

T1224



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

KONOTRUNKAL KARDİAK ANOMALİLERDE 22q11 MİKRODELESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

T1224/1-1

Uzmanlık Tezi

Dr.Gökhan ACAR

Tez Danışmanı : Doç.Dr.Şükran TAÇOY

*"Bu tez, Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
97.01.0103.02 proje numarası ile desteklenmiştir"*

"Tezinden kaynakça gösterilerek yararlanılabilir"

Antalya, 1998



İçindekiler

Sayfa No :

Giriş ve Amaç	1 - 2
Genel Bilgiler	3 - 24
Olgular ve Yöntem	25 - 33
Bulgular	34
Tartışma	35 - 38
Sonuçlar	39
Özet	40
Kaynaklar	41 - 47

GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital kalp hastalıkları her 1000 canlı doğumda 8 oranında görülür ve en sık görülen major konjenital anomalilerdendir (1). Büyük çoğunluğu izole malformasyonlar şeklindedir. Etyoloji saptamaya yönelik çalışmalar genellikle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda ailede etkilenmiş bir kişinin olması ile rekürrens riskinin arttığı ve bu etkilenmiş kişi anne ise riskin çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (2,3). Bu da genetik yatkınlık olduğunu gösterir.

Konjenital kalp hastalıkları sıklıkla iyi tanımlanmış genetik sendromların bir parçası olarak da görülür. Bazı sendromlarda bazı spesifik konjenital kalp hastalıkları normal populasyonda görüldüğünden çok daha sık görülür. Örnek olarak Down Sendromlu olguların %40'ında konjenital kalp hastalığı vardır ve konjenital kalp hastalığı olguların %40'ında normal populasyonda çok az görülen ortak atrioventriküler kanal şeklindedir (4). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bu konjenital kalp hastalığının herhangi bir kromozomal bölge ile ilgili olduğunu gösterememiştir.

Konotrunkal kardiak anomaliler, timus ve paratiroid hipoplazisi ile birlikte Di George Sendromunda sıklıkla görülür (5, 6). Özellikle trunkus arteriosus ve Fallot tetralojisi Di George Sendromunda normal

populasyona göre çok daha sık saptanır (7). Damak anomalileri, öğrenme güçlüğü ve tipik yüz görünümü ile karakterize olan Velokardiofasial Sendromunda da en çok görülen kardiak anomali Fallot tetralojisidir (8, 9). Hipokalsemi ve immun eksikliklerin Velokardiofasial Sendromda da görülmesi birçok araştırmacı tarafından Di George Sendromu ile ortak özellikleri olduğunun öne sürülmesine neden olmuştur.

Son yıllarda FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) yöntemi ile yapılan çalışmalarda Di George Sendromlu olguların %83'ünde, Velokardiofasial Sendromlu olguların %68'inde, 22. kromozomun uzun kolunun 11. bölgesinde mikrolelesyon saptanmıştır (12). Kısıtlı olgu ile yapılan çalışmalarda non-sendromik konotrunkal anomalili olguların %29'unda bu delesyon saptanmıştır (1). Bu delesyona uğrayan bölgenin 3. ve 4. faringeal poşların gelişimini kodladığı ve dolayısıyla timus, paratiroid bezler ve konotrunkusun gelişiminden sorumlu olduğu öne sürülmektedir (13,14). Buradan yola çıkarak konotrunkal kardiak defekti olan non-sendromik olgularda 22q11 mikrolelesyonunu araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI EPİDEMİYOLOJİSİ

İnsidans :

Konjenital kalp hastalıkları her 1000 canlı doğumda 8 oranında görülür. İnsidans ölü doğumlarda %2, abortuslarda %10-25 arasında saptanır (15). Prematürelde Patent Duktus Arteriozus hesaba katılmasa bile insidans %2'lere kadar yükselir (16). Konjenital kalp hastalığı klinik spektrumu çok geniştir. Olguların %25-30'u hayatın ilk yılı içinde semptomatiktir. Konjenital kalp hastalıklı olguların %40-50'sinin tanısı hayatın ilk haftasında, %50-60'ının tanısı hayatın ilk yılında konur. Palyatif ve düzeltici cerrahi girişimlerin erken dönemde başarılı bir şekilde uygulanması ile her geçen gün konjenital kalp hastalıklı olguların yaşam şansı artmaktadır.

Etyoloji :

Birçok konjenital kalp hastalığının etyolojisi hala bilinmiyor. Fakat son yıllarda moleküler genetikteki gelişmeler, konjenital kalp hastalıklarında görülen spesifik kromozomal anormalliklerin yakın gelecekte identifikasyonunu sağlayabilecek gibi görünmektedir. Uzun zamandan beri genetik faktörlerin konjenital kalp hastalığının

gelişiminde belli rolleri olduğu bilinmektedir. Örnek olarak, bazı VSD'lerin (suprakristal) Asyalı çocuklarda daha sık görüldüğü gözlenmiştir (18). Ayrıca konjenital kalp hastalığının rekürrens riskinin birinci dereceden bir akraba (ebeveyn veya kardeş) etkilenmişse, %0.8'den %2-6'ya yükseldiği epidemiyolojik çalışmalardan bilinmektedir. Etkilenmiş ebeveyn anne ise bu riskin çok daha yükseklerle çıktığı saptanmıştır (19).

Tablo 1. Konjenital Kalp Hastalıklarının Dağılımı (17).

Hastalık	%
Ventriküler septal defekt	25-30
Atrial septal defekt	6-8
Patent duktus arteriosus	6-8
Aort koarktasyonu	5-7
Pulmoner stenoz	5-7
Fallot tetralojisi	5-7
Aort stenozu	4-7
Büyük arter transpozisyonu	3-5
Hipoplastik sol ventrikül	1-3
Trunkus arteriosus	1-2
Total anormal pulmoner ven dönüşü	1-2
Trikuspit atrezisi	1-2
Tek ventrikül	1-2
Çift çıkımlı sağ ventrikül	1-2
Diğerleri	5-10

Şu anki bilgilerimize göre konjenital kalp hastalığı olan olguların yaklaşık %3'ünde Marfan veya Noonan Sendromu gibi, tek gen defekti olduğu bilinmektedir (20). Diğer yandan konjenital kalp

hastalıklı olguların %5-8'i kromozomal anomalilerle birlikte dir. Konjenital kalp hastalığı trizomi 18'in %90'ında, trizomi 21'in %40'ında, Turner Sendromunun %40'ında görülür (Tablo 2).

Tablo 2. Konjenital Kalp Hastalığı İle Birlikte Görülen Konjenital Malformasyonlar.

Sendrom	Kalp Defekti
<u>- Kromozomal bozukluklar</u>	
21 Trizomi (Down Sendromu)	Endokardial yastık defekti
22 p Trizomi	Anormal pulmoner venöz dönüş
18 Trizomi	ASD, VSD, PDA, aort koarktasyonu
13 Trizomi	VSD, ASD, PDA, aort koarktasyonu, bikuspit aorta
9 Trizomi	VSD, ASD, PDA
XXXXY	PDA, ASD
Penta X	PDA, VSD
Triploidi	VSD, ASD, PDA
XO	Biküspit aortik valv, aort koarktasyonu
Frajil x	Mitral valv proplapsı
3 q 2 duplikasyonu	VSD, ASD, PDA
4 p delesyonu	VSD, PDA, aort stenozu
9 p delesyonu	VSD, ASD, PDA
5 p delesyonu	VSD, PDA, ASD
10 q delesyonu	VSD, TOF, konotrunkal lezyonlar
13 q delesyonu	VSD
18 q delesyonu	VSD
<u>- Sendrom kompleksleri</u>	
CHARGE assosiasyonu	VSD, ASD, PDA, TOF
Di George, CATCH 22	Konotrunkal anomaliler
Alagille Sendromu	Periferel pulmoner stenoz

Tablo 2 (Devam). Konjenital Kalp Hastalığı İle Birlikte Görülen Konjenital Malformasyonlar.

Sendrom	Kalp Defekti
VATER assosiasyonu	VSD , TOF , ASD , PDA
FAVS	TOF, VSD
Asplenia Sendromu	Kompleks siyanotik kalp hastalıkları
Polisplenia Sendromu	Asiyanotik kalp hastalıkları
Apert Sendromu	VSD
Carpenter Sendromu	PDA
Conradi Sendromu	VSD, PDA
Crouzon Sendromu	PDA
Cutis laxa	Pulmoner stenoz
de Lange	VSD
Ellis Van Creveld Sendromu	Tek atrium, VSD
Holt Oram Sendromu	ASD, VSD, kalp bloğu
Kartagener Sendromu	Dekstrokardi
Meckel-Gruber Sendromu	ASD, VSD
Noonan Sendromu	Pulmoner stenoz
Pallister-Hall Sendromu	Endokardial yastık defekti
Rubinstein-Taybi Sendromu	VSD
Smith-Lemli-Opitz	VSD, PDA
TAR Sendromu	ASD, TOF
Treacher Collins	VSD, ASD, PDA
Williams Sendromu	Supravalvular aort stenozu

VSD : Ventriküler septal defekt,
ASD : Atrial septal defekt,
PDA : Patent ductus arteriosus,
TOF : Follat tetralojisi.

Konjenital kalp hastalıklarının %2-4'ünde çevresel ve teratojenik etkilerin rolü vardır. Bunlar arasında maternal diabetes mellitus, fenilketonüri, sistemik lupus eritamosus, konjenital Rubella Sendromu ve ilaçlar (lityum, etanol, thalidomid, antikonvulzanlar) sayılabilir.

Tablo 3. Teratojenik Ajanlar.

Konjenital rubella	PDA, pulmoner stenoz
Fetal Hidantoin Sendromu	VSD, ASD, PDA
Fetal Alkol Sendromu	ASD, VSD
Fetal Valproik Asit	Aort koarktasyonu, VSD
Maternal Fenilketonüri	VSD, ASD, PDA
Retinoik Asit Embryopati	Konotrunkal anomaliler

KONOTRUNKUS'UN EMBRYOLOJİSİ

İnsan embryosunun damar sistemi 3. haftasının ortasında belirir. 3. haftasının ortasına dek beslenme gereksinimini yalnızca diffüzyonla sağlayan embryo, bu haftadan sonra yeni bir sisteme ihtiyaç duyar. Bu evrede, geç presomite embryonun splahnik mezodermal tabakasında bulunan mezenşimal hücreler çoğalarak anjiojenik küme olarak adlandırılan izole hücre topluluklarını oluştururlar.

Başlangıçta embryonun lateralinde yer alan bu kümeler hızla sefalik yönde dağılırlar. Zamanla, içlerinde bir lümen beliren bu hücre toplulukları birleşerek, küçük kan damarlarından oluşmuş at nalı şeklinde bir pleksus meydana getirirler. Bu pleksusun ön-orta kısmı kardiyojenik alan olarak adlandırılır. Bu bölgenin üzerinde yer alan intraembryonik kölom boşluğu, daha sonra perikardial boşluğun içine doğru gelişir (22).

Kalp tüpünün oluŐuŐu ve pozisyonu :

BaŐlangıŐta yassı bir yapıya sahip olan embryo, sefalokaudal fleksiyon sırasında diŐer yandan da transvers olarak katlanır. SonuÇ olarak, iki yanda yer alan endotelial kalp tüpleri birbirine daha da yaklaŐarak kaynaŐırlar. Bu kaynaŐma, tüpün sefalik ucundan baŐlayarak kaudal yöne doŐru uzanır. Füzyonun tamamlanmasıyla tek bir endokardial tp geliŐmiŐ olur.

Bu olaylar sırasında endokardial tüpe komŐu mezoderm yavaş yavaş kalınlaŐarak epimyokardial örtüyü oluşturur. Bu tabaka baŐlangıŐta endokardial tüpten jelanitz bir madde olan kardiak jel ile ayrılmıŐtır. Daha sonra bu jel, endotelium kökenli hücreler tarafından iŐgal edilir. SonuÇta kalp tüpü 3 tabakadan oluşur; a)Kalbin iŐteki endotelini oluŐturan endokard, b)Müsküler duvarı oluŐturan myokard ve c)Tüpün dıŐını örten epikard veya visseral perikard.

Kalp halkasının oluŐuŐu :

Kardiak halka oluşurken, tp boyunca yer yer geniŐlemeler belirir. BaŐlangıŐta Çift olan ve perikard dıŐında yer alan atrial kısım ortak bir atrium oluşturur ve perikardial boŐluk iÇine girer. Atrioventriküler bileŐke dar bir Şekilde kalarak, ortak atriumla erken embryonik ventrikülü birleŐtiren atrioventriküler kanalı oluşturur.

Bulbus kordis proksimal 1/3' dıŐında dardır. Bu kısım saŐ ventrikülün trabeküler kısmını, konus kordis olarak bilinen orta kısım da her iki ventrikülün Őıkımını oluŐturacaktır. Trunkus arteriozus denilen bulbusun distal parÇası, aorta ve pulmoner arterin kök ve proksimal bölümünü meydana getirecektir.

Kardiak septaların oluşumu :

Septum, tek bir doku kütesinin kalbin bir duvarından karşı duvarına doğru aktif bir şekilde büyümesiyle de oluşabilir. Böyle doku kütlelerinin oluşumu, hücre çoğalması ve ekstrasellüler matriks sentez ve depolanmasına dayanır. Endokardial yastıklar olarak bilinen bu doku kütleleri atrioventriküler ve trunkokonal bölgelerde gelişir. Bu bölgelerde, atrial ve ventriküler septumların membranöz kısımlarının, atrioventriküler kanalların, aortik ve pulmoner kanalların oluşmasına yardımcı olurlar. Anahtar konumları nedeniyle gelişimlerdeki bir anormallik, atrial ve ventriküler septal defekt, büyük damarları ilgilendiren defektler (örneğin büyük damar transpozisyonu) ve Fallot tetralojisi gibi kardiak malformasyonların ortaya çıkışında önemli rol oynar. Trunkokonal yastıkların hücreleri, nöral krest kökenli olduğundan, kardiak anomaliler genellikle krestle ilgili kraniofasial defektlerle birlikte seyreder (23).

Trunkus arteriozus ve konus kordiste septum oluşumu :

5. haftada trunkusun sefalik kısmından bir çift karşılıklı şişkinlik (ridge) belirir. Trunkus şişkinlikleri veya yastıkları denilen bu yapıları sağ üst duvarda (sağ üst trunkus şişliği) ve sol üst duvarda (sol üst trunkus şişliği) yerleşmişlerdir. Bu şişkinlikler, birleşmenin tamamlanmasından sonra, trunkusu aortik ve pulmoner kanallara bölen aortikopulmoner septumu oluştururlar.

Trunkus şişkinliklerinin belirmediği sırada, konus kordisin sol ön ve sağ arka duvarları boyunca da benzer şişlikler (yastıklar) gelişir. Trunkusun septumu tamamlandıktan sonra, konus şişkinlikleri bu septumla birleşmek için birbirlerine ve distale doğru büyürler.

Sağ konus şişkinliğinin proksimal ucu, sağ atrioventriküler orifisin üst sınırında sonlanır. Sol konus şişkinliği, müsküler interventriküler septumun ön bacağıının sağ tarafı boyunca proksimale doğru uzanır.

İki konus şişkinliği birleştiğinde, septum, konusu anterolateral ve posteromedial olmak üzere iki kısma böler.

Müsküler interventriküler septum üzerinde bulunan interventriküler foramenin genişliği, konus septumun tamamlanmasıyla küçülür. Daha sonra bu foramen, alt endokardial yastıktan gelen dokunun, müsküler interventriküler septumun üstü boyunca büyümesiyle kapanır. Bu doku kendi yakınındaki konus septum parçalarıyla birleşir. İnterventriküler foramen, tümüyle kapandıktan sonra interventriküler septumun membranöz kısmı haline gelir (24).

Trunkus ve konus anomalileri :

Bu bölgede en sık görülen anomali, trunkokonal septumun öne doğru yer değiştirmesi sonucu oluşan, konusun eşit olmayan bir şekilde bölünmesidir. Bu anomali, pulmoner infundibuler stenoz olarak bilinen sağ ventrikül çıkışının daralması ve interventriküler septumdaki geniş bir defektle karakterizedir. Aorta, septum defektinin üzerinden, her iki ventrikül boşluğundan çıkar ve sağ taraftaki yüksek basınç sağ ventrikül duvarının hipertrofisiyle sonuçlanır. Fallot tetralojisi olarak bilinen bu anomali siyanotik kalp hastalıklarının en önemli tipidir (25, 26).

Trunkokonal şişliklerin birleşmemesi ve ventriküllere doğru inmemesi persistan trunkus arteriozusla sonuçlanır. Bu anomalide, pulmoner arter, bölünmemiş trunkusun bir miktar üstünde yer alır. Şişkinlikler interventriküler septumun oluşmasında da yer

aldığından, persistan trunkus her zaman interventriküler septum defektleriyle birlikte dir.

Bazen trunkokonal septum spiral rotasını izleyemez ve doğruca aşağıya yönelir. Bunun sonucu, aorta sağ ventrikülden, pulmoner arterde soldan çıkar. Büyük damar transpozisyonu olarak bilinen bu anomaliye sıklıkla interventriküler septumun membranöz kısmındaki bir defekt eşlik eder.

Semilunar kapakçık anomalileri :

Bu önemli anomali grubunda, pulmoner arter ve aortanın semilunar kapakçıkları değişik uzaklıklarda birleşmişlerdir; hatta imperfore bir diafram bile oluşturabilirler. Görülme sıklığı her iki bölge için de aynı olup 3-4/10.000'dir.

Aortik arkuslar :

Brankial arkuslar gelişimin 4-5. haftalarında oluşurken her arkus kendi kranial sinirini ve arterini alır. Bu arterler aortik arkuslar olarak bilinir ve trunkus arteriozusun en distal kısmı aortik keseden gelişirler. Bu aortik kese sonuçta 6 çift arter meydana getirir.

Trunkus arteriozusun aortikopulmoner septum tarafından bölünmesi, kalbin akım çıkış kanalını ventral aorta ve pulmoner arter olarak ikiye ayırır. Bundan sonra aortik kese sırasıyla, brakiosefalik arter ve aortik arkusun proksimal segmentini meydana getiren sağ ve sol boynuzları oluşturur.

KONOTRUNKAL KARDİAK ANOMALİLER

Fallot tetralojisi :

Fallot tetralojisi konjenital kalp hastalıklarının %5-7'sini oluşturur. 1973'te Campbell (27) değişik kalp hastalıklarının prevalansını ortaya koyan bir seri yayınlamış. Bu seride Fallot tetralojisinin prevalansı %5.8 bulunmuş. Mitchell ve arkadaşları (28) 56.000 doğumu incelediklerinde prevalansı %3.5 bulmuşlar. Fakat kardioloji merkezlerine değerlendirmek için gönderilen hastalarda prevalans daha yüksek bulunmuş. Bu serilerden bazıları şunlardır ; Rowe (%9.7) (29), Kramer (%10.4) (30) ve New England Regional Cardiac Program (%11) (31). Bunun nedeni Fallot tetralojisinin ağır bir kardiyak malformasyon olması ve daha çok refere edilmesi olabilir.

Fallot tetralojisinin etyolojisi belli değildir. Fallot tetralojisi ve diğer konjenital kalp hastalıkları genellikle izole anomaliler olarak görülmesine rağmen, Fallot tetralojili çocuklarda ekstra kardiyak malformasyon görülme oranı oldukça yüksektir. Fallot tetralojisinde bu oran %15.7 (30) iken, diğer konjenital kalp hastalıklarında %6.8'dir. Ek olarak Fallot tetralojisinde görülen ekstra kardiyak malformasyonlar diğer konjenital kalp hastalıklarında görülenlere göre daha ağırdır. Bunlar yarı damak, yarı dudak, hipospadias ve iskelet malformasyonlarıdır. Ayrıca Fallot tetralojisi bazı sendromlarla da oldukça sık görülür. Bunlar Velokardiofasial Sendrom, VACTERL ve CHARGE Sendromlarıdır (32,33).

Genelde Fallot tetralojisi sporadik olarak oluşur ve familial değildir. Fakat Fallot tetralojili çocukların kardeşlerinde Fallot tetralojisi görülme sıklığı normal popülasyona göre daha fazladır (34). Nora ve Nora'nın çalışmasında gösterilmiştir ki, ebeveynlerden

birinde Fallot tetralojisi varsa çocuklarında %4 oranında tekrarlama riski vardır. Bu kardeşlerde görülen %3 rekürrens riskinden fazladır. Bu da genetik ve çevresel etkilerin beraber olduğu multifaktöryel bir kalıtım şeklini işaret etmektedir. Aile öyküsünün olmadığı vakalarda şu ana kadar bilinmeyen bazı çevresel faktörlerin rol oynayabileceği tahmin edilmektedir. Kesin olarak saptanabilmiş bir teratojen olmasa da, potansiyel çevresel teratojenler olarak viral enfeksiyonlar, ilaçlar (trimetadione, seks hormonları, talidomid) düşünülebilir (33).

Trunkus arteriosus

"Trunkus arteriosus", kalpten çıkan tek büyük arterin koroner, pulmoner ve sistemik arterlere orijin olmasını ifade etmektedir (35,36).

Ekstrakardiyak anomaliler %20 vakada görülür (37). En sık birlikte görülen anomali Di George anomalisidir. Di George anomalili olguların %26'sında trunkus arteriosus görülür (38,39). Ayrıca Di George anomalisi ile birlikte kesintili arkus aorta varsa, bunlarda %33 oranında trunkus arteriosus görülür (7).

Kesintili arkus aorta

Kesintili arkus aorta konjenital kalp hastalıklarının %1'inden azını oluşturur. Kesintili arkus aorta diğer konotrunkal anomalilerle beklenenden daha fazla birlikte görülür. Daha az sıklıkla aortikopulmoner pencere ve Down Sendromu ile birlikte görülen endokardiyal yastık defekti ile birlikte görülür.

Kesintili arkus aortanın diğer bir ilginç yanı ise Di George anomalisi ile olan ilişkisidir. Di George anomalili olgularda %30 oranında B tipi kesintili arkus aorta görülür (40). B tipi kesintili arkus aortası olan olguların %68'inde Di George anomalisi saptanır.

Büyük arter transpozisyonu

Konjenital kalp hastalıkları içinde büyük arter transpozisyonu yeri %5 kadardır. Büyük arter transpozisyonunun etyolojisi belli değildir. Büyük arter transpozisyonu genellikle herediter sendromlarla veya kromozomal anormalliklerle birlikte görülmez. Ekstrakardiak malformasyonlar genellikle nadirdir (%7) ve bunlar çoğunlukla minor malformasyonlardır (41). Büyük arter transpozisyonu sporadik oluşur ve famiyal değildir. Fakat transpozisyonlu vakaların kardeşlerinde transpozisyon görülme riski normal popülasyondan fazladır (33,34). Bu da genetik ve çevresel etkilerin rol oynadığı multifaktöryel kalıtım şeklini desteklemektedir. Belirli bir kalıtım şekli bulunamamasına rağmen, büyük arter transpozisyonu erkeklerde kadınlara göre 2 kat fazla görülür ve bunun açıklaması şimdiye kadar yapılamamıştır. Cinsiyete göre farklılık görülmesine rağmen ırksal bir predileksiyon saptanamamıştır. Belirli bir etyolojik faktör saptanamamasına rağmen diabetik annelerin çocuklarında beklenenden daha fazla görülmektedir (42). Nora ve Nora'nın çalışmasında diğer potansiyel çevresel etkilerin ki bunlar amfetaminler, trimetadion ve seks hormonlarıdır, büyük arter transpozisyonunun oluşumunda rol oynayabildiği düşünülmektedir (33).

Aort stenozu

Konjenital kalp hastalıklarının %3-8'ini oluşturur. Etiyolojisi bilinmemektedir. Bazı ailelerde sık görülebilir. Son yapılan çalışmalarda eğer baba etkilenmişse çocukta görülme riski %3 iken, anne etkilenmişse risk %13-18 arasındadır. Mitokondrial kalıtım, yavaş virus enfeksiyonunun vertikal transmisyonu bu farklılık için suçlanmıştır (43).

Aort koarktasyonu

Konjenital kalp hastalıkları arasında %5-8 oranında görülür. Erkekler olguların 2/3'ünü oluşturur. Bunun bir istisnası abdominal koarktasyondur. Bu kadınlarda daha sık görülür. Irksal farklılıklar pek görülmesine de Asyalı çocuklarda daha az sıklıkla görülür.

Over agenezisi olan kısa boylu Turner Sendromlularında aort koarktasyonu %15-20 arasında görülür. Bu durum mozaik formlarda görülmez. Nadir olarak famiyal patern gösteren aort koarktasyonu da bildirilmiştir (44).

Trikuspit atrezisi

Siyanotik konjenital kalp hastalıkları arasında 3. en sık görülenidir. Konjenital kalp hastalıkları arasında %0.3 ile %3.7 arasında görülür.

Pulmoner stenoz

Konjenital kalp hastalıklarının %7 ile %12'sini oluşturur. Campbell pulmoner stenozlu kişilerin kardeşlerinde %2.2 oranında pulmoner stenoz olduğunu göstermiştir (45). Ackerman ve arkadaşlarının hemofili A'lı hastalarda yaptıkları çalışmada pulmoner stenozun X'e bağlı dominant geçiş gösterebildiğini saptamışlardır (46). Mallette ve arkadaşları transient konjenital hipoparatiroidizm ile pulmoner stenoz arasında pozitif bir korelasyon olabileceğini öngörmüşlerdir (47).

Aortiko-pulmoner pencere

Aortiko-pulmoner pencere nadir rastlanan konjenital bir malformasyon olup, aorta ile pulmoner arterin, aorta kapaklarının hemen üzerinde birbiri ile bir defekt aracılığıyla birleşmesidir. Aortiko-pulmoner pencere fonksiyonel ve klinik belirtileri bakımından PDA'ya benzerlik göstermektedir.

DGS, VSFS, Conotruncal Anomaly Face Syndrome (CAFS) ile Konotrunkal Anomaliler Arasındaki İlişki

Bu hikaye 1981 yılında Finlandiyalı bir ailede 20q11 ve 22q11 bölgesini kapsayan bir otozomal translokasyonun yayınlanması ile başladı. Bu ailenin üyeleri olan 4 çocukta dengeli olmayan karyotipler saptandı ve 4'ünde de Di George Sendromu kliniği vardı. Bu raporda de la Chapelle ve arkadaşları (48) Di George Sendromunun 22q11'deki bir genin eksikliğinden olabileceğini öngördüler. Ayrıca bu raporda 1972'de Rosenthal ve arkadaşlarının (49) yayınladığı 22. kromozom monozomisi olan Di George Sendromlu bir olgudan da bahsettiler. Daha sonra Mascarello ve arkadaşları (50) 22q11'in Di George Sendromu etyolojisi üzerindeki çalışmasını yayımladı. En son olarak Peter Scrambler 22q11 bölgesine spesifik DNA problemlerini hazırlamaya başladı ve FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) yöntemi ortaya çıktıktan sonra bu interstisyel delesyon daha da yüksek sensitivitede saptanmaya başlandı.

FISH yöntemi :

FISH konvansiyonel analiz metodları ile tanımlanması çok zor veya imkansız olan bazı kromozomal anormallikleri tanımlamak için kullanılan, sitogenetik ile moleküler genetiğin birleşiminden oluşan bir tekniktir. "Kromozom boyama" terimi ilk defa Pinkel ve arkadaşları (52) tarafından 4. ve 21. kromozomların translokasyonlarının ve aneuploidinin gösterilmesinde kullanılmıştır. Bundan sonra bütün dünyada birçok laboratuvarın problemleri kromozom anormallikleri için bu tekniğin başarı ile kullanılabildiğini gösteren yayınlar yayınlandı.

FISH'in sitogenetik uygulanması (51) :

1. *Uygun prob kullanılması ile ;* konvansiyonel sitogenetik boyama metodlarından olan G, C, Q bantlama yöntemleri ile identifiye edilemeyen çok küçük kromozom parçalarının tanımlanması FISH ile yapılır. Orijini tamamen bilinmeyen kromozom parçaları ise daha özelleşmiş bir FISH tekniği olan "Reverse Chromosome Painting" ile saptanır. Burada kromozom parçasının kendisinden prob oluşturularak parçanın orijini saptanır.
2. Çok küçük kromozom parçalarını içeren kriptik translokasyonlarda transloke olan kromozom parçası normal bantlama yöntemleri ile gösterilemez. FISH transloke olan materyalin orijinini göstermek amacıyla kullanılır. Ayrıca kompleks translokasyonların gösteriminde kullanılır.
3. G-bantlama tekniğinin yetersiz kaldığı translokasyon kırılma noktalarının gösteriminde FISH çok yardımcıdır.
4. Kromozomal mikrolelesyonların gösteriminde kullanılır. Bir delesyonun ışık mikroskobu ile direkt görülebilmesi için en az 4000 kilobaz büyüklüğünde olması gerekmektedir. Oysa birçok mikrolelesyon bundan daha küçük olduğu için FISH yöntemi olmadan direkt ışık mikroskobu ile farkedilemez.
5. Prenatal tanıda aneuploidi tanısında kullanılır.
6. Metafaz yayması olmadan interfazda da kullanılır.

Konvansiyonel sitogenetiğin dezavantajları :

1. Bantlanmış kromozomların analizi için hücre kültürlerine ihtiyaç vardır.
2. Konvansiyonel sitogenetik için hücre kültürlerine ihtiyaç vardır.
3. Konvansiyonel sitogenetik kolaylıkla otomatize edilemez.
4. Çok deneyimli kişiler tarafından yapılması gerekir ve çok zaman alır.
5. İyi yapılmamış bantlama veya az sayıda metafaz yayması olduğunda sonuç alınamaz.
6. Kültür gerektirmesi ve bunun uzun zaman alması nedeniyle prenatal tanıyı yavaşlatır.
7. Kromozom translokasyonları bant analizi ile görülebileceğinden çok daha küçük olabilir.
8. Bant tekniklerinin interfaz sitogenetiğinde hiç yeri yoktur.

FISH'in avantajları :

1. Sensitif bir tekniktir.
2. Bütün kromozomu veya prob spesifik sekansları boyamak mümkündür.
3. Tekrarlayıcı sekansları suprese ederek spesifik sekansların lokalizasyonunu saptamak mümkündür.
4. Multipl renkli problemleri kullanmak mümkündür.
5. DNA sekansları hem metafazda, hem de interfazda lokalize edilebilirler.
6. Ticari kitler FISH'in çok kolay, güvenilir veya kolay tekrarlanabilen bir teknik olmasını sağlamıştır.
7. Floresan mikroskopları ve görüntüleme yöntemleri her geçen gün gelişmektedir.

FISH yönteminde iki faz vardır : Hibridizasyon ve Deteksiyon.

Hibridizasyon : Metafaz yayması halinde olan kromozom materyali yüksek ısıda denatüre edilir. Denaturasyondaki amaç çift sarmal olan kromozomal DNA'yı tek sarmal hale getirmektir. Aynı şekilde çift sarmal olan DNA probu da denatüre edilerek tek sarmal hale getirilir ve birlikte inkübe edilir. Bu inkubasyon sırasında prob genomdaki uygun yere yapışır. Örnek olarak 7. kromozom probu kromozom 7'ye yapışır.

Deteksiyon : Hibridizasyondan 16 saat sonra yapılır. İndirekt metotta prob floresan boya (Florokrom) eklenmesi ile ultraviolet ışık altında vizualize edilir. Direkt metod ile, yani prob baştan floresan işaretli ise, işaretlenmiş ve işaretlenmemiş kromozomlar görüntülenir. İşaretlenmiş kromozomlar işaretlenmemiş olanlardan renk farkı ile ayrılır.

Sonuçta FISH sitogenetikçi için kromozom analizinde kullanılan çok yardımcı bir yöntemdir.

Di George Sendromu

1965'de Di George (53) timik ve paratiroid hipoplazisi, kardiyak defekt ve dismorfik yüz görünümü ile giden bir sendrom tanımladı ve buna Di George Sendromu ismi verildi. Bu sendromda görülen fasial anomaliler şunlardır :

- İç kontusun yana deplasmanı,
- Palpebral fissürler çoğunlukla kısa ve dardır,
- Burun kökü ve köprüsü geniştir,
- Filtrum kısadır,

- Kulaklar düşüktür ve posterior rotasyona uğramıştır. Kulağın antero-posterior çapı genişlediğinden kulaklar yuvarlak görünümündedir.

Conley ve arkadaşları (54) Di George Sendromunun konotrunkal kardiak defektlerle birlikteliğini göstermiştir. Özellikle Tip B kesintili arkus aorta %36, sağ çıkımlı aortik arkus %24, persistan trunkus arteriosus %32 oranında Di George Sendromunda görülür. Bu spesifik konotrunkal kardiak defektlerin Di George Sendromu ile ilişkisi Moerman ve arkadaşları (55) ve daha sonra Mierop ve Kutsche (7) tarafından ortaya konmuştur. Bu son iki çalışmada listeye Fallot tetralojisi de eklenmiştir.

Lammer ve Opitz (10) isotretinoin embriyopatisi sonucu Di George Sendromu oluşması nedeniyle etyolojik heterojeniteyi tartışmaya açmışlardır ve bu klinik durumun Di George Sendromu değil, Di George Anomalisi olarak adlandırılması gerektiğini, çünkü 3. ve 4. brankial arkusları içine alan bir gelişimsel defekt sonucu bu durumun oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Etiyolojik olarak Di George Anomalisi kromozom abnormaliteleri sonucu (22q11, 10p13 veya 17p13 delesyonları), mendelyan bozukluklar (velokardiofasial Zellweger Sendromu), teratojenler (alkol, maternal diabet, retinoidler) ve diğer assosiyasyonlar (Charge ve Kallmann Sendromu gibi) oluşabilir.

Mendelyan kalıtım yönüne gelince Di George Anomalisi otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı resesif şekilde geçebilir (54, 55).

Velokardiofasial Sendrom

1978'de Sphrintzen ve arkadaşları (56, 57) yarık damak, kardiyak anomaliler, öğrenme güçlüğü, gelişme geriliği ve dismorfik yüz görünümü ile karakterize Velokardiofasial Sendromu tanımladı. Yüzde görülen dismorfik bulgular şöyledir; Malar hipoplazi, belirgin burun, geniş burun kökü, retrografi ve minor kulak anomalileri. Kalıtım şekli otozomal dominant olarak saptandı.

Fallot tetralojisi de VCFS'de en sık görülen kardiyak abnormalitedir. Di George Anomalisi ile VCFS'nin klinik benzeşmeleri Lammer ve Stevens tarafından VCFS'li olguların bazılarında hipokalsemi, immün yetmezliklerin ortaya konmasıyla kanıtlanmıştır.

CAFS (Conotruncal Anomaly Face Syndrome)

1976'da Kinouchi ve Takao konotrunkal kardiyak anomalileri ve dismorfik yüz görünümü ile karakterize CAFS Sendromunu tanımladı (8). Takao ve arkadaşları (2) yüz görünümünü aşağıdaki tablodaki gibi sıraladılar (Tablo 4).

Tablo 4.

Yüz görünümü	%
Küçük ağız	88
Oküler hipertelorizm	86
İç kontusun lateral deplasmanı	84
Kısa palpebral fissürler	52
Alçak burun köprüsü	86
Strabismus	10
Ptoz	4
Yüksek damak	50
Malforme aurikularlar	70
Belirgin kulaklar	38
Düşük kulak	12

Ayrıca bu araştırmacılar Fallot tetralojisi olan Japon çocuklarının %10'unun bu yüz görünüşleri olduğunu öne sürdüler. Avustralyalı kardiyolog Radford'da trunkus arteriosus ve aortik arkus defekti olan çocukların aynı yüz özelliklerine sahip olduğunu gözlemledi (58, 59).

CATCH 22

İlk defa New Castle Tyne grubu tarafından 1993'te CATCH 22 (Cardiac, Abnormal Facies, Thymic Hypoplasia, Cleft Palate, Hypocalcemia) terimi ortaya atılmıştır. 22q11 mikrolelesyonunun görüldüğü DGA'lı hastalarda konotrunkal kardiyak anomalilerin sık görülmesi bu araştırmacıları konotrunkal kalp anomalilerin sık görüldüğü diğer klinik durumları araştırmaya yöneltti. Araştırmacılar gördüler ki konotrunkal anomalilerin sık görüldüğü Velokardiofasial ve CAFS'da da 22q11 mikrolelesyonu sıklıkla saptandı. Di George Anomalisi olan olguların %83, Velokardiofasial'li olguların %68'inde, CAFS'lı olguların %89'unda 22q11 mikrolelesyonu saptandı. Goldmuntz tarafından 1993'te non-sendromik konotrunkal kardiyak anomalilerde 22q11 mikrolelesyonu %29 oranında bulundu.

22q11 mikrolelesyonunun insidansı tam olarak bilinmemektedir. 1994'te Wilson ve arkadaşları (60) minimum prevalansın 1/4.000 canlı doğum olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu grubun yaptığı tahmine göre 22q11 mikrolelesyonu konjenital kalp hastalıklarının en az %5'inden sorumludur.

Tezenas ve arkadaşlarının (61) yaptığı çalışmada ise 22q11 mikrolelesyon prevalans tahmini ise 1/9.700'dür. Bu çok tipik vakalar içindir. Hafif veya atipik vakalar da eklenecek olursa, gerçek prevalans bu rakamdan olasılıkla daha yüksek çıkar.

Bu 4 klinik durumda (DGA, VCSF, CAFS ve izole konotrunkal kardiyak anomalileri) 22q11 mikrolelesyonunun saptanması

bunlarda ortak bir genetik etyoloji olduğunu ortaya koymaktadır. Fenotipteki değişikliklerin delesyondaki farklılıklardan, genetik ve in utero çevrenin farklılığından kaynaklandığı söylenebilir. Belki de 22q11 bölgesinde bir "kardiak kritik bölge" var ve bu bölge konotrunkusun gelişimi için gen veya genleri barındırmaktadır. Clark'a göre (15), kalp öyle bir organ ki, erken embryo döneminde birçok değişik bölgelerden yoğrularak embryolojik olarak oluşturulmaktadır.

Birçok kromozomal anomali çok değişik kardiak defektlerle birlikte görülür. Fakat bu 22q11 mikrodelesyonunun konotrunkus gelişimi açısından çok spesifik bir etkisi mevcuttur. Belki de Wadey ve arkadaşlarının (7) tanımladığı gibi kollagene benzer gen bu olaydan sorumludur. Diğer bir çalışmada Patterson ve arkadaşları (62) Keeshand köpeklerinde kardeşleri birbiriyle çiftleştirerek konotrunkal kardiak anomaliler oluşturmuş ve embryonik gelişim sırasında myokardial büyümeyi kodlayan tek bir major genin olduğunu öne sürmüşlerdir.

Diğer bir enteresan durum da, 22q11 mikrodelesyonu olan olgularda çok yüksek oranda psikiyatrik bozukluklar görülmesidir. Bu da delesyonun beyin fonksiyonlarını da etkilediğini göstermektedir.

Prenatal tanı :

FISH yöntemi 22q11 mikrodelesyonunun tespit edilmesi için en kolay ve kullanışlı yöntemdir. FISH hem kültüre edilmiş amnion hücrelerine, hem de korionik villi hücrelerine uygulanabilir. DNA ekstraksiyonuna ihtiyaç göstermez ve dozaj analizi için gerekli olan Southern Blot gibi zaman alıcı değildir. Sonuçlar dolayısıyla daha çabuk elde edilebilir. Klasik olarak fetal ultrason veya ekokardiografi

ile prenatal tanı verilen 22q11 mikradelesyonlu olgulara artık FISH yöntemi ile prenatal tanı vermek mümkündür.

22q11 mikradelesyonu olan olguların bunu gelecek nesillere aktarma riski %50'dir. Karyon villus yöntemi ile 10-12 gestasyon haftasında FISH ile bu ailelere prenatal tanı vermek gerekmektedir. Ebeveynleri normal olup, çocuklarında de novo delesyon olan ailelerde rekurrens riski düşük olmasına rağmen, germline mozaisizm tamamen dışlanamayacağı için bu ailelerde prenatal tanı vermek gerekmektedir.

OLGULAR VE YÖNTEM

Çalışmaya Ocak - Temmuz 1997 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran 24 konotrunkal kardiak anomalili olgu alındı. Olguların yaşları 10 gün ile 12 yaş arasında idi (ortalama 3.8), 17 olgu erkek, 7 olgu kız idi.

Hastaların kardiyolojik tanısı Pediatrik Kardiyoloji Bölümü tarafından ekokardiyografi, kardiak kateterizasyon veya her ikisi birlikte uygulanarak kondu.

Hastalar dismorfik yüz görünümü açısından değerlendirildi.

Hastalara Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda kromozom analizi yapıldı.

Periferal kan kültürü :

Periferal kan kültüründe besi ortamı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Periferik Kan Kültüründe Besi Ortamı.

Mc Coy's 5A Medium	(Gibco) 100 ml
%15 Fötal Calf Serum	(Gibco) 15 ml
%3.4 Fitohemaglutinin	(Gibco) 3.4 ml
%0.1 Penisilin-Streptomisin	(Gibco) 0.1 ml

İşlemler :

Moorheard ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek uygulandı. Mc Coy's 5A kültür ortamından 5 ml içeren steril (Falcon 15x1) deney tüpüne, hastadan heparinli enjektör kullanılarak alınan venöz kandan 15 damla (0.7 ml) damlatılarak ekim gerçekleştirildi. Tüplerin ağızları, hava ile teması önlemek için parafilm ile sıkıca sarıldı ve 72 saat 37°C'de etüvde bırakıldı.

Kromozom eldesi

Kullanılan solüsyonlar :

- A) *Kolçisin solüsyonu* : 1 mg'lık kolçisin tableti (colcemide CIBA) 10 ml bidistile suda çözüldü. Elde edilen bu stoktan 1 ml alındı ve 9 ml bidistile su ilave edilerek final konsantrasyonunun 10 mg/ml olması sağlandı. +4°C'de buzdolabında saklandı.
- B) *Tripsin solüsyonu* : 0.1 tripsin (Difco) tartılıp 100 ml fosfat tamponunda çözüldü.
- C) *İzotonik Tri Sodyum Sitrata Solüsyonu* : 2.51 gr tri sodyum sitrat (2 sulu) (Merck) tartılarak 9.75 ml su ile çözülmesi sağlandı.

0.22 μm 'lik steril filtreden geçirilerek steril kültür kabında, +4°C'de buzdolabında saklandı.

D) *Hipotonik solüsyonu* (Periferal kan kültürü için) : 0.075 M KCL (Merck) olacak şekilde 0.5592 gr tartılarak 100 ml bidistile suda çözüldü. 37°C'de etüvde saklandı. Kullanımdan önce 37°C'de bekletildi.

E) *Fiksatif solüsyonu* : 3 kısım metanol (Merck) ve 1 kısım glisial asetik asit (Merck) kullanmadan hemen önce karıştırılarak taze hazırlandı.

Lamların temizliği :

Kromozom eldesinden bir gün önce, her bir lam (Menzel glasser) tek tek beyaz sabun, gazlı bez ve bol akar su ile iyice yıkandı. Çalışma anına kadar distile su içinde buzdolabında saklandı.

İşlemler

Periferal kan kültüründen kromozom eldesi :

70'inci saatte deney tüpüne son konsantrasyon 0.1 mgr/ml olacak şekilde 0.05 ml kolşisin ilave edildi. 72. saatte besi ortamı ve hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak kültür tüpünden santrifüj tüplerine aktarıldı. 7 dakika 900 rpm'da santrifüj edildi. Çökelti atılarak, pastör pipeti ile hafifçe karıştırıldı. Üzerine yaklaşık 8 ml, oda ısısında bekletilmiş hipotonik solüsyonu ilave edilerek 10 dakika 37°C'de etüvde bekletildi. Daha sonra 7 dakika aynı devirde santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve çökelti pipetle hafifçe karıştırıldı. Yaklaşık 3 ml fiksatif solüsyonu hızla ilave edilerek

hemen pipetaj yapıldı. 900 rpm'da 5 dakika santrifüj edildi. Fiksatif ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Son yıkamada çökeltinin miktarına göre çok az fiksatif bırakılarak gerisi atıldı ve iyice karıştırıldı. Soğuk, temiz gazlı bezle kurulanmış ve hohlama yöntemi ile nemlendirilmiş lam üzerine çökeltiden bir damla damlatılarak havada kurutuldu. Preparatlar 37°C'lik etüve kaldırılarak üç gün yaşlandırıldı.

GTG bantlama tekniği

Seabright'ın modifiye GTG bantlama tekniği kullanılarak tüm preparatlar bantlandı (62,63).

Kullanılan solüsyonlar :

- A) *Fosfat tamponu* : 4.5 gr NaCl (Merck) ve 6 tablet pH 7 fosfat tampon tableti (Russell) 500 ml bidistile suda çözüldü.
- B) *Tripsin solüsyonu* : 0.1 tripsin (Difco) tartılıp 100 ml fosfat tamponunda çözüldü.
- C) *Sörensan tamponu* :
- a solüsyonu : 9.08 gr KH₂HP0₄ (Merck) 1000 ml bidistile suda çözüldü.
- b solüsyonu : 11.98 gr Na₂HP0₄ (Merck) 100 ml bidistile suda çözüldü.
- a solüsyonundan b solüsyonuna ekleyerek pH 6.8' gelene kadar her iki solüsyon karıştırıldı.
- D) *Giemsa boya solüsyonu* : 4 ml Giemsa (Merck) boya solüsyonu 96 ml Sörensan tamponu (pH 6.8) ile 100 ml'ye tamamlandı.

İşlemler

Preparatlar yayılan metafazın açık yada koyu görünümüne ve preparat yaşına bağlı olarak 5-10 saniye süreyle tripsin solüsyonunda tutuldu. Akan musluk suyunda iyice yıkandıktan sonra Giemsa boyasında 5 dakika boyandı. Bu süre sonunda tekrar musluk suyundan geçirilen preparatlar kademeli olarak kurutma kağıdı (Whatman 40) ile kurutuldu. Preparatlar 20 dakika Xylol'de tutularak Kanada balsamı (Entellan, Merck) ile kapatıldı.

Mikroskopik analiz

Her olgudan elde edilen tüm preparatlardaki metafazlar ışık mikroskopunda (Nikon) 100'lük objektifte en az 5, en çok 30 metafaz incelenerek analiz edildi. Gözlenen yapısal anormallikler ISCN 1985'e göre değerlendirildi.

Daha sonra -20°C 'de saklanmış GTG ile bantlanmamış metafaz yaymalarına FISH uygulandı.

Floresan in situ hibridizasyon yöntemi :

- 1) 2xSSC (Saline sodyum sitrat tamponu).

Bunu hazırlamak için stok solüsyon 20xSSC'den 25 ml alındı (Sigma katalog no: S6639). pH 5.3'e ayarlandı. Daha sonra üzerine 175 ml distile su ilave edilerek 2xSSC dilue solüsyon elde edildi. pH 7-8 olacak şekilde ayarlandı.

- 2) %70 Formamide solüsyonu (Denaturasyon solüsyonu).
49 ml Formamide solüsyonu (Sigma katalog no: F7503) alındı. Üzerine pH 5.3'teki 7 ml 20xSSC ilave edildi. 14 ml distile su ile toplam hacim 70 ml'ye getirildi ve pH 7-8'e ayarlandı.
- 3) %50 Formamide solüsyonu.
105 ml Formamide alınıp, üzerine 21 ml 20xSSC (ph:5.3) konuldu. 84 ml distile su ilave edilerek pH 7-8'e ayarlandı.
- 4) Dehidratasyon solüsyonu.
%70'lik, %85'lik ve %100'lük etil alkol serileri hazırlandı.
- 5) 2xSSC/%0.1 NP-40 solüsyonu.
NP-40 (deterjan) (Vysis katalog no:32-804818)'dan 100 µlt alınıp 100 ml'lik 2xSSC solüsyonuna ilave edildi.

Kullanılan kimyasal malzemeler :

- 1) DNA probu : Çift sarmal floresan işaretli dual renkli, 22q11.2 ve 22q13 bölgelerine spesifik DNA probu.
SOLSI Di George/VCSF probu (Vysis, katalog no:32-191028) D22553, D225609 ve D225942 lokusları ile hibridize olur.
SGLSI ARSA kontrol probu (Vysis katalog no: 32-191028) telometrik dizi olan 22q13 bölgesi ile hibridize olur.
- 2) Hibridizasyon Buffer (Tampon) : LSI hibridizasyon buffer (Vysis, katalog no:32-804826) sodyum klorid, sodyum sitrat, dekstran sülfat ve formamid içermektedir.
- 3) DAPI II Counterstain (Zemin boyası) : DAPI II Counterstain (Vysis, katalog no:32-804831) LSI prob için optimize edilmiştir. İçeriği 4-6diamidino-2-pheniylindole, p-phenylendiamine, fosfat tampon ve gliserol içerir.
- 4) Rubber sement (yapıştırıcı).

FISH tekniğinin uygulanması

Ön hazırlık :

-20°C'de saklanan GTG ile bantlanmamış, yaşlandırılmamış preparatlar çıkarılarak kurutuldu. Işık mikroskopunda (Nikon) 10 büyütme ile metafazın yoğun olduğu alanlar işaretlendi.

Prob karışımının hazırlanması :

Her bir preparat için 7 µl hibridizasyon buffer
 2 µl distile su
 1 µl DNA prob

1 ml'lik Ependrof tüpüne konularak kısa süre santrifüj edildi. Denaturasyon öncesi en az 15 dakika 37°C'de bırakıldı.

Denaturasyon işlemi :

Denaturasyon işleminden 30 dakika önce su banyosuna konulan %70'lik formamide 73°C'ye getirildi. Preparatlar ve prob 2 dakika denatüre edildi.

Dehidratasyon işlemi :

Denatüre edilen preparatlar hiç kurutulmadan soğukta %70, %85 ve %100'lük alkol serilerinden her birinde 2'şer dakika tutularak geçirildi.

Kurutma işlemi :

Alkolden geçirilen preparatlar önce havada hızla kurutuldu. Daha sonra 45°C'de 2 dakika tutularak ön ısınma sağlandı.

Hibridizasyon işlemi :

Prob karışımından 10 µlt her preparatın üzerine konularak kenarları Rubber Sement'le kapatıldı ve 37°C'lik etüvde 16 saat bekletildi.

Yıkama işlemleri :

Hibridizasyonu takiben zemini temizlemek ve sinyallerin belirginleşmesini sağlamak amacı ile 46°C'deki su banyosunda bulunan %50'lik 3'lü formamide solüsyonlarında 10'ar dakika preparatlar tutuldu. 10 dakika 2xSSC'de ve en son 5 dakika 2xSSC/%0.1 NP-40 solüsyonunda bekletildi. Çıkarılan preparatlar havada hızla kurutuldu.

Counterstain uygulanması :

Kurutulan her preparatta işaretli alana 10 µlt DAPI II konularak floresan mikroskopta spektrum orange, spektrum green kullanılarak 22q11.2 bölgesi ile hibridize olan lokus kırmızı, kontrol olarak işaretlenen 22q13 bölgesi ile hibridize olan lokus ise yeşil renkli gözlendi (Bakınız; Fotoğraf)



Fotoğraf: 22q11.2 bölgesi ile hibridize olan lokus kırmızı, kontrol olarak işaretlenen 22q13 bölgesi ile hibridize olan lokus ise yeşil renkli gözlendi

BULGULAR

- Çalışmaya alınan 24 olgunun yaşları 10 gün ile 12 yaş arasında değişiyordu (ortalama 3.8). Olguların cinsiyetlerine göre dağılımı 17'si erkek, 7'si kız şeklinde idi.
- Hastalara ekokardiyografi, kardiak kateterizasyon veya her ikisi birlikte uygulandı. Olguların 12'sinde Fallot tetralojisi, 7'sinde pulmoner stenoz, 2'sinde büyük arter transpozisyonu, 1'inde aort stenozu, 1'inde ASD ve bikuspit aorta, 1'inde aortiko-pulmoner pencere saptandı.
- Olguların hiçbirinde dismorfik görünüm saptanmadı.
- Hastaların GTG bantlama yöntemi ile yapılan kromozom analizinde kromozomal aberasyona rastlanmadı.
- -20°C'de saklanan metafaz yaymalarına FISH yöntemi uygulandığında, hiçbir olguda 22q11 mikrolelesyonu saptanmadı.

TARTIŞMA

Yeni tanı almış konjenital kalp hastalıklı olguların ailesine pediatrik kardiolog nadiren bu hastalığın nedeni açısından yeterli açıklama yapabilir. Rekürens riskleri genellikle genetik nedenlerin anlaşılması yolu ile değil, epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre verilir. Son yıllarda moleküler genetik tekniklerin çocuklarda görülen kalp hastalıklarında uygulanması, karanlıkta kalan birçok konunun açığa çıkmasına yol açmıştır. Bunların arasında bazı aritmiler, kardiyomyopatiler ve bazı strüktürel defektler sayılabilir (21).

Di George anomalisi, Velokardiofasial sendrom ve CAFS'ta 22q11 mikrodelesyonunun sıklıkla saptanması ve bunlarda konotrunkal kardiak anomalilerin görülmesi, son yıllarda non-sendromik konotrunkal kardiak anomalilerde 22q11 mikrodelesyonunun saptanmasına yönelik birçok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır.

Bunlardan ilki 1993'te Goldmuntz'un (1) yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada 17 non-sendromik konotrunkal kardiak anomalili hastadan 4'inde (%29) 22q11 mikrodelesyonu saptanmış ve Goldmuntz tüm non-sendromik konotrunkal kardiak defektlerde 22q11 mikrodelesyonunun araştırılması gerektiğini öne sürmüştür.

Aynı şekilde Johnson ve arkadaşlarının 1996'da yaptığı çalışmada (65) 140 basit Fallot tetralojili (pulmoner atrezisi olmayan Fallot tetralojisi) hastanın 11'inde (%8) 22q11 mikrodelesyonu saptanmış. Johnson basit Fallot tetralojisinde %5-15 arasında delesyon saptanabileceği ve aşağıdaki tabloda verilen kardiyak anomalilerin 22q11 mikrodelesyonu açısından analiz edilmeleri gerektiğini belirtmiştir.

Tablo 6. 22q11 Mikrodelesyonu Araştırılması Gereken Konjenital Kardiyak Defektler (65).

Trunkus arteriosus
Kesintili arkus aorta
Pulmoner valvin olmaması
Pulmoner stenoz
Pulmoner atrezi ile birlikte olan Fallot tetralojisi
Basit Fallot tetralojisi
Pulmoner arterin aortadan anormal çıkımı
Büyük arter transpozisyonu
Cerrahi sırasında timusu saptanmamış tüm konjenital kalp hastalıkları

Johnson'un görüşü hastaları dismorfik özellikler yönünden değerlendirmenin objektif değil, subjektif bir yöntem olduğu; zaten çok siliik olan dismorfik bulguların özellikle küçük çocuklarda atlanabileceği yönündedir. Bu yüzden 22q11 mikrodelesyonunun erken teşhisinin özellikle prenatal tanı açısından çok önemli olması nedeniyle konotrunkal kardiyak anomalili hastaların sendromik olsunlar veya olmasınlar delesyon açısından araştırılması gerektiğini belirtmiştir.

Ayrıca Johnson 22q11 mikrodelsyonunun konjenital kalp hastalığı olmayan izole hipoparatiroidizm, psikiyatrik hastalıklar özellikle şizofreni, öğrenme güçlüğü, büyüme hormonu eksikliği ve juvenil romatoid artritte de saptandığını öne sürmüştür (65).

Weber'in 1996'da yaptığı çalışmada (66) 46 hasta çalışmaya alınmış. 23 Fallot tetralojisinden 1'inde, 11 pulmoner atrezi ile birlikte olan Fallot tetralojisinden 3'ünde ve 4 tip B kesintili arkus aortadan 2'sinde 22q11 mikrodelsyonu saptanmış. Dismorfik yüz görünümü olmayan 27 hastanın hiçbirinde 22q11 mikrodelsyonu saptanmadığı bildirilmiştir. Weber böylece dismorfik yüz görünümü olmayan konotrunkal kardiak anomalilerin 22q11 mikrodelsyonu açısından incelenmemesi gerektiğini öne sürerek Johnson'un görüşlerine karşı çıkmıştır. Ayrıca Goldmuntz'un çalışmasını eleştirerek, bu çalışmada çıkan non-sendromik hastalardaki %29 oranında 22q11 mikrodelsyonun gerçeği yansıtmadığını öne sürmüştür. Weber'e göre Goldmuntz'un çalışmasında 22q11 mikrodelsyon çıkma olasılığı çok yüksek olan kesintili arkus aortası olan vakalar %41 gibi tüm vakaların büyük çoğunluğunu oluşturması, bu delesyon oranının beklenenden daha yüksek oranda çıkmasına yol açmıştır. Ayrıca non-sendromik diye nitelenen vakaların çoğunda silik dismorfik bulguların olabileceğini öne sürmüştür.

Di Gilio ve arkadaşlarının 1997'de yaptıkları çalışma (67) Weber'in bulgularını destekler niteliktedir. Bu çalışmada non-sendromik 205 konotrunkal anomalili olgudan sadece 1'inde 22q11 mikrodelsyonu saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca sendromik hastalarda da delesyon araştırılması yapılmıştır. Buna göre bazı konotrunkal kardiak defektlerin daha yüksek sıklıkta 22q11 mikrodelsyonu ile birlikte olduğunu saptamışlar; kesintili arkus aorta %55, trunkus arteriosus %30, pulmoner atrezi ile birlikte olan

Fallot tetralojisi %32 oranında 22q11 mikrolelesyonu göstermiştir. Bu çalışmada pulmoner atrezi ile birlikte olmayan Fallot tetralojisinde 22q11 mikrolelesyonunu bulma olasılığının çok düşük olduğu saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda 24 konotrunkal kardiak anomalili olgu çalışmaya alındı. FISH ile yapılan analizde hastalarda 22q11 mikrolelesyonu saptanmadı. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuç Di Gilio ve Weber'in çalışmalarındaki sonuçlar ile uyum göstermektedir.

Konotrunkal kardiak anomaliler konjenital kalp hastalıklarının yaklaşık %20'sini oluşturur ve sıklıkla 22q11 mikrolelesyonu ile birlikte dir. Konotrunkal kardiak anomalilerde 22q11 mikrolelesyonunun erken dönemde saptanmasının özellikle prenatal tanı vermek açısından büyük yararları vardır, ancak bizim çalışmamızdan çıkan ve daha geniş gruplarla çalışılan araştırmaların sonucuna göre dismorfik özellikleri değerlendirmeden postnatal tüm konotrunkal kalp hastalıklarında 22q11 mikrolelesyonu araştırması gereksiz görünmektedir.

SONUÇLAR

- Çalışmaya alınan 24 olgunun yaşları 10 gün ile 12 yaş arasında değişiyordu (ortalama 3.8). Olguların cinsiyetlerine göre dağılımı 17'si erkek, 7'si kız şeklinde idi.
- Hastalara ekokardiyografi, kardiak kateterizasyon veya her ikisi birlikte uygulandı. Olguların 12'sinde Fallot tetralojisi, 7'sinde pulmoner stenoz, 2'sinde büyük arter transpozisyonu, 1'inde aort stenozu, 1'inde ASD ve bikuspit aorta, 1'inde aortiko-pulmoner pencere saptandı.
- Olguların hiçbirinde dismorfik görünüm saptanmadı.
- Hastaların GTG bantlama yöntemi ile yapılan kromozom analizinde kromozomal aberasyona rastlanmadı.
- -20°C'de saklanan metafaz yaymalarına FISH yöntemi uygulandığında, hiçbir olguda 22q11 mikrodelesyonu saptanmadı.
- Bizim çalışmamız dismorfik özellikleri olmayan non-sendromik konotrunkal kardiak anomalilerde 22q11 mikrodelesyonunun araştırılmasına gerek olmadığını göstermiştir.

ÖZET

Bu çalışma konotrunkal kardiyak anomalili Türk çocuklarında 22q11 mikrolelesyonunu araştırmak amacı ile yapıldı.

Çalışmaya toplam 24 olgu alındı. Hastalar dismorfik özellikler açısından değerlendirildi. Olgular ekokardiografi, kardiyak kateterizasyon veya her ikisi ile birlikte kardiyolojik açıdan değerlendirildi. Olguların tümüne G bantlama ile kromozom analizi ve FISH yöntemi kullanılarak tek gen probu ile 22q11 mikrolelesyonu araştırılması yapıldı.

Hastaların hiçbirinde dismorfik özellik saptanmadı. Kardiyolojik değerlendirme sonucunda olguların 12'sinde Fallot tetralojisi, 7'sinde pulmoner stenoz, 2'sinde büyük arter transpozisyonu, 1'inde aort stenozu, 1'inde ASD ve bikuspit aorta, 1'inde aortiko-pulmoner pencere saptandı.

Kromozom analizi sonucunda hiçbir hastada kromozomal aberasyona rastlanmadı. FISH yöntemi ile olgularda 22q11 mikrolelesyonu saptanmadı. Bu bulgular daha geniş serilerde benzer sonuç alan araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu bulundu.

Çalışmamızda, dismorfik özellikleri olmayan non-sendromik konotrunkal kardiyak anomalilerde 22q11 mikrolelesyonunun araştırılmasına gerek olmadığı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Goldmuntz E, Driscoll D, Budarf ML, et al. Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects. *J Med Genet.* 1993; 30: 807-12.
2. Boughman JA, Berg KA, Astemborski JA, et al. Familial risk of congenital heart disease assessed in a population based epidemiology study. *Am J Med Genet.* 1987; 26: 839-49.
3. Nora JJ, Nora AH. Update on counseling the family with a first-degree relative with a congenital heart defect. *Am J Med Genet.* 1988; 29: 137-42.
4. Lacro RV. Dymorphology. In: Fyler DC, ed. *Nadas pediatric cardiology.* Philadelphia, PA: Hanley and Belfus, 1992: 46.
5. Di George AM. Discussion on a new concept of the cellular basis of immunology. *J Pediatr.* 1965; 67: 907-8.
6. Conley ME, Beckwith JB, Mancier JFK, Tenckhoff J. The spectrum of Di George Syndrome. *J Pediatr.* 1979; 94: 883-90.
7. Van Mierop LHS, Kutsche LM. Cardiovascular anomalies in Di George Syndrome and importance of neural crest as a possible pathogenetic factor syndrome. *Am J Cardiol.* 1980; 46: 643-7.
8. Young D, Shprintzen RJ, Goldberg RB. Cardiac malformations in the velo-cardio-facial syndrome. *Am J Cardiol.* 1980; 46: 643-7.
9. Shprintzen RJ, Wang F, Goldberg RB, Marion R. The expanded velo-cardio-facial syndrome : additional features of the most common clefting syndrome. *Am J Hum Genet.* 1985; 37: A77.
10. Lammer EJ, Opitz JM. Di George anomaly as a developmental field defect. *Am J Med Genet.* 1986; 29: 113-27.

11. Stevens CA, Carey JC, Shigeoka AO. Di George anomaly and velocardiofacial syndrome. *Pediatrics* 1990; 85: 526-30.
12. Judith GH. Catch 22. *J Med Genet.* 1993; 30: 801-2.
13. Driscoll DA, Budarf ML, Sellinger B, et al. Prevalance of 22q11 microdeletions in Di George syndrome : 22q11 interstitial deletions. *Am J Hum Genet.* 1990; 47: A215.
14. Driscoll DA, Salvin S, Sellinger B, et al. Prevalance of 22q11 microdeletions in Di George and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet.* 1993; 30: 813-7.
15. Dennis NR, Waren J. Risks to offspring of patients with some congenital heart defects. *J Med Genet.* 1981; 18: 8.
16. Hoffmann JIE. Congenital heart disease: Incidence and inheritance. *Pediatr Clin North Am.* 1990; 37: 25.
17. Nelson Textbook of Pediatrics. 15th edition. 1996; 384: 1286.
18. Lin AE, Garver KL. Genetic counseling for congenital heart defects. *J Pediatr.* 1988; 113: 1105.
19. Nora JJ, Nora AH. Maternal transmission of congenital heart disease: New recurrence risk figures and the questions of cytoplasmic inheritance and vulnerability to teratogens. *Am J Cardiol.* 1987; 59: 459.
20. Noonan JA. Syndromes associated with cardiac defects. *Cardiovasc Clin.* 1980; 11: 97.
21. Gessner IH, Victoria BF. Pediatric cardiology: A problem oriented approach. Philadelphia, WB Saunders. 1993.

22. Gross CM. The development of the median coordinated ventricle from the lateral hearts in rat embryos with three to six somites. *Anat Rec.* 1952; 112: 761.
23. Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 1983; 220: 1059-61.
24. Kramer TC. The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. *Am J Anat.* 1942, 71: 343.
25. Brinton WD, Campbell M. Necropsies in some congenital disease of the heart, mainly Fallot's tetralogy. *Br Heart J.* 1853; 15: 335.
26. Baffes TG, Johnson FR, Pott WV, Gibson S. Anatomic variations in tetralogy of Fallot. *Am Heart J.* 1953; 46: 657.
27. Campbell M. Incidence of cardiac malformations at birth and later, and neonatal mortality. *Br Heart J.* 1973; 35: 189.
28. Mitchell SC, Korones SB. Congenital heart disease in 56109 births. Incidence and natural history. *Circulation* 1971; 43: 323.
29. Rowe RW. Tetralogy of Fallot. Heart disease in infancy and childhood. 3rd edition. New York, Mc Millan, 1978.
30. Kramer H, et al. Malformation patterns in children with congenital heart disease. *Am J Dis Child.* 1987; 141: 789.
31. Fyler DC. Report of the New England Regional Infant Cardiac Program. *Pediatrics* 1980; 65: 375.
32. Lin AE, et al. The pattern of cardiovascular malformation in the CHARGE association. *Am J Dis Child.* 1987; 141: 1010.

33. Nora JJ and Nora AH. The evolution of specific genetic and environmental counselling in congenital heart diseases. *Circulation* 1986; 57: 205.
34. Nora JJ, McGill CW, and McNamara DG. Empiric recurrence risks in common and uncommon congenital heart lesions. *Teratology* 1970; 3: 325.
35. Collett RW, Edwards JE. Persistent truncus arteriosus. *Surg Clin North Am.* 1949; 29: 1245.
36. Crupi G, Macartney FJ, Anderson RH. persistent truncus arteriosus. *Am J Cardiol.* 1977; 40: 569.
37. Van Praagh S. The anatomy of common aorticopulmonary trunc and its embryologic implications. *Am J Cardiol.* 1965; 16: 406.
38. Raatikka M, et al. Familial third and fourth pharyngeal pouch syndrome with truncus arteriosus. *Di George Syndrome.* 1981; 67: 173.
39. Rohn RD, et al. Familial third-fourth pharyngeal pouch syndrome with apparent autosomal dominant transmission. *J Pediatr.* 1984; 105: 47.
40. Van Mierop LH and Kutche LM. Interruption of the aortic arch and coarctation of the aorta. *Am J Cardiol.* 1984; 54: 829.
41. Kramer H, et al. Malformation patterns in children with congenital heart disease. *Am J Dis Child.* 1987; 141: 789.
42. Rowland TW, Hubbell JP, Nadas AS. Congenital heart disease in infants of diabetic mothers. *J Ped.* 1973; 83: 815.
43. Nora JJ and Nora AH. Maternal transmission of congenital heart diseases. New recurrence risk figures and the questions of cytoplasmic inheritance and vulnerability to teratogens. *Am J Cardiol.* 1987; 59: 459.

44. Beckman RH and Robinow M. Coarctation of the aorta inherited as an autosomal dominant trait. *Am J Cardiol.* 1985; 56: 818.
45. Campbell M. Factors in the aetiology of pulmonary stenosis. *Br Heart J.* 1962; 24: 625.
46. Ackerman Z. Pulmonary valve stenosis and hemofilia A: Report of three cases discussion of a possible genetic linkage. *Arch Intern Med.* 1986; 146: 2233.
47. Mallette LE. Transient congenital hypoparatiroidism possible association with abnormalities of the pulmonary valve. *J Pediatr.* 1982; 101: 928.
48. De la Chapelle A, Herva R, Koivistone M, Avlo P. A deletion in chromosome 22 can cause Di George Syndrome. *Hum Genet.* 1981; 57: 253-6.
49. Rosenthal IM, Bocian M, Kimpotic E. Multiple anomalies including thymic aplasia associated with monosomy 22. *Pediatr Res.* 1972; 6: 358A.
50. Mascarello JT, Bastian JF, Jones MC. Interstitial deletion of chromosome 22 in a patient with the Di George malformation sequence. *Am J Med Genet.* 1989; 32: 112-4.
51. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridisation application in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetic* 1992; 7: 149-154.
52. Pinkel D, et al. Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Nat Acad Sci.* 1988; 85: 9138-42.
53. Di George AM. Discussion on a new concept of the cellular basis of immunology. *J Pediatr.* 1965; 67: 907.

54. Conley ME, Beckwith JB, Mancor JFK. The spectrum of the Di George Syndrome. *J Pediatr*. 1979; 94: 883-90.
55. Moerman P, Goddeeris P, Lauwerijns J. Cardiovascular malformations in Di George Syndrome. *Br Heart J*. 1980; 44: 459.
56. Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, et al. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies and learning disabilities: Velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate J*. 1978; 15: 56-62.
57. Shprintzen RJ, Goldberg RB, Young D. The velocardiofacial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics* 1981; 67: 167-71.
58. Radford DJ. Spectrum of Di George Syndrome in patients with truncus arteriosus: expanded Di George Syndrome. *Pediatr Cardiol*. 1988; 9: 95-101.
59. Radford DJ. Truncus arteriosus and facial dysmorphism. *Aust Paediatr J*. 1985; 21: 131-3.
60. Wilson DI, Cross IE, Wren C, et al. Minimum prevalence of chromosome 22q11 deletions. *Am J Hum Genet*. 1994; 55: A169.
61. Tezenas DM, Mendizabai H. Prevalence of 22q11 microdeletions. *J Med Genet*. 1996; 33: 719.
62. Patterson DF. A single major-gene defect underlying cardiac conotruncal malformations interferes with myocardial growth during embryonic development. *Am J Hum Genet*. 1993; 52: 388-97.
63. Lüleci G, Başaran S, Bağcı G, Keser İ. Sitogenetik uygulama yöntemleri. Meteksan Ltd Şti, 1.Baskı 1990, Ankara.

64. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 1971; 2: 971.
65. Johnson MC, Watson M. Chromosome 22q11 monosomy and the genetic basis of congenital heart disease. J Ped. 1996; 129: 1-3.
66. Weber SA, Hatchwell E. Importance of microdeletion of chromosomal region 22q11 as a cause of selected malformations of the ventricular outflow tracts and aortic arch : A three year prospective study. J Ped. 1996; 129: 26-31.
67. Di Gilio MC, Marino B, Granotti A. Conotruncal heart defects and 22q11 mikrodeletion. J Ped. 1997; 130: 675-6.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi

Tezimdeki katkılarından dolayı Dr Sibel
BERKER KARALÜZÜM'e teşekkür ederim.

Dr Gökhan ACAR