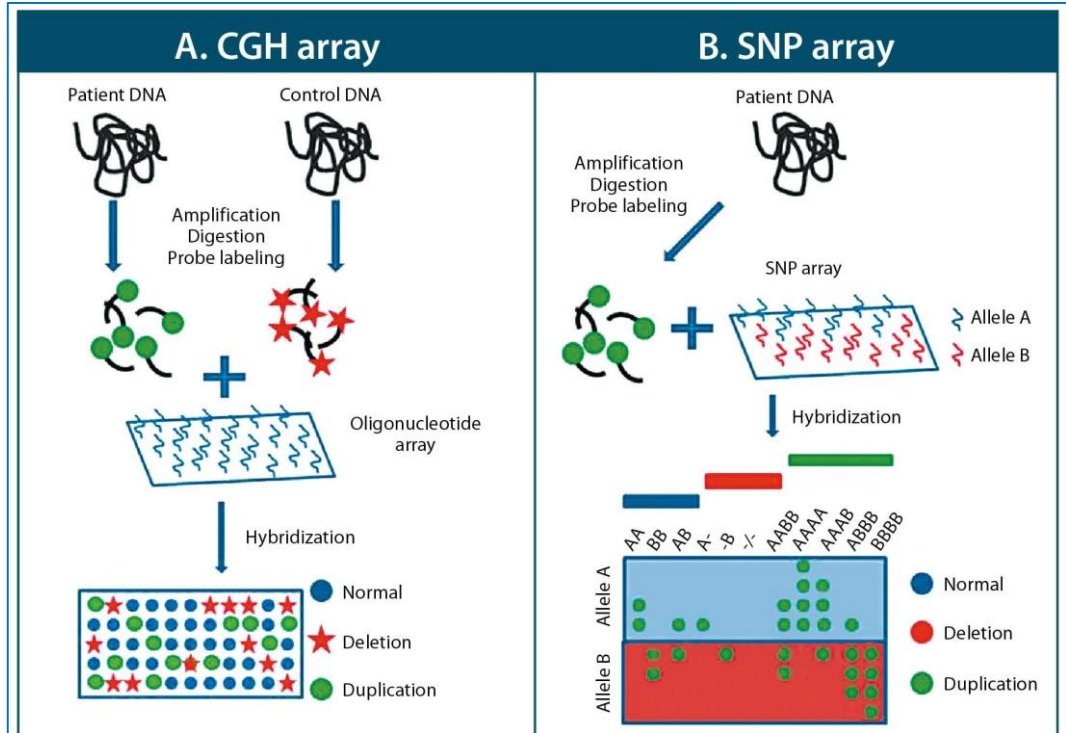
SNP array'de, hedef proplar polimorfik allellerden seçilir yani seçilen DNA proplarını bireyler arasında tek bir baz çifti aracılığıyla değişiklik gösterir niteliktedirler. Genel prensibi aCGH ile benzerlik gösterir. Ancak SNP array'de referans DNA dizisi ile karşılaştırma bulunmamakta olup sadece olgu DNA'sı işaretlenmekte ve SNP'leri içeren çipin üzerindeki oligonükleotidlerle hibridize edilmektedir. Olgu DNA'sında

bulunan SNP allellinin sinyal yoğunluğu bilgisayar ortamında bulunan referans sinyal yoğunlukları ile karşılaştırılarak KSV'ler saptanmaktadır (Scianti vd., 2018).

Günümüzde her iki array platformunun güçlü yönlerini aynı platformda birleştiren CGH+SNP arrayleri tasarlanmış olup yaygın olarak kullanılmaktadır (Erzurumluoğlu, 2018). CGH Array, SNP array ve aCGH+SNP Array'lerin yöntemsel karşılaştırılması Tablo 2.8.'de verilmiş olup, Şekil 2.11.'de de CGH Array ile SNP arrayin karşılaştırılması gösterilmiştir (Scianti vd., 2018).

Tablo 2.8. CGH Array, SNP Array ve aCGH+SNP Array'lerin Yöntemsel Karşılaştırılması (Scianti vd., 2018)

SNP ARRAY	ARRAY CGH	aCGH+SNP
Olgonükleotid prob uzunluğu:~25bç(~25 mer)	Olgonükleotid prob uzunluğu: 60-70 bç (60-70 mer)	Olgonükleotid prob uzunluğu: 60-70 bç (60-70 mer)
Kopya sayısı probu + SNP probu (yüksek yoğunluklu)	Sadece kopya sayısı probu	Kopya sayısı probu + SNP probu (düşük veya orta yoğunluk)
Yalnızca DNA testinin hibridizasyonu	Test DNA + Referans DNA'sının hibridizasyonu	Test DNA + Referans DNA'sının hibridizasyonu



Şekil 2.11. (A) CGH Array ile (B) SNP Array Karşılaştırılması: (A) CGH Array, 2 farklı floresan etiket (hasta DNA'sı yeşil işaretli, kontrol DNA'sı kırmızı işaretli) kullanarak hastanın DNA'sını kontrol DNA'sıyla karşılaştırır. Etiketli DNA'lar fragmentleri, oligonükleotid içeren lam ile hibridize edilir. 2 farklı etiketin yoğunlukları kopya sayısı varyasyonlarını gösterir. Kırmızı işaretli (yıldız) DNA fazla olması delesyonu gösterir. Yeşil işaretli (daire) DNA fazla olması duplikasyonu gösterir. Kopya sayısı değişikliği olmadığında, eşit miktarlarda kırmızı ve yeşil etiketli DNA olacağı için normal değerlendirilir (mavi daire). (B) Sadece hasta DNA'sı kullanılır. SNP array lamı, çok sayıda allel (A-B allelleri) olduğu bilinen küçük DNA parçaları içerir. Her allel, DNA dizisi üzerinde temsil edilir ve bir lokusa karşılık gelir. Hastadan alınan DNA, allelleri içeren SNP array lamı ile hibridize edilir. Belirli bir lokusta A alleleline sahip hastalar A alleleline, B alleleline sahip hastalar B alleleline bağlanacaktır. Hasta homozigot ise, A veya B'ye (AA veya BB) bağlanacaktır. Hasta heterozigot ise, A ve B'ye (AB) bağlanacaktır.

<https://www.contemporarypediatrics.com/view/genetic-testing-intellectual-disability-role-diagnostic-evaluation>

SNP array, aCGH ve aCGH+SNP array platformları ile saptanabilen genomik anomaliler Tablo2.9.'da gösterilmiştir. Her üç array platformu anöploidileri ve KSV'leri saptayabilmektedir. Bu 3 array platformu aynı zamanda dengesiz yapısal anomalilerin varlığını saptayabilirken bu anomalilerin oluşum mekanizmalarını (ring kromozom, dengesiz translokasyonların olması vb.) saptayamamaktadır. aCGH platformu ile triploidileri, uniparental disomiye (UPD) gösteren heterozigosite yokluğunu (AOH) ve akrabalık konusunda bilgi sağlamamakta olup SNP array'ler ve aCGH+SNP array'ler allelik heterojenitenin belirlenmesi açısından SNP Array'ler ve aCGH+SNP array'ler, aCGH'e göre daha avantajlıdır. Bu sayede triploidiler, düşük oranlardaki mozaiklikler, parental akrabalık veya UPD'yi gösteren heterozigosite kaybı konusunda bilgi sağlamaktadırlar (Erzurumluoğlu, 2018)(Wiszniewska vd., 2013) (Scionti vd., 2018).

Tablo 2.9. Farklı Array Platformları İle Saptanabilen Genomik Anomaliler (Erzurumluoğlu, 2018)

Teknik	Anöploidi	Dengeli	Dengesiz	Triploidi	AOH/akrabalık	KSV'ler
aCGH	+	-	+	-	-	+
SNP	+	-	+	+	+	+
aCGH+SNP	+	-	+	+	+	+

2.3. KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA KSV

Büyük ve gen içeriği fazla olan KSV'ler genel olarak sendromik KKH'a neden olmaktadır ve patojenik olarak değerlendirilen bu mikrolelesyon/duplikasyonlar tüm KKH'ların %3-15'lik kısmını oluşturmaktadır. Bugüne kadar 22q11.2 delesyon sendromu, Williams-Beuren sendromu (7q11.23'de delesyon), Jacobsen Sendromu (11q Terminal delesyonu), 1q21.1 ve 1p36 delesyonları, 1q21.1 duplikasyonu, 8p23.1delesyonu iyi karakterize edilmiş patojenik KSV kaynaklı sendromlardır (Lander & Ware, 2014)(Pierpont vd., 2018).

2.3.1. Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında KSV

KSV'lerin izole/non-sendromik KKH etiolojisinin %3-10'luk kısmından sorumlu olduğu bilinmektedir (Lander & Ware, 2014). Non-sendromik KKH'larda

KSV'ler; dozaja bağı bir geni içerip içermediğı, hastalıklarla ilişkili daha önce tanımlanmış bir bölgenin olup olmadığı, *de novo* yada ailesel geçiş göstermesi, gen içeriğı, bölgenin büyüklüğüne göre önemi değışkenlik göstermektedir (Riggs vd., 2019). Kromozomal mikrodizin ile non-sendromik KKH olan sporadik hastaların çalışılması, yeni genlerin tanımlanmasında klasik aile çalışmalarına bir alternatiftir ve sınırlı sayıda çalışmada, izole/non-sendromik KKH'li hastalarda bu yöntem kullanılarak hastalıkla ilişkili bazı KSV'leri rapor etmişlerdir (Chung, 2017). İzole KKH olguların dahil olduğı çalışmaların sonuçları Tablo 2.10.'de özetlenmiştir (Fahed vd., 2013).

Tablo 2.10. Non-Sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Saptanan KSV'ler (Fahed vd., 2013)

LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ	FENOTİP
1q21.1	Kayıp, kazanç	TOF, VSD
3p25.1	Kazanç	TOF
3q22.1-3q26.1	Kayıp, kazanç	AVSD
4q22.1	Kazanç	TOF
4q32.3	Kazanç	VSD
5q35.3	Kazanç	TOF
7q11.23	Kazanç	Hipoplastik sol kalp, Ebstein anomalisi
8p23.1	Kayıp, kazanç	AVSD, VSD, TOF, ASD
9q34.3	Kayıp	TOF, hipoplastik sol ventrikül
13q14.11	Kazanç	TOF, VSD
16p13.11	Kazanç	Hipoplastik sol ventrikül
18q11.1-18q11.2	Kazanç	VSD
Xp22.2	Kazanç	TOF, AVSD

Bu konuda ilk alışma F. Erdoğan ve ark. tarafından yapılmıştır. Araştışıcılar 105 izole/non-sendromik KKH ile yaptıkları bir KMA alışması sonucunda %4.7

oranında KSV saptanmıştır. Bu KSV'ler, bir *de-novo* delesyon, iki *de-novo* duplikasyon ve 8 familial KSV (bir delesyon ve yedi duplikasyon) dahil olmak üzere, yaygın DNA kopya sayısı değişimleriyle çakışmayan 18 kromozomal değişikliği içermektedir (Erdogan vd., 2008).

Kim ve ark, izole/non-sendromik KKH olgularında yaptıkları çalışmada ise *VEGFA* ve *SOD2* gen bölgelerinde KSV taraması yapılmış ve hastaların (422 hasta) %12.2'sinde ortak KSV bölgeleri saptanmıştır. İzole KKH olan çocuklarda nadir/büyük KSV'lerin oldukça yüksek oranda gözlendiğini, bu KSV'lerin 2.55 kat artmış ölüm veya nakil riskiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar KSV yükünün KKH olgularının ameliyat sonrası sağkalımı için önemli bir modifiye edici faktör olduğunu bildirmişlerdir (Kim vd., 2016).

Breckpot ve ark. nın izole/non-sendromik KKH ile yaptığı bir KMA çalışması sonucunda da toplam 46 hastanın %4.3'ünde bilinen genleri içeren ortak KSV bölgeleri rapor edilmiştir (Breckpot vd., 2011).

Tomita ve ark. nın 945 KKH olgusu ile yaptığı KMA çalışması sonucunda, 945 olgudan 135'i kromozomal anomalisi ile ilişkilendirilmiştir. Bu olgular çıkartılıp kalan 810 olguda KSV değerlendirilmesi sonucunda % 4,3 KSV frekansı rapor edilmiştir (Tomita-mitchell vd., 2020) .

Greenway ve ark. nın izole fallot tetralojisi olan 114 olgu grubunda yapmış olduğu KSV analizi sonucunda %9.6 *de novo* KSV (11 olgu) rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda sendromik vakaların dahil edilmesi KSV saptama oranını doğrudan etkilemektedir. Örneğin Fallot tetralojisi, 22q delesyonunun gözlendiği DiGeorge sendromunun major özelliklerinden biridir (Greenway vd., 2009).

Yapılan çalışmalar submikroskopik KSV'lerin, hastalık patogenezinde doğrudan yada genetik risk faktörleri olarak önemli rol oynadığına dair kanıtlar sunmaktadır. Ayrıca bazı durumlarda KMA'nın, ek semptomlar ortaya çıkmadan çok önce hastalığın sendromik yapısını ortaya çıkarmak için de kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Prenatal dönemde fetusta izole kardiyak defekt saptanması durumunda veya postnatal dönemde multipl anomalilerle birlikte KKH'ın görüldüğü olgularda rutin

olarak invaziv girişimle elde edilen materyallerde KMA analizleri gerçekleştirilmektedir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı rutin prenatal tanı analizlerinde normal kromozom kuruluşuna sahip kardiyak anomalili fetuslarda aCGH+SNP array ile %30 fetusta genomik kopya sayısı anomalisi saptanmıştır. Ancak postnatal dönemde, izole/non-sendromik KKH bulunan yenidoğan ve erişkinlerde genetik analizler henüz araştırma aşamasındadır, rutin analizler sürecine dahil olmamıştır. Nadiren konvansiyonel kromozom analizi gerçekleştirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. OLGU/KONTROL GRUBU

Bu çalışmaya 15.06.2019-15.01.2020 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji polikliniğine başvuran ve kardiyovasküler sistem muayenesi yapıp KKH tanısı nedeniyle Tıbbi Genetik polikliniğine yönlendirilerek dismorfolojik değerlendirilmesi yapılan non-sendromik KKH tanısı konan 40 olgu dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak yine Çocuk Kardiyoloji polikliniği tarafından ekokardiyografi ile değerlendirilmiş olup herhangi bir KKH saptanmayan, Tıbbi Genetik polikliniğinde klinik genetik değerlendirmesinde herhangi bir ilave konjenital malformasyonu olmayan ve monogenik hastalık veya mikrodelesyon/duplikasyon sendromundan şüphelenmeyen olgular arasında benzer yaş grubundaki 24 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edilmişlerdir. Olgulara ve ailelerine çalışma hakkında bilgi verilmiş, ebeveynlere aydınlatılmış onam formu imzalatıldıktan sonra tüm olgular çalışmaya dahil edilmişlerdir.

Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığından 25.06.2019 tarih ve 18 sayı ile onay alınmıştır. Çalışmamızda olgu ve kontrol sayısının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen güç analizi, PASS 11 paket programı ile Kim ve ark. tarafından yayınlanan “Burden Of Potentially Pathologic Copy Number Variants Is Higher In Children With Isolated Congenital Heart Disease And Significantly Impairs Covariate-Adjusted Transplant-Free Survival”adlı makale baz alınarak yapılmıştır. Etki büyüklüğü 0.5 olacak şekilde ki kare analizi kullanılarak %80 güç ve %5 tip 1 hata oranı ile hasta ve kontrol gruplarında toplamda en az 32 kişinin çalışmaya dahil edilmesi uygun bulunmuştur (Kim vd., 2016).

Çalışma kapsamında olguların seçiminde kullanılan dahil edilme/dışlanma kriterleri aşağıda verilmiştir.

Hasta grubu dahil edilme kriterleri:

- a. 0-18 yaş arasında KKH tanısı almış olmak
- b. İzole/non-sendromik KKH tanısının olması

- c. İzole/non-sendromik KKH tanısı alan ve KKH etiyolojisinde yer aldığı bilinen *MYH6*, *NKX2-5*, *GATA4*, *NOTCH1*, *TBX1* genlerinde mutasyon saptanmamış olması
- d. Olgu/refakatçisinin çalışmaya dahil olmayı kabul etmesi

Hasta grubu dahil edilmeme kriterleri:

- a. Fetal dönemde herhangi bir teratojen maruziyet öyküsü bulunması
- b. KKH etyolojisinde rol oynayan maternal orjinli faktörün olması (obezite, diabet, fenilketonuri vb)
- c. İlave bir konjenital malformasyon olması
- d. Herhangi bir monogenik veya mikrodelesyon/duplikasyon sendromundan şüphelenilmiş olması
- e. Trizomi sendromu tanısı alanlar
- f. Çalışmaya dahil olmak istemeyen olgu/refakatçı

Kontrol grubu dahil edilme kriterleri:

- a. 0-18 yaş arasında olmak
- b. Herhangi bir monogenik veya mikrodelesyon/duplikasyon sendromundan şüphelenilmemiş olması
- c. Herhangi bir kalp hastalığı bulunmaması (ekokardiyografisi normal)
- d. Olgu/refakatçisinin çalışmaya dahil olmayı kabul etmesi

Ebeveyn örneklerinin toplanması:

Çalışmamızda patojenik/olası patojenik/VUS nitelikli KSV saptanan olgularda varyantın klinik önemini değerlendirmek, *de novo*/kalıtsal özelliğinin belirlenmesi için olguların ebeveynlerinden periferik kan örnekleri alınmış ve olgulara spesifik varyantlar açısından değerlendirilmek üzere uygun koşullarda saklanmıştır.

3.2. KULLANILAN ALET VE MALZEMELER

3.2.1. Kullanılan Aletler

- Hibridizasyon Fırını (Agilent)
- Hibridizasyon Fırını Rotatoru (Agilent)
- Hibridizasyon Haznesi (Agilent)
- Hibridizasyon Haznesi Contalı Lamı (Agilent)
- Mikroarray Tarayıcısı (Agilent)
- Manyetik Karıştırıcı Çubuk (Corning)
- Isıtma Özellikli Manyetik Karıştırıcı (Corning)
- Ozon Bariyer Lam Kapağı (Agilent)
- 1.5 L Cam Tabak (Borcam)
- Lam yıkama plakaları (Wheaton)
- Lam tutucusu (Agilent)
- Pipet seti (Gilson)
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı (PE GenAmp System9700)
- Vorteks (Heidolph)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Strip (Perkin Elmer)
- Mikrofij Tüpleri (Ambion)
- Toplama Tüpü (Qiagen)
- Spin kolonu (Qiagen)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Su banyosu
- Termostat (Biosan)

3.2.2. Kullanılan Malzemeler

- Proteinaz K
- Wash 1 ve 2
- Ekstraksiyon buffer

- Binding buffer
- Elüsyon buffer
- Binding solüsyon
- İnsan gDNA'sı (Kadın/Erkek)
- CGH+SNP Microarray Kit 4x180K, Agilent Inc, USA
- Alu I (Agilent)
- Rsa I (Agilent)
- Genomik DNA enzimatik Etiketleme Kiti (Agilent)
- Oligo aCGH Yıkama Tamponu 1 ve 2 (Agilent)
- Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti (Agilent)
- 1xTE (Tris EDTA, pH 8.0) (Agilent)
- Asetonitril (Sigma)
- PBS
- Distile Su

3.3. YÖNTEM

3.3.1.DNA İzolasyonu

Hastalar ile kontrol bireylerinden EDTA'lı tüpler içerisine 2 CC periferik kan örneği alınmıştır.

- Ependorf tüpü içerisine 10 µL Proteinaz K (20 mg/ml), 200 µL periferik kan örneği ve 200 µL ekstraksiyon tamponu eklenerek 15 sn vorteks yapılmıştır.

- Tüpler 15 dk 56°C su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda örneğin tüpün dibinde toplanmasını sağlamak amacıyla kısa bir santrifüj yapılmıştır.

- Tüplere 210 µL binding solüsyon eklenip, vorteks yapılmıştır.

- Daha sonra karışım tüp içerisine konan spin kolona aktarılarak, 8000rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir ve sonunda tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüştür.

- Tüp içerisinde bulunan Spin kolona 650 µL yıkama tamponu1 eklenip, 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüştür.

- Devamında tüp içerisine yerleştirilenspin kolona 500 µL yıkama tamponu 2 eklenmiş, tüp 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiş ve tüp içerisindedisıvı dökülmüştür.

- Spin kolona 250 µL yıkama tamponu2 eklenerek aynı işlem bir kez daha tekrarlanmış,tüp14000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilerek son DNA yıkama işlemi tamamlanmıştır.

- Spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılmış, 200 µL elüsyon tamponu eklenerek 5 dk oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek gDNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.3.2. Genomik DNA'nın Niceliksel ve Niteliksel Analizi

- gDNA'nın (genomik DNA) konsantrasyonunun ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometresi (NanoDrop)kullanılmıştır.

- NanoDrop program menüsünden nükleik asit ölçümü seçilip, örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.

- Cihazın ölçüm ayarlarını sıfırlamak için öncelikle 1.5 µL distile su, daha sonra 1.5 µL elüsyon tamponu kullanılmıştır

- Hasta ve kontrol gDNA örnekleri, her birinden 1.5 µL kullanılarak DNA konsantrasyonları ölçülmüştür.

- Ürün miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ürün } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Örnek Hacmi}}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

3.3.3.Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi

aCGH+SNP array analizlerinin başarılı olmasında DNA fragment büyüklüklerinin birbirlerine yakın olması (200-500 bp) gerekmektedir ki bu PCR ile DNA amplifikasyonunun başarısı için de önemlidir. Bu nedenle

• Sekiz PCR tüpünün dördüne 20.2 µL olgu DNA'larından, dördüne de referans DNA ve su toplamda 20.2 µL olacak şekilde koyulmuştur.

• Restriksiyon kesim karışımı (RKK) Tablo 3.1.'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. Restriksiyon Kesim Karışımı (RKK)

Bileşen	Reaksiyon başına (µL)	8 Reaksiyonluk (µL)
Distile Su	2	18
10xRestriksiyon Enzim Tamponu	2,6	23,4
BSA	0,2	1,8
Alu I	0,5	4,5
Rsa I	0,5	4,5
Son Hacim	5,8	52,2

• Olgu ve referans DNA'larının olduğu sekiz PCR tüpünün her birine 5.8 µL RKK eklenmiştir ve Tablo 3.2.'de gösterilen sıcaklık ve sürelerde PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) programı uygulanmıştır.

Tablo 3.2. Restriksiyon Kesimi İçin PCR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	20 dakika (dk)
3	4 °C	Beklet

• Uygulanan PCR programı bittikten sonra her bir tüpün içerisine 5 µL Random Primeri pipetaj yapılarak eklenmiştir.

• PCR cihazında DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için Tablo 3.3.'teki program uygulanmıştır.

Tablo 3.3. DNA Denatürasyonu ve Fragmantasyonu İçin PCR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	3 dk
2	4 °C	Beklet

- Örnekler 5dk, -20°C de bekletilmiştir.

3.3.4.Genomik DNA'nın Floresan İşaretlemesi

Floresan işaretleme için olgu ve referans için iki farklı oluşturulan karışım (FİK) Tablo 3.4.'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. Floresan İşaretleme Karışımı (FİK)

Bileşen	Reaksiyon başına (µL)	4 Reaksiyonluk (µL)
5xReaksiyon Tamponu	10	50
10xdNTP	5	25
Cyanine 3-dUTP Cyanine 5-dUTP	3	15
Exo (-) Klenow	1	5
Son Hacim	19	95

• Olgu DNA'larının olduğu tüplere Cyanine (Cy) 5-dUTP, referans DNA'ların olduğu tüplere ise Cyanine(Cy) 3-dUTP içeren FİK karışımından 19 µL eklenmiştir.

• Toplam hacmi 50 µl'ye ulaşan PCR tüplerine DNA etiketlemesi için Tablo 3.5.'deki PCR programı uygulanmıştır.

Tablo 3.5. DNA Etiketlemesi İçin PCR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	10 dk
3	4 °C	Beklet

3.3.5. Etiketlenmiş gDNA'nın Temizlenmesi

Etiketlenmiş gDNA, Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30kDa Filtresi kullanılarak temizlenmiştir.

- Her bir hasta ve referans örneği için 1.5 µL'lik tüpler etiketlenmiş ve içlerine filtreler yerleştirilmiştir.
- Her bir DNA örneği 430 µL 1xTE (pH 8.0) ile pipetaj yapılarak içlerinde filtre bulunan tüplere aktarılmıştır.
- Tüpler 14,000xg'de, 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde toplanan kısım dökülmüştür.
- Her bir filtrelili tüpe 480 µL 1xTE (pH 8.0) eklenmiştir ve 14,000xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Filtreler, etiketlenmiş yeni tüplerin içerisine ters çevrilerek yerleştirilip ve 1 dk boyunca 1,000xg'de santrifüj edilmiştir.

3.3.6. Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması

Ürün miktarı ve spesifik aktivitenin hesaplanmasında NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometre kullanılmıştır.

- NanoDrop program menüsünden MikroArray seçilip, örnek tipi olarak da DNA-50 olarak ayarlanmıştır.
- Cihazın ölçüm ayarlarını sıfırlamak için öncelikle 1.5 µL distile su daha sonra 1,5 µL 1xTE (pH 8.0) kullanılmıştır.
- Örneklerden 1.5 µL kullanılarak A260nm (DNA), A550nm (Cy3), A650nm (Cy5) absorbansı ile gDNA konsantrasyonu ve hacmi ölçülmüştür.
- Spesifik aktivitesi ve ürün miktarı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite} \quad = \quad \frac{\mu\text{L boya başına pmol}}{\mu\text{L gDNA başına } \mu\text{g}}$$

(µg gDNA başına pmol boya)

$$\text{Ürün miktarı } (\mu\text{L}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

• Ürün miktarları birbirine yakın olan Cy3 ile etiketli referans örnekleri ile Cy5 ile etiketli gDNA örnekleri, cinsiyetlere dikkat edilerek PCR tüpünde birleştirilmiştir.

3.3.7. Hibridizasyon Öncesi Hazırlık

• Hibridizasyon karışımı hazırlanmadan önce oligo aCGH hibridizasyon kitinde bulunan 10x bloke edici ajana 1,350 μL distile su eklenmiştir ve oda sıcaklığında bir saat bekletilmiştir.

3.3.7.1. Etiketlenmiş gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması

• Referans ve olgu örneklerinin bir arada olduğu karışımdan 39 μL alınarak yeni PCR tüpüne aktarılmıştır.

• Her bir tüpe Tablo 3.6.'da gösterildiği gibi hazırlanan hibridizasyon karışımından 71 μL pipetaj yapılarak eklenmiştir. Tablo 3.7.'de belirtilen PCR programı uygulanmıştır.

Tablo 3.6. Hibridizasyon Karışım Tablosu

Bileşen	Hibridizasyon başına hacim (μL)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)	5
10x aCGH bloke edici ajan	11
2x HI-RPM hibridizasyon tamponu	55
Son Hacim	71

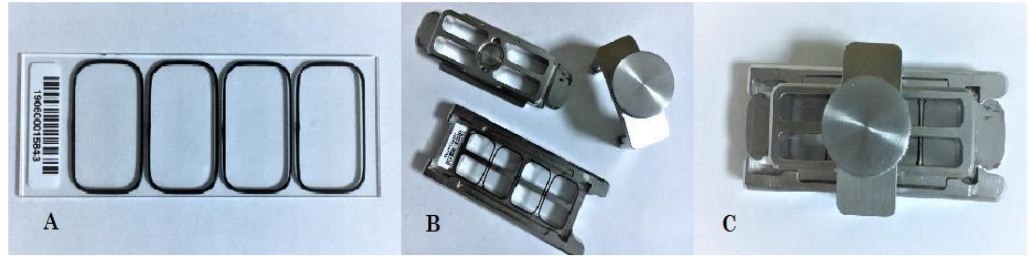
Tablo 3.7. Hibridizasyon İçin PCR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	3 dk
2	37°C	30dk

3.3.8. Mikroarray Hibridizasyonu

• Hibridizasyon için uygulanan PCR programı bittikten sonra her bir örnekten 100µl alınarak, hibridizasyon haznesine yerleştirilen contalı lam (Şekil 3.1.-A) üzerine yayılmıştır.

• Mikroarray slaytının, problemlerin bulunduğu kısmı aktif yüz olarak adlandırılır ve Şekil 3.1.-B’de gösterildiği gibi aktif yüz aşağı gelecek şekilde contalı lam üzerine yerleştirilip hibridizasyon haznesi sıkıştırılmıştır (Şekil 3.1.-C).



**Şekil 3.1. A) 4x180K Mikroarray Slaytı İçin Contalı Lam,
B) Mikroarray Slaytının Contalı Lam Üzerine Yerleştirilmesi,
C) Hibridizasyon Haznesinin Sıkıştırılması**

• Hibridizasyon haznesi 65°C’ye önceden ayarlanmış hibridizasyon fırınında bulunan rotator yuvasına yerleştirilmiştir. Denge için karşısına denk gelecek şekilde boş bir hazne daha yerleştirilmiştir.

• Rotator hızı 20 devir/dk’ ya ayarlanarak, 65°C’de 16-24 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

3.3.9.Hibridizasyon Sonrası Yıkama İçin Hazırlık

- Yıkama işleminde kullanılacak tüm malzemeler asetonitril ile yıkanıp, distile su ile durulanmıştır.
- Yıkama tamponu 2, optimum performans sağlaması için bir gece önce 37°C’de ayarlı olan etüve bırakılmıştır.
- Yıkama yapılmadan önce, cam tabak içerisine yıkama tamponu 1, mikroarray slaytının contalı lamdan çıkarılması için oda ısısında hazırlanmıştır.
- Bir başka cam tabak içerisinde yıkama tamponu 1 oda sıcaklığında, yıkama tamponu 2 37°C’ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir.
- Oda sıcaklığında asetonitril ve ozon solüsyonu hazırlanmıştır.

3.3.10.Hibridizasyon Sonrası Yıkama

- 16-24 saatlik hibridizasyon süresinin sonunda hibridizasyon haznesinden çıkarılan mikroarray slaytının yıkama tamponu 1 içerisinde contalı lamdan ayrılması sağlanmıştır.
- Mikroarray slaytı, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan yıkama tamponu 1 içerisinde 5 dk. bekletilmiştir. 5 dk sürenin sonunda 37°C’ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan yıkama tamponu 2 içerisine 1 dk bekletilmiştir.
- Mikroarray slaytı 10 saniye (sn) oda sıcaklığındaki asetonitrilde bekletilmiştir.
- Mikroarray slaytı 30 sn oda sıcaklığındaki ozon solüsyonunda bekletilmiştir.
- Yıkamalar sonucunda mikroarray slaytı, hibridizasyon sırasında oluşan yanlış bağlanmalardan temizlenmiştir.
- Mikroarray slaytı, lam tutucusuna ‘Agilent’ etiketi yani aktif yüzü üst tarafta kalacak şekilde yerleştirilmiş, ozon bariyer lam kapağı da kapatılarak lam tutucusuna uygun şekilde yerleştirilmiştir

3.3.11.Mikroarray Taratılması

Lam tutucu, tarayıcı cihaza (scanner) yüklenmiştir. Bağlı olduğu bilgisayardan ‘Scan Control’ programı kullanılarak slayt üzerindeki veri bilgisayara aktarılmıştır.

3.3.12.Kromozom Mikroarray Analizi

Tarama işlemi bittikten sonra aberasyonları analiz etmek için imaj dosyasından (.tiff) veri çıkartma ve log oranlarına dönüştürme işlemi yapmak amacıyla *Feature Extraction Software For Cytogenomics (versiyon 4.0.1.21)* yazılımı kullanılmıştır. Analizler ise *Agilent CytoGenomics (versiyon 4.0.2.21)* programında yapılmıştır.

3.3.12.1.Kopya sayısı varyasyonlarının değerlendirilmesi

Filtreleme: En az 5 prob bağlanan ve 50 kb'den büyük bölgeler değerlendirmeye alınmıştır.

Sınıflandırma: KSV'lerin sınıflandırılmasında aşağıda belirtilen kriterler dikkate alınmıştır:

İlgili KSV;

-Daha önce Database of Genomic Variants (DGV) veritabanında 5 çalışmadan fazla gösterilmişse,

-Toplumda %1'den fazla bulunuyorsa ve çalışmamıza dahil edilen kontrol grubu bireylerinde de saptanmış ise

-İlgili KSV bölgesi gen içermiyorsa, **benign** olarak sınıflandırılmıştır.

İlgili KSV:

-İyi bilinen bir mikrodelsiyon veya mikroduplikasyon sendromunun minimum kritik bölgesiyle tamamen örtüşüyorsa,

-Benzer bir fenotipe neden olduğu bilinen, dozaja duyarlı bir gen içeriyorsa **patojenik** olarak sınıflandırılmıştır.

İlgili KSV:

-Yukarıdaki kriterleri karşılamayan, normal popülasyonda <% 1 ve OMIM genleri içermeyen nadir KSV'ler, fonksiyonel analizlerle etkisi belirlenmemişse, **önemi belirsiz variant (VUS)** olarak sınıflandırılmıştır.

KSV'lerin uygun kriterlere göre sınıflandırılmasında;

1) Bölgenin gen içerip içermediği ve/veya bilinen bir sendromla yada bir DECIPHER girdisi ile örtüşüp örtüşmediği değerlendirilmiştir.

2) Bölgenin DGV'de polimorfik olarak kayıtlı olup olmadığı incelenmiştir. DGV ve DECIPHER veritabanlarında yoksa PubMed ve OMIM veritabanlarından bu bölgeler incelenerek, içerdiği genler ile hastalık patogenezi arasında ilişki kurulmuştur. Olgu grubunda tespit edilen ve kontrol grubunda gözlenmeyen önemli belirsiz varyantların (VUS) bulunması veya olgu grubunda patojenik / olası patojenik CVN'lerin tespit edilmesi durumunda olgunun birinci derece akrabaları da (hasta/sağlıklı) çalışmaya dahil edilmiştir.

Sonuçların yorumlanması için kurum içi veri tabanı ve aşağıdaki halka açık veri tabanları kullanılmıştır.

a. DGV (Database of Genomic Variants) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>),

b. DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources) (<http://decipher.sanger.ac.uk/>),

c. Cytogenomics Array Group CNV Database (<https://www.cagdb.org>),

d. UCSC (University of California, Santa Cruz) (<http://genome.ucsc.edu/>),

e. PubMed kapsayan NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

f. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (<http://omim.org/>)

3.3.13. İstatistiksel Analiz:

KSV oranlarının hasta ve kontrol grubunda frekanslarının belirlenmesi ve karşılaştırılması için ki-kare ve Fisher's exact testleri yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı Çocuk Kardiyolojisi Bilim dalına başvuran, ekokardiyografi ile değerlendirilip konjenital kalp hastalığı tanısı alan 0-18 yaş arası 40 hasta ve rutin ekokardiyografi sonrasında herhangi bir konjenital kalp hastalığına rastlanmamış olan benzer yaş ve cinsiyet grubundaki 24 kontrol dahil edilmiştir. Olguların detaylı anamnezleri ve dismorfolojik değerlendirilmeleri Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde yapılmış, Şekil 4.1.'de yer alan takip formu ile raporlanmıştır. Çalışma grubunda yer almaya uygun görülen olgulardan alınan periferik kan örneklerinde Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Sitogenetik seksiyonunda mikrodizin analizleri gerçekleştirilmiştir.

15.06.2019 Versiyon No:1

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı/ Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı
KONJENİTAL KALP HASTALIĞI ÇALIŞMASI HASTA TAKİP FORMU

15.06.2019 Versiyon No:1

AİLE AĞACI:

BAŞVURU TARİHİ: DOĞUM TARİHİ:
CİNSİYET:
DİSMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME:
ŞİKAYETİ:
FRENATAL/POSTNATAL ÖYKÜ:

ÖZGEÇMİŞ: EKOKARDİYOĞRAFI SONUCU:
KULLANDIĞI İLAÇLAR/OPERASYON ÖYKÜSÜ:
SOYGEÇMİŞ: FORMU DOLDURAN HEKİM SORUMLU ÖĞRETİM ÜYESİ

Şekil 4.1. Konjenital Kalp Hastalıkları Takip Formu

4.1. Olguların Demografik Özellikleri

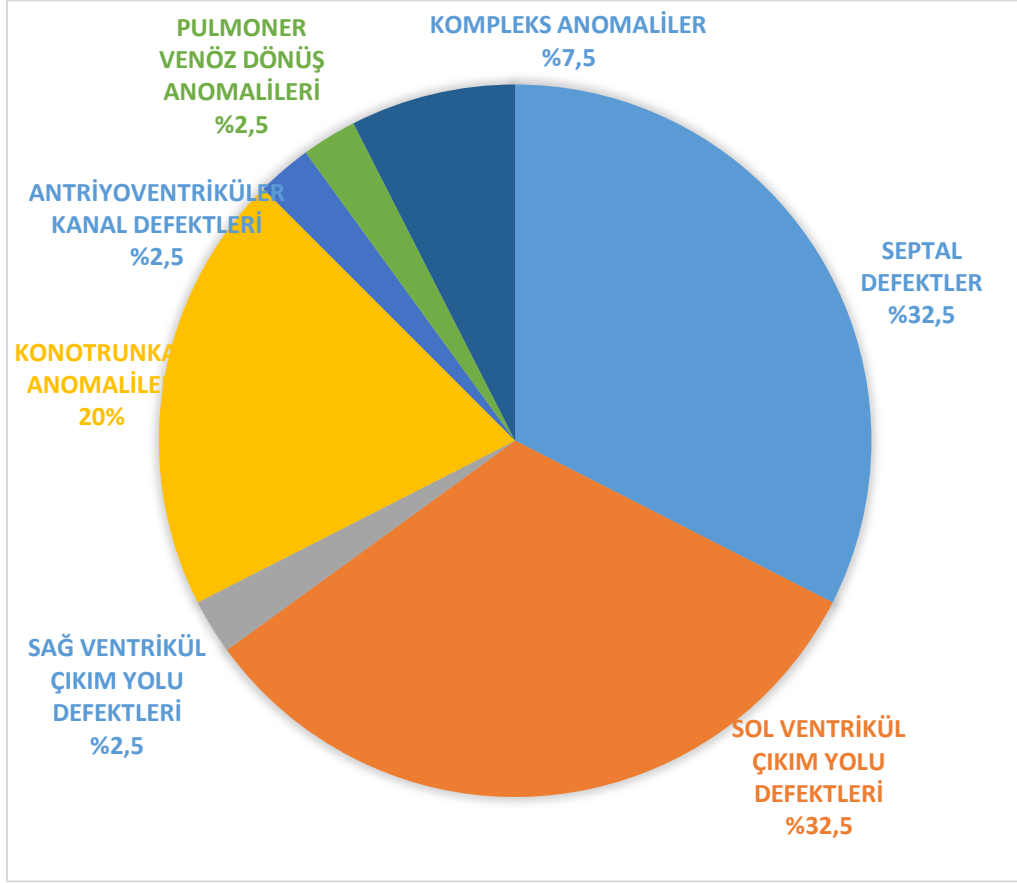
Çalışmamıza dahil edilen toplam 40 olgunun 22 (%55)'si erkek, 18 (%45)'i kızdır. Kontrol grubunda yer alan bireylerin 12'si erkek, 12'si kızdır (Tablo 4.1.). Hasta grubunun yaş ortalaması 6.53, kontrol grubunun yaş ortalaması ise 9 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. Olguların Cinsiyetlere Göre Dağılımı

OLGU	KONTROL	HASTA	TOPLAM
KIZ	12	18	30
ERKEK	12	22	34
TOPLAM	24	40	64

4.2. Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen hasta grubunda izlenen kardiyak defektler; 13 septal defekt (%32), 13 sol ventrikül çıkım yolu defekti (% 32,5), 8 konotrunkal anomali (%20), 3 kompleks kardiyak anomali (% 7,5) , 1 sağ ventrikül çıkım yolu defekti (% 2,5), 1 atriyoventriküler kanal defekti (% 2,5), 1 pulmoner venöz dönüş anomalisi (% 2,5) olarak sınıflandırılmış ve Şekil 4.2.'de grafik olarak verilmiştir.



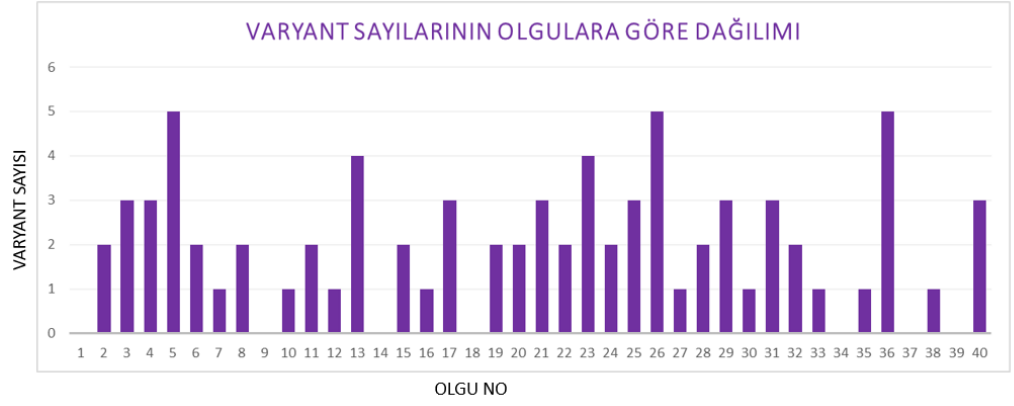
Şekil 4.2. Hasta Grubunda Saptanan Kardiyak Defektler Grafiği

4.3. Kontrol bireyleri ve KKH Olgularında Saptanan Varyantlar

Çalışmamızda 40 olgu ve 24 kontrol birey aCGH+SNP array yöntemi ile KSV'leri açısından araştırılmıştır. En az beş prob bağlanan ve 50kb'dan büyük olan bölgeler değerlendirmeye alınmıştır. Analizler sonucunda; kontrol ve araştırma gruplarında toplam 62 varyant saptanmıştır. Varyant sayılarını olgulara göre dağılımını gösteren grafik Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Bu grafiğe göre en fazla varyant saptanan olgularımız; 5., 26. ve 36. olgularımız olup bu olgularımızda beş varyant saptanmıştır. Olgularımızın klinik özellikleri sırasıyla septal defekt, konotrunkal anomali ve sol ventrikül çıkım yolu darlıklarıdır.

Saptanan varyantların beş (%8.06) tanesi kontrol grubunda da saptanmıştır. Araştırma grubunda 62 varyantın dokuz (%14.51) tanesi gen içermemektedir. Araştırma grubunda saptanan 38 (%61.29) KSV'nin DGV veritabanında yer aldığı saptanmış olup, bunların dışında kalan 15 (%24.19) varyant ise DECIPHER, OMIM,

NCBI ve UCSC veritabanları kullanılarak analiz edilmiştir. Saptanan KSV'ler aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 4.2.-4.5.).



Şekil 4.3. Varyant Sayılarının Olgulara Göre Dağılımı

Toplam beş kontrol grubu bireyinde 2q37.3, 8p23.1, 10q11.22 ve 11q22.1 lokuslarında KSV saptanmış olup bu varyantlar ACMG kriterlerine göre "benign" olarak sınıflandırılmıştır. 2q37.3, 8p23.1, 10q11.22 ve 11q22.1 lokus varyantları aynı zamanda KKH olgularının sekiz tanesinde de gözlenmiştir. Saptanan bu KSV'ler Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Kontrol Grubuyla Ortak Olarak Saptanan Varyantlar

LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ	SAPTANAN OLGULAR
2q37.3	Kayıp	29, 31
8p23.1	Kazanç	6, 19
8p23.1	Kayıp	22, 26, 36
10q11.22	Kayıp	27, 29, 36
11q22.1	Kayıp	20

4.3.1. Saptanan varyantların delesyon-kazanç durumları

Kontrol grubunda saptanan beş KSV'nin dört tanesi kayıp olup bir tanesi kazanç olarak saptanmıştır. Olgu grubunda ise 62 KSV'nin 28 tanesi kayıp, 34 tanesi kazanç olarak saptanmıştır.

4.3.2. DGV ile örtüşen varyantlar

DGV veritabanı verileri ile örtüşen lokuslardaki varyantlar, günümüzdeki bilgilerimizle benign olarak değerlendirilmesine rağmen ileride yapılacak çalışmalar ile elde edilecek verilere göre patojenitesinin değişmesi potansiyeli nedeniyle değerlendirmelerimize dahil edilmiştir. Olgularda DGV veritabanıyla örtüşen polimorfik varyantların lokusları, aberasyon çeşitleri ve içerdiği genler Tablo 4.3.'de verilmiştir. Bu polimorfik varyantlar DGV veritabanıyla örtüştüğü için ACMG kriterlerine göre "benign" varyant olarak değerlendirilmişlerdir.

Tablo 4.3. DGV'de Yer Alan ve Çalışmamızda Saptadığımız Polimorfik Varyantlar

OLGU NO	KKH TİPİ	LOKUS	BÜYÜKLÜK (bç)	ABERASYON ÇEŞİDİ	İÇERDİĞİ GENLER
5	ASD	1q21.2	191.469	Kayıp	<i>NBPF25P,</i> <i>FAM231D,</i> <i>LOC388692</i>
20	Aort koartasyonu		191.469		
25	BA		680.344		
4	ASD	1p13.3	336.036	Kazanç	<i>VAV3,</i> <i>MIR7852, VAV3-AS</i>
26	d-TGA	1p36.13	351.055	Kayıp	<i>NBPF1,</i> <i>CROCCP2,</i> <i>MST1P2</i>

29	Aort koartasyonu	2q37.3	150.772	Kayıp	<i>LINC01237, LINC01238, LOC285097</i>
31	TOF		183.689		
36	BA	2p25.3	191.02	Kazanç	<i>TMEM18, LINC01115</i>
13	VSD	5q13.2	1.824.295	Kazanç	<i>OCN, SNORD13B-2, SNORD13B-1, SNORD13B-1</i>
24	BA + Aort koartasyonu	6q22.31	775.002	Kazanç	<i>TRDN, TRDN- AS1, NKAIN2</i>
26	d-TGA	6p25.3	80.485	Kayıp	<i>DUSP22</i>
38	Aort koartasyonu	6p25.3	65.617	Kazanç	<i>DUSP22</i>
5	ASD	7p22.2	366.118	Kayıp	<i>SDK1</i>
17	Kompleks	7p14.1	58.643	Kayıp	<i>TRG-AS1</i>
2	VSD+ ASD	8q24.23	129.039	Kayıp	<i>LINC02055</i>
6	VSD		427.614	Kazanç	<i>FAM86B1, FAM86B2, FAM85A</i>
19	Sol ventrikül çıkım yolu darlıkları	8p23.1	427.514		
22	Kompleks		840.43	Kayıp	<i>DEFB4B, DEFB103B, DEFB103A</i>
26	d-TGA	8p23.1	515.244		

36	BA		910.431		<i>FAM66B, DEFB109B, USP17L1</i>
30	HSKS + Aort koartasyonu	8p11.21- p11.1	796.897	Kazanç	<i>POMK, HGSNAT, POTEA</i>
5	ASD	9p12- p11.2	372.118	Kazanç	<i>FAM74A7, SPATA31A6, CNTNAP3B</i>
7	ASD		335.761		
11	ASD		526.005		
19	Sol ventrikül çıkım yolu darlıkları		372.118		
29	Aort koartasyonu		372.118		
21	BA	9p12- p11.2	190.027	Kayıp	<i>FAM74A7, SPATA31A6</i>
28	TOF		291.471		
31	TOF		372.118		
40	BA		190.027		
22	Kompleks	9p12	898.198	Kayıp	<i>SPATA31A5, SPATA31A7, FAM74A1</i>
13	VSD	10q11.22	706.373	Kazanç	<i>GPRIN2, NPY4R, NPY4R2</i>
27	d-TGA	10q11.22	742.031	Kayıp	

29	Aort koarktasyonu		198.247		<i>LOC102724693, SYT15, GPRIN2</i>
36	BA		1.175.008		
20	Aort koartasyonu	10q23.33	131.864	Kayıp	<i>CYP2C18, CYP2C19</i>
23	Aort koartasyonu+ BA	10q26.3	200.962	Kazanç	<i>PAOX, MTG1, SPRN, SCART1</i>
32	Kompleks	10p15.3	392.501	Kazanç	<i>WDR37, LINC00200, ADARB2</i>
8	ASD	11q11	371.412	Kazanç	<i>TRIM48, TRIM51HP, OR4A16</i>
12	TPVDA	11p13-p12	1.078.675	Kazanç	<i>LDLRAD3, MIR3973, LOC101928510</i>
3	ASD	12q21.1	241.595	Kayıp	<i>TRHDE</i>
3	ASD	15q11.2	1.426.206	Kazanç	<i>LOC646214, CXADRP2, MIR3118-2</i>
5	ASD		2.282.338		
15	Aort koartasyonu	15q11.1-q11.2	2.216.88	Kazanç	<i>CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6</i>
22	Kompleks		2.282.338		
15	Aort koartasyonu	15q14	146.281	Kayıp	

17	Kompleks		105.498		<i>GOLGA8A, GOLGA8B, MIR1233-2</i>
5	ASD	16p11.2	1.091.959	Kayıp	<i>LOC390705, TP53TG3E, TP53TG3</i>
16	BAT		1.493.591		
24	Aort koartasyonu+ BA		1.324.925		
25	BA		1.493.591		
26	d-TGA		1.284.156		
32	Kompleks		1.493.591		
40	BA		1.324.925		
6	VSD		16p11.2- p11.1		
21	BA	1.004.17			
25	BA	261.602			
33	c-TGA	16p11.2	813.614	Kazanç	<i>ENPP7P13</i>
4	ASD	17q21.31	142.38	Kazanç	<i>NSFPI, ARL17A, LRRC37A2</i>
40	BA		142.38		
17	Kompleks	17q21.31	322.433	Kayıp	<i>KANSLI, KANSLI-AS1, ARL17B</i>
11	ASD	21q11.2	305.725	Kazanç	<i>MIR3156-3, LINC01674</i>

4	ASD	22q11.23-q12.1	230.959	Kayıp	<i>IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1</i>
10	ASD	Xp22.33	239.933	Kazanç	<i>PLCXDI, GTPBP6, LINC00685</i>

DGV veri tabanı ile örtüşen ve >2 olguda saptanan varyantlar sırasıyla; yedi olguda 16p11.2, üç olguda 1q21.2, üç olguda 10q11.22, üç olguda 16p11.1-p11.2, üç olguda 15q11.1-q11.2, 2 olguda 15q14, 2 olguda 17q21.31, 2 olguda da 2q37.3 lokuslarında KSV saptanmıştır. Olgulardan dokuz tanesinde 9p12-p11.2 lokusunda, DGV veritabanıyla örtüşen KSV polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Bu dokuz olgunun beşinde bu KSV kazanç olarak, dördünde ise kayıp olarak saptanmıştır. Olgulardan altı tanesinde 8p23.1 bölgesinde KSV saptanmış olup bu KSV aynı zamanda kontrol grubunda da gözlemlenmiştir. Bu altı olgunun dördünde kayıp, ikisinde kazanç olarak gözlenmiştir.

4.3.3. Gen İçermeyen Varyantlar

Gen içermeyen KSV'ler Tablo 4.4.'de gösterilmiş olup benign olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 4.4. Gen İçermeyen Varyantlar

OLGU NO	KKH TİPİ	LOKUS	BÜYÜKLÜK (bç)	ABERASYON ÇEŞİDİ
6	VSD	16p11.2	376.068	Kazanç
14	ASD	2q32.1	206.223	Kayıp
17	Kompleks	2p11.2	252.15	Kayıp
20	Aort koartasyonu	11q22.1	128.968	Kayıp
28	TOF	9p23	291.471	Kayıp
31	TOF	Xq25	177.18	Kayıp
34	ASD	6q25.2	119.039	Kazanç
37	BA+Aort Koartasyonu	2p11.2	726.016	Kayıp

38	Aort koartasyonu	5q23.3	243.807	Kayıp
----	------------------	--------	---------	-------

4.3.4. DGV İle Örtüşmeyen Ve Gen İçeren Varyantlar

Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.'de gösterilen, benign olarak sınıflandırılan, DGV veritabanında yer alan, gen içeriği olmayan KSV'lerin dışında kalan toplam 15 varyant Tablo 4.5.'de gösterilmiştir. Bu KSV'ler DECIPHER, OMIM, UCSC ve NCBI veritabanları kullanılarak analiz edilmiştir.

Tablo 4.5. DGV'de Yer Almayan ve Gen İçeren Diğer Varyantlar

OLGU NO	KKH TİPİ	LOKUS	BÜYÜKLÜK (bc)	ABERASYON ÇEŞİDİ	İÇERDİĞİ GENLER
2	VSD+ASD	4q13.2	206.91	Kayıp	<i>TMPRSS11E, UGT2B17</i>
3	ASD	2q37.3	150.772	Kayıp	<i>LINC01237, LINC01238, LOC285097</i>
8	ASD	2q37.1	161.235	Kayıp	<i>LINC01891</i>
13	VSD	6p25.3	55.749	Kazanç	<i>FOXCUT</i>
		17q25.3	272.22	Kazanç	<i>CCDC137, ARL16, HGS</i>
21	BA	Xp21.1	400.913	Kazanç	<i>CFAP47, LOC101928627</i>
23	Aort koartasyonu +BA	3q13.13	267.945	Kazanç	<i>LINC01205, MIR4445</i>
		3q13.31	358.299	Kazanç	<i>LINC00903, TUSC7, MIR4447</i>
		8q24.11	81.09	Kazanç	<i>EXT1</i>
26	d-TGA	4q32.1	166.784	Kazanç	<i>ASIC5, TDO2, CTSO</i>
28	TOF	Xq21.31-q21.32	638.515	Kazanç	<i>PCDH11X, MIR4454</i>
31	TOF	18q12.1	695.085	Kazanç	<i>MIR302F</i>
35	BA	19p13.3	169.936	Kayıp	<i>ZNF556, ZNF57, ZNF77</i>
36	BA	6q27	98.904	Kazanç	<i>SMOC2</i>
		13q21.32	95.998	Kazanç	<i>PCDH9, PCDH9-AS2, PCDH9-AS3</i>

Tablo 4.5.'de belirtilen ve DECIPHER, OMIM, UCSC ve NCBI veri tabanları kullanılarak analiz edilen varyantlardaki gen içerikleri değerlendirildiğinde, ilgili gen içeriklerinin doğrudan KKH ile bağlantısı kurulamamış olup tartışma kısmında ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

4.3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 4.7. Toplam Saptanan Varyanta Göre Olgu/Kontrol Sayıları ve p Değeri

	KSV		Toplam	p
	Saptanan	Saptanmayan		
Kontrol	5	19	24	0.000243
Olgu	33	7	40	
Toplam	38	26	64	

Çalışmamızda elde edilen veriler ile toplam saptanan varyant sayılarına göre ki-kare analizi sonucunda, kontrol ve olgu grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 4.7.). ($p=0.000243$)

Tablo 4.8. DGV İle Örtüşmeyen Varyantların Olgu/Kontrol Sayıları ve p Değeri

	KSV		Toplam	p
	Saptanan	Saptanmayan		
Kontrol	0	24	24	0.005
Olgu	11	29	40	
Toplam	11	53	64	

Tablo 4.8.'de DGV ile örtüşmeyen varyantların olgu/kontrol sayıları ve ki-kare analizi sonucunda ulaşılmış olan p değeri verilmiştir. Ki-kare analizine göre DGV ile örtüşmeyen varyantlar için kontrol ve olgu grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.005$).

5. TARTIŞMA

5.1. Çalışmamıza Ait Demografik ve Klinik Verilerinin Literatürle Karşılaştırılması

Konjenital kalp hastalıkları toplumda en sık görülen konjenital malformasyonlar olup, yaklaşık %1-1.2 yenidoğanı etkilemektedir. Konjenital kalp hastalıkları tedavi ve izlem açısından hem hasta birey üzerinde hem de toplum üzerinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Terapötik ilerlemelere rağmen, KKH yüksek oranda uzun süreli morbidite ile ilişkilidir. Herhangi bir konjenital malformasyon veya nörogelişimsel geriliğin eşlik etmediği KKH, izole/non-sendromik konjenital kalp hastalıkları olarak sınıflandırılmaktadır ve tüm KKH olgularının %80'nini oluşturmaktadır (Blue vd., 2018).

Çalışmamızda, non-sendromik KKH tanısı alan 40 olguda mevcut olan kardiyak anomaliler sırasıyla septal defektler (%32.5), sol kalp çıkım yolu defektleri (%32,5), trunkal anomaliler (%20), kompleks kardiyak anomaliler (%7,5), sağ kalp çıkım yolu defektleri (%2,5), pulmoner venöz dönüş anomalileri (%2.5) ve atriyoventriküler kanal defektlerinden (%2.5) oluşmaktadır. Pedyatrik kardiyoloji polikliniğine başvuru yoğunluğuna göre çalışmaya dahil edilen hastalarda saptanan kardiyak anomali oranları, literatürle uyumlu olacak şekilde en sık septal defektler, sol kalp çıkım yolu defektleri ve bunları takip eden trunkal anomaliler olarak sıralanmaktadır (Kelly & Editors, y.y.).

5.2. Çalışmamızda Saptanan Varyant Verilerinin Literatür Verileri ile Karşılaştırılması

KKH gelişiminin altında yatan genetik mekanizmalar kompleks mekanizmalardır ve etiyoloji henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bilinen genetik nedenler arasında, kromozomal anöploidiler, kopya sayısı varyasyonları ve *de novo* veya kalıtsal olabilen nadir ve yaygın tek nükleotid değişimleri yer almaktadır. KKH'lı hastalarda, % 8-12 oranında kromozomal anomali ve anöploidiler, % 3-25 oranında kopya sayısı varyasyonları ve % 3-5 oranında tek gen defektleri görülmektedir (Nees & Chung, 2019a). Kopya sayısı varyasyonlarını değerlendirdiğimiz çalışmamızda saptadığımız bu değişimlerin KKH kliniği ile ilişkisini değerlendirirken farklı veri

tabanlarından yararlanılmıştır. Bunlar; sağlıklı bireylerde gözlenen polimorfik varyantları içeren DGV veritabanı ve hasta bireylerde saptanan varyantları içeren DECIPHER veri tabanıdır. Ayrıca KSV saptadığımız kromozomal bölgenin içerdiği genler için OMIM, PubMed ve UCSC veritabanları kullanılmış ve olguların klinik bulguları ile saptanan KSV'lerin ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda saptadığımız toplam varyant sayısı 62'dir. Bu varyantların beş (%8.06) tanesi kontrol grubunda da saptanmıştır. Araştırma grubunda saptanan varyantlardan dokuz (%14.51) tanesi gen içermezken, 38 (%61.29) tanesinin DGV veritabanında da yer aldığı görülmüştür. Bunların dışında kalan 15 (%24.19) varyant ise içerdikleri genler açısından doğrudan KKH ile ilişkili bulunamamıştır.

5.2.1.DGV veritabanıyla örtüşen KSV'ler

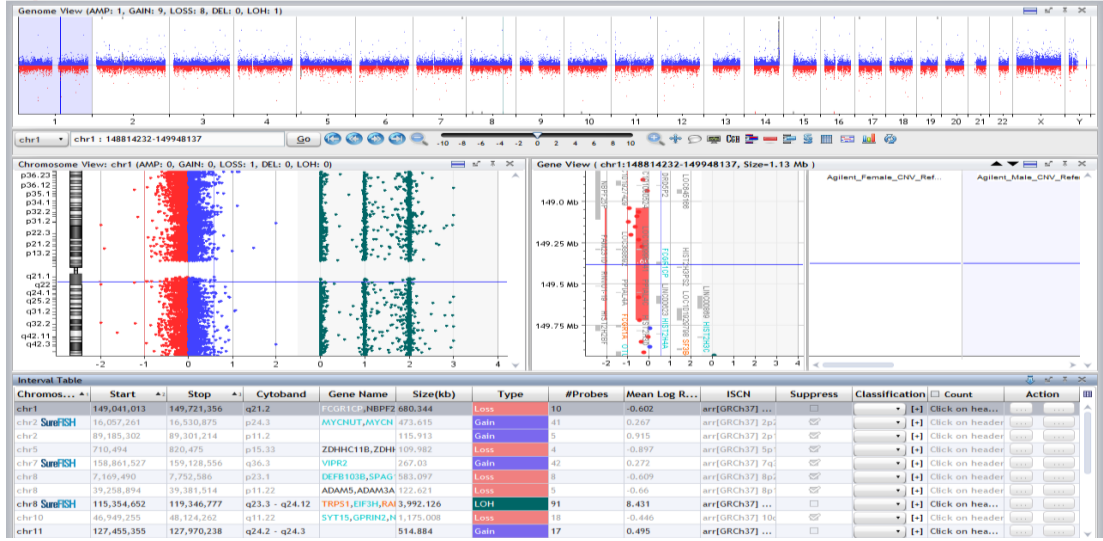
Çalışmada saptanan ve DGV veritabanında yer alan ve en az iki olguda ortak olarak saptanan varyantlar ve lokuslardaki gen içerikleri Tablo 5.1.'de verilmiştir. Bu KSV'ler günümüzdeki veriler doğrultusunda "benign" olarak sınıflandırılmaktadır. Fakat ileride yapılacak çalışmalar ışığında elde edilecek yeni verilerle patojenite klasifikasyonunun değişmesi ihtimali nedeniyle özellikle fazla olguda saptanan ve içerdikleri genler açısından KKH ile ilişkili olabileceği düşünülen varyantlar çalışmamızda tartışılmıştır.

Tablo 5.1. DGV Veritabanında ≥ 2 Olguda Saptanan KSV'ler

KSV SAPTANAN OLGU SAYISI	LOKUS	ABERASYON ÇEŞİDİ	GEN İÇERİĞİ
7	16p11.2	Kayıp	<i>LOC390705,</i> <i>TP53TG3E,</i> <i>TP53TG3</i>
5	9p12-p11.2	Kazanç	<i>FAM74A7,</i> <i>SPATA3IA6,</i> <i>CNTNAP3B</i>
4	9p12-p11.2	Kayıp	<i>FAM74A7,</i> <i>SPATA3IA6</i>

3	1q21.2	Kayıp	<i>NBPF25P, FAM231D, LOC388692</i>
3	15q11.1-q11.2	Kazanç	<i>CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6</i>
3	16p11.2-p11.1	Kazanç	<i>LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP</i>
3	8p23.1	Kayıp	<i>DEFB4B, DEFB103B, DEFB103A, FAM86B1-B2, FAM85A, FAM66B, DEFB109B, USP17L1</i>
2	8p23.1	Kazanç	<i>FAM86B1, FAM86B2, FAM85A</i>
3	10q11.22	Kayıp	<i>LOC102724693, SYT15, GPRIN2</i>
2	2q37.3	Kayıp	<i>LINC01237, LINC01238, LOC285097</i>
2	15q14	Kayıp	<i>GOLGA8A, GOLGA8B, MIR1233-2, MIR1233-1</i>
2	17q21.31	Kazanç	<i>KANSLI, KANSLI- AS1, ARL17B, NSFP1, ARL17A, LRRC37A2</i>

Çalışmamızda ASD, Aort koartasyonu ve BA tanısı alan üç olguda 1q21.2 bölgesi delesyonu saptanmış olup mikroarray sistemindeki görüntüsü Şekil 5.1.'de verilmiştir. Hemen komşu olan bölge 1q21.1, KKH'nın majör özellik olduğu 1q21.1 delesyon sendromu (OMIM612474) bölgesidir. Bu bölge delesyon ve kazançlarında KKH ortak anomalidir (Saliba vd., 2020). Ancak 1q21.2 bölgesine ilişkin KSV'lerle bağlantılı KKH rapor edilmemiştir. Ancak bu bölgede lokalize olan *NBPF25P* geni her üç olguda da delesyonludur. Bu gen *NBPF25* geninin bir psödogenidir ve nöroblastoma kırık noktası ailesi (NBPF) üyesidir ve DUF1220 protein domainlerinin tandem tekrarları ile karakterizedir. DUF1220 domainleri aslında beyin hücrelerinde insan nöral kök hücrelerindeki proliferasyonundan sorumludur. Ancak bu domain ailesinin özellikle lokalize olduğu 1q21.1 bölgesindeki KSV'ler, içlerinde KKH'nın da dahil olduğu, mikrosefali, makrosefali, kognitif yetersizlik gibi farklı klinik özelliklerle ilişkilendirilmiştir (Christiansen vd., 2004)(Dumas vd., 2012). Her ne kadar DGV'de yer alan bir varyant olsa da bu gen delesyonunun KKH ile ilişkisi nedeniyle yakından takip edilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.



Şekil 5.1. Olgu 25'te Görülen 1q21.2 Bölgesinde Saptanan KSV'nin Mikroarray Sistemindeki Görüntüsü

ASD, Aort koartasyonu, BA, TOF ve kompleks tip KKH olan dokuz olguda 9p12-p11.2 lokusunda, DGV veritabanıyla örtüşen kopya sayısı varyantı polimorfik olarak değerlendirilmiş ve benign olarak sınıflandırılmıştır. Bu dokuz olgunun beşinde

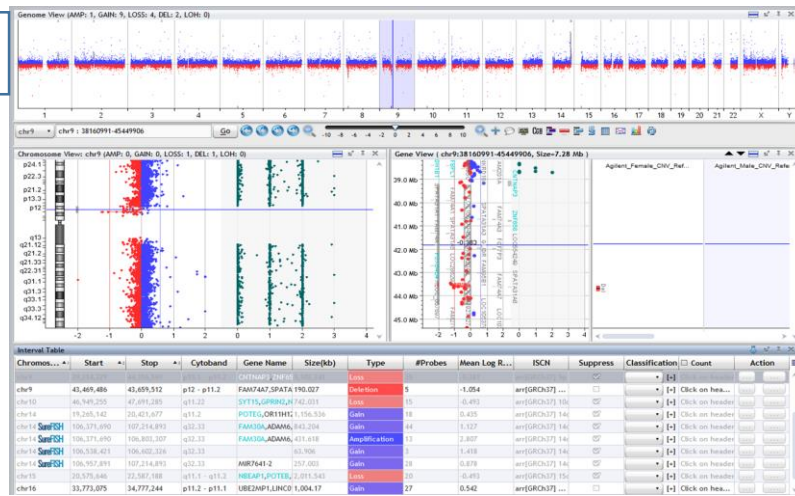
bu kopya sayısı varyantı kazanç olarak, dördünde ise kayıp olarak saptanmıştır. Saptanan varyantların mikroarray analiz sistemindeki görüntüleri Şekil 5.2.'de verilmiştir. Kromozom 9p12-p11.2 lokalize *FAM74A7*, dört olguda kayıp, beş olguda kazanç olarak gözlenmiştir. Bu gen 5.99 kb büyüklüğünde ve iki ekzondan oluşan fonksiyonel ve klinik önemi tam bilinmemeyen bir uzun kodlanmayan RNA (IncRNA)'dır (<https://decipher.sanger.ac.uk/search/genes?q=FAM74A7>).

IncRNA'lar, posttranskripsiyonel kontrol işlevleri nedeniyle epigenetik yapıyı değiştirerek gen ekspresyonunu etkileyebilirler (Lalith, Richard, Johan, & Eichhorn, 2018). *FAM74A7* geni bir IncRNA geni olduğu için KKH'ın epigenetik kontrolünde rolü olabileceği göz önünde bulundurularak takip edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

A



B



Şekil 5.2. Olgu 5 ve 21’de Görülen 9p12-p11.2 Bölgesinde, (A) Kazanç Olarak Saptanan, (B) Kayıp Olarak Saptanan KSV’lerin Mikroarray Sistemindeki Görüntüleri

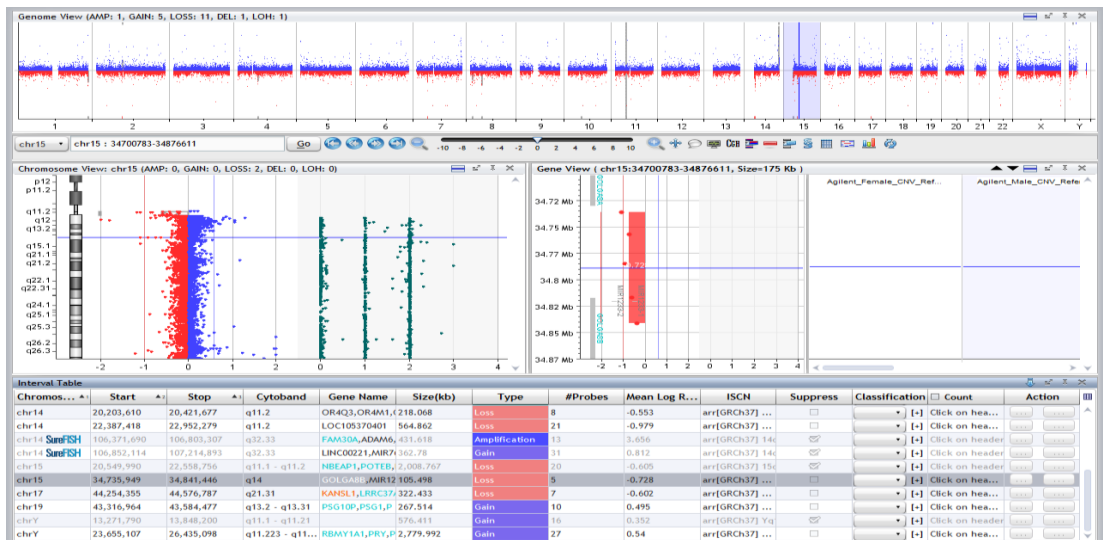
DGV veritabanıyla örtüşen 15q14 lokusundaki kopya sayısı varyasyonu, iki olguda ortak olarak saptanmış olup benign olarak sınıflandırılmıştır. 15q14 lokusu *GOLGA8A*, *GOLGA8B*, *MIR1233-1* VE *MIR1233-2* genlerini içermektedir. Bu lokusta saptanan KSV’nin analiz sistemindeki görüntüsü Şekil 5.3.’te verilmiştir. *GOLGA8A* geninin kodladığı protein, hücre içinde golgi apartında de lokalize olan Golgin A8 ailesi A grubu üyesi bir protein kodlamaktadır. Ekspresyon çalışmalarında daha önce kalp, beyin, böbrek karaciğer dokularında tespit edilmiştir ancak literatürde daha önce sadece intraserebral kanama geçiren olguların kanında bu protein miktarında artış olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2018). *MIR1233-1* geni ve *MIR1233-2* genleri

mikroRNA kodlayan genler olup her ikisinde birer ekzondan oluşmaktadır. Bu mikroRNA'ların fonksiyonları ile ilgili herhangi bir literatür verisine ulaşamamıştır. Ancak mikroRNA'ların epigenetik kontrol görevleri olabileceği için KKH ile ilişkisi bulunabileceğinden yakından takip edilmesi gerekmektedir (Bernardo, Ooi, Lin, & McMullen,

2015).

(https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core:g=ENSG00000221065;r=15:34528290-34528371;t=ENST00000408138.)

(https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000221649;r=15:34382069-34382150;t=ENST00000408722)



Şekil 5.3. Olgu 17’de Görülen 15q14 Bölgesinde Saptanan KSV’nin Mikroarray Sistemindeki Görüntüsü

Çalışmamızda yedi olguda kayıp ortak olarak saptanan 16p11.2 lokusundaki kopya sayısı varyantı DGV veritabanında yer aldığı için polimorfik olarak değerlendirilip benign olarak sınıflandırılmıştır. Bu bölgenin mikroarray analiz sistemindeki görüntüsü Şekil 5.4.’te gösterilmiştir. Bu bölgede yer alan *LOC390705* geni dört ekzondan oluşan bir protein fosfotaz regülatuar beta subuniti kodlayan genin psödogeni olup literatürde fonksiyonu ve hastalıklarla ilişkisi üzerine herhangi bir veriye ulaşamamıştır. Psödogenlerin, mRNA stabilitesini ve gen ekspresyonlarını düzenledikleri bilindiği için KKH yönünden yakından takip edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz (Xiao-jie, Ai-mei, Li-juan, & Jiang, 2015) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LOC390705>). *TP53TG3* geni

ise protein kodlayan bir gen dir ve TP53 geninin hedef proteini 3 tip A-E alt ün itelerini kodlamak ta ve TP53 geni aracılı siny al aktivasyon unda rol oyn adı ğı düşün ülm ektedir. İlgili gen in literatür de fonksiy onu ve hastalıklarla iliş kisi üzer ine herhangi bir veriy e ulaş ılamam ıştır (Barber vd., 2012) (Ng vd., 1999).



Şekil 5.4. Olg u 16'da Görü len 16p11.2 Bölgesinde Saptanan KSV'nin Mikroarray Sistemindeki Görüntüsü

Çalışmamızda 8p23.1 lokusunda yedi olguda (iki kontrol olgusu ve beş araştırma olgusu (olg u 6, 19, 22, 26, 36)) saptanan KSV (iki olguda kazanç, üç olguda kayıp) bizim çalışmamızdaki bölgelerle tam örtüşmemekle birlikte Tomita ve ark tarafından da rapor edilmiştir. İlgili çalışmada 945 KKH olgusundan 135'inde kromozomal anomalisi saptanmıştır. Geriye kalan 810 olgu KSV'ler açısından mikrodizin yöntemleriyle (Affymetrix SNP 6.0 Array) değerlendirilmiş ve 35 olguda (% 4,3) KSV tespit edilmiştir. Bu olguların dört tanesinde 8p23.1 lokusunda KSV (kayıp) saptanmıştır. Saptanan bu KSV içeriğinde embriyonik hayatta kardiyogenezde önemli rol oyn adı ğı bilinen GATA4 geni yer almaktadır (Tomita-mitchell vd., 2020). GATA4 geni gelişmekte olan kalp dokusunda, erişkin kalp kas hücrelerinde, pankreas, over gibi pek çok dokuda GATA6 ile birlikte eksprese olmaktadır. GATA4 geni myokardiyal diferansiyasyonundan sorumludur. GATA4 geninin fonksiy on kayb ettiren patojenik varyantları, kardiyak septal defektler, kardiyak çıkım yolu defektleri, biküspid aorta ve ventriküler septal defektlere neden olmaktadır (Report,

2005) (Kelly & Editors, y.y.). Bizim çalışmamızda olgu ve kontrol gruplarında 8p23.1 lokusunda saptanan KSV'de GATA4 geni içermemektedir. Ancak, kromozom 8p23.1 delesyonları 8p telomere kadar uzanan geniş delesyonlar olarak görülebilmektedir. Konvansiyonel kromozom analizi ile saptanabilen delesyonların yanısıra mikrodelesyonlar da rapor edilmiştir. Olgularda saptanan klinik özellikler başta diafragmatik herni ve KKH olmak üzere çok çeşitlidir. Kardiyak defektler olguların %94 kadarında gözlenmekte olup izole septal defektlerden fallot tetralojisi ve hipoplastik sol kalp sendromu gibi çok daha kompleks anomalileri içeren bir heterojenite sözkonusudur. Yukarıda da belirtildiği gibi yüksek sıklıkta gözlenen KKH'nda GATA4 transkripsiyon faktörünün anormal ekspresyonu önemli bir rol oynamaktadır. GATA4 haployetmezliği, hayvan modelleri ile septal defektin gözleendiği olgularda non-sendromik KKH etyolojisinde tanımlanmaktadır. 8p23.1 delesyonlarının saptandığı olgularda, sadece GATA4 gen mutasyonu saptanan olgulardaki KKH'ye göre daha kompleks ve ağır kalp defektleri gözlenebilmektedir. Dolayısıyla, bu bölgede lokalize olan diğer genler de KKH fenotipinde rol oynamaktadırlar. Örneğin SOX7 transkripsiyon faktör geni haployetmezliği GATA4 gibi etki gösterebilmektedir (Saliba vd., 2020). Olgularımızda saptanan mikrodelesyonların KKH gelişimi üzerinde herhangi bir etkisi olduğu konusunda kesin bir kanıya varılamamış olmakla birlikte araştırma grubunda daha sık gözlenmesi ve farklı araştırmalarda da bu lokusun bildirilmesi nedeniyle lokalize genlerin etkilerine ilişkin verilerin takip edilmesi gerektiği kanısındayız.

5.2.2.DGV veritabanıyla örtüşmeyen KSV'ler

Popülasyonda daha önce sıklıkla bildirilen KSV'lerin yer verildiği DGV veritabanında saptanmamış olan KSV'ler literatür taramaları ile detaylı olarak değerlendirilerek KKH'larla ilişkisi açısından yorumlanmıştır. Genomik varyantların yer aldığı DGV veritabanında olmayan ve OMIM genleri içeren kopya sayısı varyantlarını tespit ettiğimiz olgular Tablo 5.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. Saptadığımız Polimorfik Olmayan KSV'lerin İçerdiği OMIM Genleri

OLGU NO	LOKUS	BÜYÜKLÜK (kb)	ABERASYON ÇEŞİDİ	İÇERDİĞİ OMIM GENLER
2	4q13.2	206.91	Kayıp	<i>TMPRSS11E, UGT2B17</i>
13	6p25.3	55.749	Kazanç	<i>FOXCUT</i>
	17q25.3	272.22	Kazanç	<i>CCDC137, ARL16, HGS</i>
23	3q13.31	358.299	Kazanç	<i>TUSC7</i>
	8q24.11	81.09	Kazanç	<i>EXT1</i>
26	4q32.1	166.784	Kazanç	<i>ASIC5, TDO2, CTSO</i>
28	Xq21.31-q21.32	638.515	Kazanç	<i>PCDH11X</i>
35	19p13.3	169.936	Kayıp	<i>ZNF77</i>
36	6q27	98.904	Kazanç	<i>SMOC2</i>
	13q21.32	95.998	Kazanç	<i>PCDH9</i>

Çalışmamızda olgu no 2'de 4q13.2 lokusunda *TMPRSS11E*, *UGT2B17* OMIM genlerini içeren mikrodelyasyon saptanmıştır. *TMPRSS11E* (Transmembran Serin Proteaz 11E) geni, serin tipi endopeptitaz aktivitesini ve serin tipi peptitaz aktivitesini içermektedir. Hem jelatinolitik hem de kazeinolitik aktivitelere sahip bir serin proteazdır. Bu gen ile ilişkilendirilmiş henüz herhangi bir hastalık/anomali bildirilmemiş olup bu lokus ile ilgili incelenen veritabanlarında, KKH ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir veriye ulaşılmamıştır. Bu yüzden **benign** olarak sınıflandırılmıştır (Hobson vd., 2017).

VSD ile gelen 13 nolu olguda *FOXCUT* OMIM genini içeren 6p25.3'te mikroduplikasyon saptanmıştır. *FOXCUT* (FOXC1 Upstream Transkript) geni bir RNA genidir ve lncRNA sınıfına bağlıdır. *FOXCUT* ile ilişkili hastalıklar arasında Oral Skuamöz Hücreli Karsinom ve Nazofarengeal Karsinom bildirilmiştir. KKH ile doğrudan ilişkilendirilmese de lncRNA'ların, KKH'nin epigenetik kontrolünde rolü olabileceği göz önünde bulundurularak takip edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz (Pan vd., 2014).

Aynı olguda 17q25.3 kromozomal lokusunda *CCDC137*, *ARL16*, *HGS* OMIM genlerini içeren bölgede de kazanç saptanmıştır. *ARL16* (ADP Ribosylation Factor Like GTPase 16) geni tarafından kodlanan protein, yapısal olarak ADP-ribosilasyon faktörleri ile ilişkili olan ARL protein ailesindedir. Bu protein hücrel antiviral yanıtta inhibe edici bir role sahiptir. Çocukluk Başlangıçlı Şizofreni ve Eksüdatif Vitreoretinopati5 hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (Yang vd., 2011). HGS geni tarafından kodlanan proteinin membran reseptörlerinin oluşumu ve degradasyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Ancak KKH ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir veriye ulaşılmadığı için **benign** olarak sınıflandırılmıştır.

Çalışmamızda olgu no 23'te 3q13.31 kromozomal lokusunda kazanç saptanmıştır. Bu bölgenin mikroarray analiz sistemindeki görüntüsü Şekil 5.5'te verilmiştir. KSV saptanan bölge *TUSC7* OMIM genini içermektedir. *TUSC7* (Tümör Supresör Aday 7), bir RNA genidir ve lncRNA sınıfına bağlıdır. Çeşitli hücrel süreçleri düzenlemektedir. Transkripsiyon için sinyal görevi, transkripsiyon faktörleri veya mikroRNA'lar için engelleyici bir faktör olarak, kromatin değiştirici enzimleri hedef genlere yerleştirmek için kılavuzlar olarak işlev görebilirler. *TUSC7* ile ilişkili hastalıklar arasında Konjestif Kalp Yetmezliği ve Osteojenik Sarkom bildirilmiştir (Pasic vd., 2010)(Liu vd., 2013). Her ne kadar KKH ile doğrudan ilişkilendirilmemiş olsa dahi bu gen lncRNA sınıfına bağlı olduğu ve KKH'in epigenetik kontrolünde rolü olabileceği göz önünde bulundurularak takip edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



Şekil 5.5. Olgu 23'te Görülen 3q13.31 Lokusunda Saptanan KSV'nin Analiz Sitemindeki Görüntüsü

Aynı olguda 8q24.11'de lokalize EXT1 OMIM genini içeren lokusta da mikrodüplikasyon saptanmıştır. *EXT1* (Exostosin Glycosyl transferase 1) geni, heparin sülfat biyosentezinin zincir uzatmasında yer alan endoplazmik retikulum yerleşik tip 2 transmembran glikosil transferazı kodlamaktadır. Bu gen ile egzostos ve kondrosarkom hastalıkları ilişkilendirilmiş olup bu hastalıklar açısından morbid gen olarak bildirilmiştir (Takata, Jaime, & Claudio, 2018)(Alvarez, Tredwell, M, & The, 2006)(Francannet, Merrer, Munnich, Bonaventure, & Génétique, 2001). Ancak KKH ile ilgili herhangi bir veriye ulaşılamadığı için **benign** olarak sınıflandırılmıştır.

Olgu no 26'da 4q32.1 lokusunda kazanç saptanmıştır. Bu lokusta *ASIC5*, *TDO2*, *CTSO* OMIM genleri lokalizedir. *ASIC5* (Asit Algılayıcı İyon Kanalı 5) geni, dejenerin/epitelyal sodyum kanalı (DeG/ENaC) protein ailesinin bir üyesidir ve bağırsakta ekspre olmaktadır. Bu ailenin üyeleri, hücre içi N ve C terminalleri, iki hidrofobik transmembran (TM) bölgeleri ve korunmuş aralıklı birçok sistein kalıntısına sahip büyük bir hücre dışı döngü içeren amiloride duyarlı sodyum kanallarıdır. Her hangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir (Y, Schaefer, Sakai, & Lingueglia, 2000). *TDO2* (Triptofan 2,3-Dioksijenaz) geni ise triptofan metabolizmasında kritik bir rol oynayan bir heme enzimini kodlamaktadır. Triptofan katabolitik nurenini (kyn), triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO) yoluyla insan tümör

hücreleri tarafından yapısal olarak üretilen insan aril hidrokarbon reseptörünün (AHR; 600253) endojen bir ligandı olarak tanımlanmıştır. TDO'dan türetilmiş kyn, anti tümör immün yanıtlarını baskılar ve bir otokrin/parakrin tarzında AHR yoluyla tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve hareketliliğini destekler. TDO-AHR yolu, insan beyin tümörlerinde aktiftir ve kötü huyluluğu ilerleme ve kısa survi ile ilişkilidir. *TDO2* ile ilişkili hastalıklar arasında hipertriptofanemi ve Porfiri de bildirilmiştir. Aynı zamanda bu gendeki tek nükleotid polimorfizmleri otizm ile ilişkilendirilmiştir (Opitz vd., 2011). Ancak kalp defektleri ile ilişkisi rapor edilmemiştir. *CTSO* (Cathepsin O) geni, papain süper ailesinin bir üyesini kodlayan sistein proteazdır. Bu proteolitik enzim, hücrel protein parçalanması ve dönüşümünde rol oynamaktadır. Orofasial Dijital Sendrom ile ilişkilendirilmiştir (Velasco, 2014). Bu lokus ile ilgili incelenen veritabanlarında, KKH ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Bu yüzden **benign** olarak sınıflandırılmıştır.

Çalışmamızda olgu no 28'de 13q25.32'de *PCDH9* OMIM genini içeren lokusta kazanç saptanmıştır. *PCDH9* (Protokadherin 9) geni, kaderin alanlarını içeren transmembran proteinlerin protokadherin ailesinin bir üyesini ve kaderin süper ailesini kodlamaktadır. Bu proteinler, kalsiyum varlığında sinir dokularında hücre yapışmasına aracılık ederek nöronal sinaptik bağlantıların sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Bu gen, işitsel nöropati hastalığı ile ilişkilendirilmiş olup KKH ile herhangi bir ilişkilendirilme yapılamadığı için **benign** olarak sınıflandırılmıştır (Grati vd., 2009).

Çalışmamızda 35 nolu olguda kromozom 18q12.1 bölgesi delesyonu saptanmıştır. Bu lokusta lokalize *ZNF77* (Zinc Finger Protein 77) OMIM geninin transkripsiyonel düzenlenmede rol oynadığı, morbid bir gen olmadığı ve tüberküloz epididimit ile anorektal darlık gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. *ZNF77* geni doğrudan KKH ile ilişkilendirilemese de transkripsiyonel düzenlemede görev aldığı için KKH'larında da görev alabileceği için yakından takip edilmesi gerektiği düşünülmektedir (Huebner vd., 1993) (Huttlin vd., 2017).

Çalışmamızda olgu 36'da 6q27 lokusunda *SMOC2* OMIM genini içeren bölgede kazanç saptanmıştır. *SMOC2* (SPARC İlgili Modüler Kalsiyum Bağlama 2) geni, embriyogenez ve yara iyileşmesi sırasında yüksek oranda ifade edilen SPARC ailesi

üyesidir. Gen ürünü asidik ve sistein/osteonektin/BM-40 bakımından zengin bir proteindir ve endotel hücre proliferasyonu ile anjiyogenik aktiviteyi uyarmaktadır. Kodlanan proteinin, tümör büyümesinde ve miyokardiyal iskemide anjiyogenezin kontrol edilmesinde görev alabileceği bildirilmiştir. KKH'larında anjiyogenezin kontrolü büyük bir öneme sahip olduğu için bu genin KKH'lar açısından yakından takip edilmesi gerektiği düşüncesindeyiz (Jamet vd., 2011). Aynı olguda Xq21.31-q21.32 kromozom bölgesinde, *PCDH11X* OMIM genini içeren bir mikrodüplikasyon da gözlenmiştir. *PCDH11X* (Protokadherin 11, X-linked) geni, kaderin ailesinin bir alt ailesi olan protokadherin gen ailesine aittir. Kodlanmış protein, 7 kaderin tekrarı içeren hücre dışı bir alandan, bir transmembran alanından ve klasik kadherinlerden farklı olarak bir sitoplazmik kuyruktan oluşmaktadır. Proteinin, merkezi sinir sisteminin segmental gelişimi ve işlevi için gerekli olan hücre-hücre tanınmasında temel bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu gen varyantlarının gelişimsel disleksi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. KKH için herhangi bir veriye ulaşılamadığından dolayı **benign** olarak sınıflandırılmıştır (Lopes, Ross, Close, & Crow, 2006).

Çalışmamızın diğer literatür verileriyle karşılaştırılması Tablo 5.3'te özetlenmiş olup sadece izole KKH olguları ile çalışmalarını yapan araştırmacı gruplarının çalışmaları ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Tablo 5.3. Çalışmamızın Literatür Verileri İle Karşılaştırılması

Çalışma	Olgu Sayısı	Sendromik / İzole KKH	Array Tipi	KSV oranı / sınıflandırması
(Erdogan vd., 2008)	105 KKH	İzole KKH	1x244K Agilent arrays	5/105 (%4,7) Patojenik
(Greenway vd., 2009)	114 KKH (ToF) 98 kontrol	Sendromik + İzole	Affymetrix SNP 6.0	11/114 (%9,6) 4/98 (%4,08) (kontrol) Patojenik
(Breckpot vd., 2011)	46 KKH	2 sendromik / 44 izole	Affymetrix SNP 6.0	2/46 (%4,3) Patojenik
(Hakonarson, Biegel, & White, 2011)	58 KKH 2026 kontrol	Sendromik (dismorfik + diğer anomaliler)	Affymetrix 100 K	12/58 (%20,7) Patojenik

(Tomita-mitchell vd., 2020)	945 KKH 2026 kontrol	135 sendromik / 810 izole	Affymetrix SNP 6.0	35/945 (%4,3) Patojenik
(Glessner vd., 2014)	538 KKH 1301 kontrol	Sendromik + İzole	Illumina Omni- 1.0 and 2.5M) + WES	51/538 (%9,47) Patojenik
(Geng vd., 2014)	514 KKH 9170 kontrol	12 anöploidi / Sendromik + İzole	1x244K Agilent 4x180K Agilent Affymetrix	42/502 (%8,36) Patojenik 24/502 (%4,7) Olası patojenik
(Kim vd., 2016)	422 KKH 500 Kontrol	İzole KKH	Illumina 550k ve 610k	51/422 (%12.1) Patojenik
ÇALIŞMAMIZ	40 KKH 24 kontrol	İzole KKH	Agilent 4x180K	0/40 (%0) Patojenik 11/40 (%27,5) Benign 33/40 (%82,5) polimorfik

Bu karşılaştırma tablosuna göre sendromik KKH olgularını dahil eden çalışmaların patojenik KSV saptama oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamız gibi sadece izole KKH ile yapılan çalışmalarda saptanan patojenik varyant oranları düşük olmakla birlikte rezolüsyonu yüksek olan mikrodizinlerle yapılan çalışmaların diğerlerine göre varyant saptama oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda patojenik varyant saptanmamasının nedenleri arasında olgu sayısının azlığı ve diğer çalışmalara göre daha düşük rezolüsyonda olan mikrodizin yönteminin kullanılmasıdır. Sadece izole KKH ile yapılan çalışmaların bizim çalışmamızla karşılaştırılması aşağıda verilmiştir:

Kim ve ark'nın 2016 yılında yaptığı çalışmada toplam 422 KKH olgusu değerlendirilmiş olup *VEGFA* ve *SOD2* gen bölgelerinde KSV taraması yapılmış ve %12.2'sinde ortak KSV bölgeleri saptanmıştır. Bu çalışma sadece iki gen bölgesi üzerine yoğunlaştığı ve bu gen bölgesi KKH ile ilişkili oldukları için daha yüksek oranda patojenik KSV saptanmıştır. İzole KKH olan çocuklarda nadir/büyük KSV'lerin oldukça yüksek oranda gözleendiğini, bu KSV'lerin 2.55 kat artmış ölüm

veya nakil riskiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar KSV yükünün KKH olgularının ameliyat sonrası sağkalımı için önemli bir modifiye edici faktör olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve ark.'nın saptadığı KSV'ler bizim çalışmamızda gözlemlenmemiştir (Kim vd., 2016).

Breckpot ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı çalışmada 46 izole/non-sendromik KKH olgusu ile yaptığı bir KMA çalışması sonucunda olguların %4.3'ünde bilinen genleri içeren ortak KSV bölgeleri rapor edilmiştir. Breckpot ve ark.'nın rapor ettiği tekrarlayan KSV bölgeleri 9q34.3, 22q11.2, 1q21.1'dir. Çalışmamızda saptadığımız KSV'ler ile Breckpot ve ark.'nın çalışmasında saptadığı KSV'ler arasında ortaklık bulunmamaktadır. Ancak saptadıkları 1q21.1 lokusundaki KSV, bizim çalışmamızda saptanan 1q21.2 lokusunun yakınında bulunmaktadır. Bu 1q21.1 lokusu KKH ile doğrudan ilişkilendirildiği için bu benzerliğin önemli olabileceğini düşünmekteyiz (Breckpot vd., 2011).

Erdoğan ve ark.'nın 2008 yılında yaptığı çalışmada 105 izole/non-sendromik KKH olgusu değerlendirilmiş olup %4.7 oranında KSV saptanmıştır. Bu KSV'ler, 17p11.2 lokusunda bir *de-novo* delesyon, 7q22.1 ve 13q14.11 lokuslarında iki *de-novo* duplikasyon ve sekiz familial KSV (1q21.1 lokusunda bir delesyon ve 2p22.3, 3p22.3, 3q22.3, 5q23.2, 11q14.1, 15q26.1, 22q11.2 lokuslarında yedi duplikasyon) dahil olmak üzere, yaygın DNA kopya sayısı farklılıklarıyla çakışmayan 18 kromozomal değişikliği içermektedir. Erdoğan ve ark.'nın çalışması sonucunda bulunan KKH ile ilişkili KSV'ler, bizim çalışmamızda saptanmamıştır. Bu çalışmada saptanan ailesel KSV'ler arasında bulunan 1q21.1 bölgesindeki KSV, bizim çalışmamızda saptanmamış olsa bile, bu lokusun yakınında bulunan 1q21.2 lokusunda KSV saptadığımız için bu benzerliğin önemli olabileceğini düşünmekteyiz (Erdogan vd., 2008).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Toplumda oldukça sık görülen konjenital malformasyon grubu olan izole/non-sendromik KKH, tedavi ve izlem açısından hem hasta birey üzerinde hem de toplum üzerinde önemli bir sorun oluşturmaktadır.

Non-sendromik KKH'li sporadik hastaların KMA ile incelenmesi, bu patolojilere katılan yeni genleri tanımlamak için klasik aile çalışmalarına bir alternatiftir.

Konjenital kalp hastalıkları üzerinde submikroskopik KSV'lerin doğrudan veya genetik risk faktörleri olarak hastalık patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmekte ve bildiğimiz kadarıyla Türk popülasyonunda izole/non-sendromik KKH ile ilişkili KSV'lerin sıklığı ile ilgili veri yoktur. Çalışmamız bu anlamda literatüre özgün bir değer katmaktadır.

Çalışmamız sonucunda toplamda 33 olguda, toplam 62 (% 1.55) KSV saptanmış olup kontrol grubu ile olgu grubu arasında istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir fark bulunmuştur. Olguların %82.5 (33/40)'inde polimorfik varyant, %27,5 (11/40)'inde polimorfik olmayan varyant saptanmıştır. Bu varyantlar KKH ile doğrudan ilişkili olmamakla birlikte ileri moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi gereken ve dolaylı olarak KKH etiyolojisinde görev alabileceği düşünülen varyantlar saptanmıştır.

Çalışmamızdaki olgu ve kontrol sayısının az olması aberasyon saptamak için bir kısıtlılık oluşturmaktadır. Dolayısıyla olgu sayısının artırılması daha fazla veriye ulaşılabilmesi açısından önemli olduğundan fazla olgu sayısı ile bu çalışmaların yapılmasını önermekteyiz.

Bütçe kısıtlılığı nedeniyle trio (anne-baba-çocuk) analizlerinin yapılamaması çalışmamızın en büyük kısıtlılığını oluşturmaktadır. Varyantların *de-novo* mı, ebeveylere mi kalıtıldığı, patojenitesini etkilemesi yönünden önemli olduğu için trio analizlerinin yapılmasını önermekteyiz.

Multifaktöriyel kalıtım gösteren izole KKH'larının altında yatan etiyopatogenezin aydınlatılması, KSV bölgelerinde lokalize olan genlerin ileri moleküler yöntemlerle değerlendirilmesini önermekteyiz.

KKH etiolojisinde yer alan genler açısından patojenik bir mutasyona sahip olmayan olgularda saptanacak KSV'lerin özelliklerine göre ebeveynlerinde değerlendirilmesi ve genetik danışma verilmesinin koruyucu hekimlik açısından yararlı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alvarez, C., Tredwell, S., M, D. V., & The, H. M. (2006). *The genotype – phenotype correlation of hereditary multiple exostoses.* (6), 122–130. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00653.x>
- Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Scott, A. F., & Hamosh, A. (2015). *OMIM . org : Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM R), an online catalog of human genes and genetic disorders.* 43(November 2014), 789–798. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1205>
- Barber, J. C. K., Hall, V., Maloney, V. K., Huang, S., Roberts, A. M., Brady, A. F., ... White, H. (2012). *condition differentiated from euchromatic variation of 16p11 . 2. 21(2)*, 182–189. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.144>
- Bernardo, B. C., Ooi, Y. Y., Lin, R. C. Y., & McMullen, R. (2015). *Medicinal Chemistry.*
- Blue, G. M., Kirk, E. P., Giannoulatou, E., Hil, D. P., & Sholler, G. F. (2018). *Advances in the Genetics of Congenital Heart Disease Congenital Heart Disease.* 69(7). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.060>
- Botto, L. D., Lin, A. E., Riehle-colarusso, T., Malik, S., & Correa, A. (2007). *Seeking Causes : Classifying and Evaluating Congenital Heart Defects in Etiologic Studies.* 727(August), 714–727. <https://doi.org/10.1002/bdra.20403>
- Breckpot, J., Thienpont, B., Arens, Y., Tranchevent, L. C., Vermeesch, J. R., Moreau, Y., ... Devriendt, K. (2011). Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenetic and Genome Research*, 135(3–4), 251–259. <https://doi.org/10.1159/000331272>
- Cappuccio, G., Vitiello, F., Casertano, A., Fontana, P., Genesisio, R., Bruzzese, D., ... Melis, D. (2016). New insights in the interpretation of array-CGH: autism spectrum disorder and positive family history for intellectual disability predict the detection of pathogenic variants. *Italian Journal of Pediatrics*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13052-016-0246-7>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Christiansen, J., Dyck, J. D., Elyas, B. G., Lilley, M., Bamforth, J. S., Hicks, M., ... Somerville, M. J. (2004). *Clinical Research*. 1429–1435. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130528.72330.5c>
- Chung, W. K. (2017). Genetic Basis of Congenital Heart Disease. İçinde *Genomic and Precision Medicine: Cardiovascular Disease: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801812-5.00008-1>
- Dumas, L. J., Bleness, M. S. O., Davis, J. M., Dickens, C. M., Anderson, N., Keeney, J. G., ... Sikela, J. M. (2012). DUF1220-Domain Copy Number Implicated in Human Brain-Size Pathology and Evolution. *The American Journal of Human Genetics*, 91(3), 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.07.016>
- Erdogan, F., Larsen, L. A., Zhang, L., Tümer, Z., Tummerup, N., Chen, W., ... Ullmann, R. (2008). High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *Journal of Medical Genetics*, 45(11), 704–709. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.058776>
- Erzurumluoğlu, E. (2018). *Prenatal Sitogenetik Anomalilerde İleri Tanı Yöntemi Olarak Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon*. 3(1), 63–69.
- Fahed, A. C., Gelb, B. D., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2013). Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. *Circulation Research*, 112(4), 707–720. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300853>
- Francannet, C., Merrer, M. Le, Munnich, A., Bonaventure, J., & Génétique, D. (2001). *Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses*. 430–434.
- Geng, J., Picker, J., Zheng, Z., Zhang, X., Wang, J., Hisama, F., & Brown, D. W. (2014). *Chromosome microarray testing for patients with congenital heart defects reveals novel disease causing loci and high diagnostic yield*. (December). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1127>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Glessner, J., Bick, A. G., Ito, K., Homsy, J., Rodriguez-murillo, L., Mazaika, E. J., ... Rodriguez-murillo, L. (2014). *Increased Frequency of De Novo Copy Number Variations in Congenital Heart Disease by Integrative Analysis of SNP Array and Exome Sequence Data* Christine Seidman , Elizabeth Goldmuntz , Bruce D Gelb , Richard Lifton , Jonathan G Seidman , Hakon Hakonarson and Wendy K Chung The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Data Supplement (unedited) at : *Increased Frequency of De Novo Copy Number Variations in Congenital Heart Disease by Integrative Analysis of SNP Array and Exome Sequence Data* University of Pennsylvania Pediatrics Center for Applied Genomics Philadelphia , PA 19104 United State s Columbia University Medical Center Pediatrics and Medicine 630 W 168th St New York , NY10032 United States Wkc15@Cumc.Columbia.Edu. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304458>
- Grati, F. R., Lesperance, M. M., Toffol, S. De, Chinetti, S., Selicorni, A., Emery, S., ... Simoni, G. (2009). *Pure Monosomy and Pure Trisomy of 13q21 . 2 – 31 . 1 Consequent to a Familial Insertional Translocation : Exclusion of PCDH9 as the Responsible Gene for Autosomal Dominant Auditory Neuropathy (AUNA1)*. (April), 906–913. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32754>
- Greenway, S. C., Pereira, A. C., Lin, J. C., Depalma, S. R., Israel, S. J., Mesquita, S. M., ... Seidman, C. E. (2009). De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nature Publishing Group*, 41(8), 931–935. <https://doi.org/10.1038/ng.415>
- Hakonarson, H., Biegel, J. A., & White, P. S. (2011). *Microdeletions and Microduplications in Patients with Congenital Heart Disease and Multiple Congenital Anomalies*. 592–602.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hobson, J. P., Netzel-arnett, S., Szabo, R., Re, S. M., Church, F. C., Strickland, D. K., ... Bugge, T. H. (2017). *Mouse DESC1 Is Located within a Cluster of Seven DESC1-like Genes and Encodes a Type II Transmembrane Serine Protease That Forms Serpin Inhibitory Complexes* *Mouse DESC1 Is Located within a Cluster of Seven DESC1 -like Genes and Encodes a Type II Transmembrane Serine Protease That Forms Serpin Inhibitory Complexes* *. (December 2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M403299200>
- Hoffman, E. P., & Ph, D. (2012). *Genomics, Intellectual Disability, and Autism*. 733–743.
- Hoffman, J. I. E., Kaplan, S., & Liberthson, R. R. (2004). Prevalence of congenital heart disease. *American Heart Journal*, 147(3), 425–439. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2003.05.003>
- Huebner, K., Druck, T., Laforgia, S., Lasota, J., Croce, C. M., Lanfrancone, L., ... Lania, L. (1993). *genetics Chromosomal localization of four human zinc finger cDNAs*. 80, 217–222.
- Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Cannon, J. R., Ting, L., Colby, G., ... Wade, J. (2017). *communities and disease networks*. 545(7655), 505–509. <https://doi.org/10.1038/nature22366>.Architecture
- Jamet, X., Etard, C., Laugel, V., Muller, J., Strauss, J., Marion, V., & Poch, O. (2011). *Homozygosity Mapping and Candidate Prioritization Identify Mutations , Missed by Whole-Exome Sequencing , in SMOC2 , Causing Major Dental Developmental Defects*. 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.002>
- Jin, S. C., Homsy, J., Zaidi, S., Lu, Q., Morton, S., Depalma, S. R., ... Seidman, C. E. (y.y.). *Contribution of rare inherited and de novo variants in 2 , 871 congenital heart disease probands*. <https://doi.org/10.1038/ng.3970>
- Kelly, S. R. R. G., & Editors, D. J. D. (y.y.). *Congenital Heart Diseases : The Broken Heart*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kim, D. S., Kim, J. H., Burt, A. A., Crosslin, D. R., Burnham, N., Kim, C. E., ... Jarvik, G. P. (2016). Burden of potentially pathologic copy number variants is higher in children with isolated congenital heart disease and significantly impairs covariate-adjusted transplant-free survival. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.09.136>
- Lalith, J., Richard, C., Johan, P., & Eichhorn, A. (2018). *Platforms for Investigating LncRNA Functions*. <https://doi.org/10.1177/2472630318780639>
- Lander, J., & Ware, S. M. (2014). Copy Number Variation in Congenital Heart Defects. *Current Genetic Medicine Reports*, 2(3), 168–178. <https://doi.org/10.1007/s40142-014-0049-3>
- Lee, C., & Scherer, S. W. (2010). *The clinical context of copy number variation in the human genome*. 12(March), 1–29. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001390>
- Lin, A. E., Krikov, S., Riehle-colarusso, T., Frías, J. L., Anderka, M., Geva, T., ... Botto, L. D. (2015). (1998 – 2007): Birth Prevalence and Descriptive Epidemiology. 0(10), 2581–2591. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36695>. Laterality
- Liu, Q., Huang, J., Zhou, N., Zhang, Z., Zhang, A., Lu, Z., ... Mo, Y. (2013). *LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor*. 41(9), 4976–4987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt182>
- Lopes, A. M., Ross, Æ. N., Close, Æ. J., & Crow, Æ. T. J. (2006). *Inactivation status of PCDH11X: sexual dimorphisms in gene expression levels in brain*. 267–275. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0134-0>
- Lopez, L., Houyel, L., Colan, S. D., Aiello, V. D., Anderson, R. H., Marie, J. B., ... Franklin, R. C. G. (2018). *Classification of Ventricular Septal Defects for the Eleventh Iteration of the International Classification of Diseases — Striving for Consensus: A Report From the International Society for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease*. 1578–1589. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.06.020>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lu, X., Shaw, C. A., Patel, A., Li, J., Cooper, M. L., Wells, W. R., ... Patricia, A. (2007). *Clinical Implementation of Chromosomal Microarray Analysis : Summary of 2513 Postnatal Cases.* (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000327>
- Macdonald, J. R., Ziman, R., Yuen, R. K. C., Feuk, L., & Scherer, S. W. (2014). *The Database of Genomic Variants : a curated collection of structural variation in the human genome.* 42(October 2013), 986–992. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt958>
- Manning, M., & Hudgins, L. (2010). Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genetics in Medicine*, 12(11), 742–745. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181f8baad>
- Manuscript, A. (2015). *NIH Public Access.* 57(8), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.04.010>.Genetic
- Marelli, A. J., Ionescu-Ittu, R., Mackie, A. S., Guo, L., Dendukuri, N., & Kaouache, M. (2014). Lifetime prevalence of congenital heart disease in the general population from 2000 to 2010. *Circulation*, 130(9), 749–756. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008396>
- Marelli, A. J., Mackie, A. S., Ionescu-Ittu, R., Rahme, E., & Pilote, L. (2007). Congenital Heart Disease in the General Population. *Circulation*, 115(2), 163–172. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.627224>
- Mazzei, R., National, I., Cavallaro, S., & National, I. (2016). *Copy number variations and stroke.* (September). <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2658-y>
- Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., ... Ledbetter, D. H. (2010). Consensus Statement : Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics*, 86(5), 749–764. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Nees, S. N., & Chung, W. K. (2019a). *Genetic Basis of Human Congenital Heart Disease*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036749>
- Nees, S. N., & Chung, W. K. (2019b). *The genetics of isolated congenital heart disease*. (October), 1–10. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31763>
- Ng, C. C., Koyama, K., Okamura, S., Kondoh, H., Takei, Y., & Nakamura, Y. (1999). *Isolation and Characterization of a Novel TP53-Inducible Gene , TP53TG3*. 335(April), 329–335.
- Opitz, C. A., Litzemberger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., ... Wick, W. (2011). of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/nature10491>
- Pan, F., Yao, J., Chen, Y., Zhou, C., Geng, P., Mao, H., & Fang, X. (2014). *Original Article A novel long non-coding RNA FOXCUT and mRNA FOXC1 pair promote progression and predict poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma*. 7(6), 2838–2849.
- Pasic, I., Shlien, A., Durbin, A. D., Stavropoulos, D. J., Baskin, B., Ray, P. N., ... Malkin, D. (2010). *Recurrent Focal Copy-Number Changes and Loss of Heterozygosity Implicate Two Noncoding RNAs and One Tumor Suppressor Gene at Chromosome 3q13 . 31 in Osteosarcoma*. 70(1), 160–172. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1902>
- Pierpont, M. E., Brueckner, M., Chung, W. K., Garg, V., Lacro, R. V., McGuire, A. L., ... Russell, M. W. (2018). Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. İçinde *Circulation* (C. 138). <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000606>
- Pluchinotta, F. R., Russo, M. G., Evangelista, A., Benson, D. W., Body, S. C., Mbc, H. B., & Milewicz, D. M. (2014). *REVIEW TOPIC OF THE WEEK*. 64(8). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.073>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Popova, T., Boeva, V., Manié, E., Rozenholc, Y., Stern, M., Popova, T., ... Popova, T. (2015). *Analysis of Somatic Alterations in Cancer Genome : From SNP Arrays to Next Generation Sequencing* To cite this version : HAL Id : hal-01108425 *Analysis of Somatic Alterations in Cancer Genome : From SNP Arrays to Next Generation Sequencing*.
- Pugnaloni, F., Digilio, M. C., Putotto, C., Luca, E. De, Marino, B., & Versacci, P. (2020). *Genetics of atrioventricular canal defects*. 4, 1–13.
- Report, O. M. (2005). *Key points*. 4–6. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.025395>
- Richards, A. A., Santos, L. J., Nichols, H. A., Crider, B. P., Elder, F. F., Hauser, N. S., ... Garg, V. (2008). Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatric Research*, 64(4), 358–363. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31818095d0>
- Riggs, E. R., Andersen, E. F., Cherry, A. M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., ... Martin, C. L. (2019). ACMG TECHNICAL STANDARDS Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *GENETICS in MEDICINE*, 0(0), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>
- Saliba, A., Carolina, A., Figueiredo, V., Eduardo, J., Yuseff, J., Pic-taylor, A., ... Forte, J. (2020). Genetic and genomics in congenital heart disease : a clinical review &. *Jornal de Pediatria*, 96(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2019.07.004>
- Salvador, J., Arigita, M., Carreras, E., Lladonosa, A., & Borrell, A. (2011). *Evolution of prenatal detection of neural tube defects in the pregnant population of the city of Barcelona from 1992 to 2006*. (October), 1184–1188. <https://doi.org/10.1002/pd>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sanchez-Castro, M., Eldjouzi, H., Charpentier, E., Busson, P. F., Hauet, Q., Lindenbaum, P., ... Le Caignec, C. (2016). Search for Rare Copy-Number Variants in Congenital Heart Defects Identifies Novel Candidate Genes and a Potential Role for FOXC1 in Patients with Coarctation of the Aorta. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 9(1), 86–94. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001213>
- Scionti, F., Teresa, M., Martino, D., Pensabene, L., Bruni, V., & Concolino, D. (2018). *The Cytoscan HD Array in the Diagnosis of Neurodevelopmental Disorders*. 1–12. <https://doi.org/10.3390/ht7030028>
- Sifrim, A., Hitz, M. P., Wilsdon, A., Breckpot, J., Turki, S. H. A., Thienpont, B., ... Hurles, M. E. (2016). Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nature Genetics*, 48(9), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng.3627>
- Solinas-toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., & Benner, A. (1997). *Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances*. 407(July), 399–407.
- Stranger, B. E. (2014). *Copy Number Variation on Gene*. 848(2007). <https://doi.org/10.1126/science.1136678>
- Sudmant, P. H., Mallick, S., Nelson, B. J., Krumm, N., Huddleston, J., Coe, B. P., ... Rienzo, A. Di. (y.y.). *Global diversity, population stratification, and selection of human copy number variation*. 1–16.
- Takata, R. I., Jaime, C. E. S., & Claudio, M. B. (2018). *Analysis of mutations in EXT1 and EXT2 in Brazilian patients with multiple osteochondromas*. (January), 382–392. <https://doi.org/10.1002/mgg3.382>
- Theodoropoulos, K. C., Papachristidis, A., Masoero, G., Papitsas, M., Cospite, V., Demir, F. A., ... Monaghan, M. J. (2018). *Superior sinus venosus atrial septal defect*. 649–652. <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2018.10.007>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tomita-mitchell, A., Mahnke, D. K., Struble, C. A., Tuffnell, M. E., Stamm, K. D., Hidestrand, M., ... Pm, S. (2020). *Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations*. 518–541. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00013.2012>
- Vaidyanathan, B., Kumar, S., Sudhakar, A., & Kumar, R. K. (2013). *Conotruncal anomalies in the fetus : Referral patterns and pregnancy outcomes in a dedicated fetal cardiology unit in South India*. 6(1). <https://doi.org/10.4103/0974-2069.107227>
- Van Der Bom, T., Zomer, A. C., Zwinderman, A. H., Meijboom, F. J., Bouma, B. J., & Mulder, B. J. M. (2011). The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nature Reviews Cardiology*, 8(1), 50–60. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.166>
- Van Der Linde, D., Konings, E. E. M., Slager, M. A., Witsenburg, M., Helbing, W. A., Takkenberg, J. J. M., & Roos-Hesselink, J. W. (2011). Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(21), 2241–2247. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.08.025>
- Velasco, G. (2014). *Human cathepsin O . Molecular cloning from a breast carcinoma , production of the active enzyme in Escherichia coli , and expression analysis in human tissues Human Cathepsin 0*. (November 1994). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47135-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47135-9)
- Vissers, L. E. L. M., Vries, B. B. A. De, & Veltman, J. A. (y.y.). *Genomic microarrays in mental retardation : from copy number variation to gene , from research to diagnosis*. 289–297. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.072942>
- Wang, Y., Cheng, C., Zhang, Z., Wang, J., Wang, Y., Li, X., ... Tsuang, M. T. (2018). *Blood-based dynamic genomic signature for obsessive – compulsive disorder*. (April), 1–8. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32675>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wiszniewska, J., Bi, W., Shaw, C., Stankiewicz, P., Kang, S. L., Pursley, A. N., ... Patel, A. (2013). Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *European Journal of Human Genetics*, 22(1), 79–87. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.77>
- Wu, X. li, Li, R., Fu, F., Pan, M., Han, J., Yang, X., ... Liao, C. (2017). Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease. *BMC Pediatrics*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12887-017-0863-3>
- Xiao-jie, L., Ai-mei, G., Li-juan, J., & Jiang, X. (2015). *Pseudogene in cancer : real functions and promising signature*. 17–24. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102785>
- Y, M. L., Schaefer, L., Sakai, H., & Lingueglia, E. (2000). *Molecular cloning , functional expression and chromosomal localization of an amiloride-sensitive Na⁺ channel from human small intestine*. 471, 205–210.
- Yang, Y., Qu, H., Gao, D., Di, W., Chen, H., Guo, X., ... Chen, D. (2011). *ARF-like Protein 16 (ARL16) Inhibits RIG-I by Binding with Its C-terminal Domain in a GTP-dependent Manner* *. 286(12), 10568–10580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.206896>
- Zaidi, S., & Brueckner, M. (2017). Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circulation Research*, 120(6), 923–940. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309140>
- <https://www.contemporarypediatrics.com/view/genetic-testing-intellectual-disability-role-diagnostic-evaluation>
- <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- <https://www.cagdb.org>
- <http://genome.ucsc.edu/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

<http://omim.org/>

<https://decipher.sanger.ac.uk/search/genes?q=FAM74A7>).

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000221065;r=15:34528290-34528371;t=ENST00000408138.

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000221649;r=15:34382069-34382150;t=ENST00000408722

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LOC390705>

EKLER DİZİNİ

EK-1: ETİK KURUL



Doç.Dr.Muhammed Evvah KARAKILIÇ
(Başkan)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Acil Tıp AD

Doç.Dr.Özlem ÖRSAL
(Raportör)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi
Halk Sağlığı Hemşireliği AD

Prof.Dr.Ömür SAYLIĞIL
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD

Prof.Dr.Setenay DİNÇER ÖNER
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD

Prof.Dr.Varol ŞAHİNTÜRK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD

Prof.Dr.Timuçin KAŞIHOĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD / Romatoloji BD

Doç.Dr.Batu Can YAMAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi AD

Doç.Dr.Kürşat Bora ÇARMAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD /
Çocuk Nörolojisi BD

Doç.Dr.Melih VELİPAŞAOĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD

Doç.Dr.Lütfiye DEMİR
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hast. AD / Tıbbi Onkoloji BD

Doç.Dr.Merih ÖZGEN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon AD

Doç.Dr.Göknur YORULMAZ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD / Endokrinoloji
ve Metabolizma Hastalıkları BD

Doç.Dr.Ferdi KÖŞGER
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD

Dr.Öğr.Üy.Mustafa Değer BİLGEÇ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD

Av. Önder CAN
Avukat

Etik Kurul Sekreterliği
Aysun SERTTAŞ
Tel: 0 222 239 29 79 / 4690

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI

KARAR FORMU

Başvuru Tarihi: 15.05.2019	Çalışmanın Başlığı: “Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genomik Kopya Numarası Değişikliklerinin ve Aday Genlerin Değerlendirilmesi” Çalışmacılar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı – Prof.Dr.Sevilhan ARTAN (<i>Tez Danışmanı</i>), Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı / Çocuk Kardiyolojisi Bilim Dalı – Prof.Dr.Birsen UÇAR, Yan Dal Arş.Gör.Dr.Tuğçem KESKİN, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı – Doç.Dr.Beyhan DURAK ARAS, Dr.Öğr.Üy.Oğuz ÇİLİNGİR, Arş.Gör.Dr.Sinem KOCAGİL (<i>Tez Sahibi</i>), Bio.Büşra ÖZKAN
Çalışmanın değerlendirildiği ilk toplantı tarihi: 28.05.2019	Sonuç: 1. Çalışma için Biyolojik Materyal Transfer Formunun düzenlenmesi gerekmektedir. 2. Onam Formlarının tıbbi terminolojiden arındırılması gerekmektedir. Ayrıca kaç kez kan alınacağı ile ilgili bilginin onam formlarında yer alması gerekmektedir.
Çalışmacılardan gelen düzeltme metni tarihi: 19.06.2019	Prof.Dr.Sevilhan ARTAN’ın yazısı Sorumlu araştırmacısı olduğum “Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genomik Kopya Numarası Değişiklikleri ve Aday Genlerin Değerlendirilmesi” isimli projenin Kurulunuzun 12.06.2019 tarihli görüş ve önerileri doğrultusunda düzeltilmiştir. Yapılan düzeltmeler aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir. 1. Çalışmamız yerinde hizmet alımı ile yapılacağından ve dış merkeze herhangi bir materyal transferi yapılmayacağından dolayı Biyolojik Materyal Transfer Formu düzenlenmemiştir. Etik Kurul başvurusunda yer alan çalışma protokolü içerisindeki laboratuvar aşaması ve analiz kısmında, çalışmamızın yerinde hizmet alımı ile yapılacağı tarafınıza bildirilmiştir. 2. Eleştirileriniz doğrultusunda Onam Formu tekrar gözden geçirilmiş olup, tıbbi terminolojiden arındırılmış ve sadeleştirilmiştir. Ekler; Onam Formu



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI

Çalışmanın Başlığı: “*Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genomik Kopya Numarası Değişikliklerinin ve Aday Genlerin Değerlendirilmesi*”

Çalışmanın değerlendirildiği ikinci toplantı tarihi: 25.06.2019	Sonuç: <ol style="list-style-type: none">1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formuna gönüllülerin ulaşabileceği, çalışmacı ismi ve telefon numarasının yazılması uygun olacaktır. Form iki nüsha hazırlanıp, bir nüshası gönüllüye verilmelidir.2. Çalışma olumlu olarak nitelendirilmiştir.
Karar Tarihi: 25.06.2019 Karar No: 18	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Prof.Dr.Sevilhan ARTAN (Tez Danışmanı) sorumluluğunda yürütülen “ <i>Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genomik Kopya Numarası Değişikliklerinin ve Aday Genlerin Değerlendirilmesi</i> ” başlıklı çalışmanın yapılmasının etik açıdan uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Araştırmacılara başarılar dileriz.



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI

Çalışmanın Başlığı: "Non-sindromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genomik Kopya Numarası Değişikliklerinin ve Aday Genlerin Değerlendirilmesi"

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
Unvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İmza
1 Doç.Dr.Muhammed Evvah KARAKILIÇ (Başkan)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp AD	
2 Doç.Dr.Özlem ÖRSAL (Raportör)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	
3 Prof.Dr.Ömür ŞAYLIGİL	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD	
4 Prof.Dr.Setenay DİNÇER ÖNER	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD	
5 Prof.Dr.Varol ŞAHİNTÜRK	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	
6 Prof.Dr.Timuçin KAŞIFOĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD / Romatoloji BD	
7 Doç.Dr.Batu Can YAMAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi AD	
8 Doç.Dr.Kürşat Bora ÇARMAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hastalıkları AD / Çocuk Nörolojisi BD	
9 Doç.Dr.Melih VELİPAŞAOĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD	
10 Doç.Dr.Lütfiye DEMİR	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD / Tıbbi Onkoloji BD	
11 Doç.Dr.Merih ÖZGEN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon AD	
12 Doç.Dr.Göknur YORULMAZ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD / Endokrinoloji ve Metab. Hast. BD	
13 Doç.Dr.Ferdi KÖŞGER	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD	
14 Dr.Öğr.Üy.Mustafa Değer BİLGEÇ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD	
15 Av.Önder CAN	Hukuk	

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Büşra ÖZKAN
Doğum tarihi ve yeri : 01.02.1996 - Ankara
Uyruğu : T. C
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Zeynep Kamil Hastanesi Genetik Tanı Merkezi
– Üsküdar/İSTANBUL

Eğitim Durumu

İlköğretim	Zafer İ.Ö.O
Lise	Mustafa Şeker Anadolu Lisesi
Lisans	Balıkesir Üniversitesi
Y. Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Mesleki Deneyim : Zeynep Kamil Hastanesi Genetik Tanı Merkezi –
Üsküdar/İSTANBUL

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Tıbbi Genetik Derneği

Yayımlar :

Bilimsel Etkinlikler

Burslar :
Ödüller :
Projeler :
Sözlü Konferans veya Seminerler :
Kurslar ve Eğitim Programları :

- 13. Balkan Kongresi İnsan Genetiği Principles of Pharmacogenetics kursu
- CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme alıştayı
- Non-invaziv Prenatal Test (NIPT) kursu

