



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**  
**HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FALLOT TETRALOJİSİNİN NOTCH SİNYAL YOLAĞI İLE**  
**İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**  
**SYERİKGUL BOLAT**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Ender M. COŞKUNPINAR**

**Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı**  
**Tıbbi Biyoloji Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EKİM/2019**

## BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Syerikgul BOLAT

21/10/2019

## ÖZET

### Fallot Tetralojisinin NOTCH Sinyal Yolağı ile İlişkisinin Araştırılması

**Amaç:** Fallot Tetralojisi (FT) en sık görülen siyanotik kalp defektidir. FT tüm konjenital kalp hastalığının (KKH) %7-10'nu oluşturan multifaktöryel bir hastalıktır. FT hastaların en az %50-60'ıyla ilişkili genetik faktörlerin tespit edilemediği konjenital patolojilerinden biridir. Non-sendromik vakaların çoğu sporadiktir. NOTCH sinyal yolağında yer alan genlerin kalbin gelişiminde ve farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmamızda FT tanısı almış hastaların NOTCH sinyal yolağı ile ilişkisini belirlemek amacıyla bu yolda yer alan, hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen NOTCH1 ve NOTCH2 genlerin ekspresyon seviyelerinin tespit edilerek, hem FT patofizyolojisi hem de prognoza yönelik moleküler mekanizmaların ortaya konması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya, İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Kalp ve Damar Cerrahisi Polikliniğine başvurmuş, ebeveynlerinden yazılı bilgilendirilmiş onam formu imzalatılan, FT tanısı almış 8 gönüllü dahil edilmiştir. Cerrahi işlem sırasında alınan doku örnekleri çalışma yapılana kadar -80° derin dondurucuda bekletildi. Homojenizasyon sonrası total RNA izolasyonu yapıldı. cDNA sentezi ve cDNA kontrol PZR'ı yapıldıktan sonra ilgili genlere ait dizayn edilen primerlerle Real Time PCR metodu ile optimize kondüsyonlarda mRNA ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Gönüllülerin klinik ve demografik verileriyle eşleştirilen ekspresyon sonuçları kategorik özelliklerin karşılaştırılmasında kıkare, ekspresyon datasının analizinde  $2^{\Delta\Delta CT}$  metodu kullanılarak elde edilen tüm veriler SPSS 20.0 Version ile değerlendirildi.

**Bulgular:** NOTCH1 ve NOTCH2 genleri mRNA ekspresyon seviyesi bakımından FT'li hastaların kontrol grubu ile kıyaslandığında 66 ve 12 kat değişim değerine sahip ve en az 2 kat upregüle olarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Gen ekspresyon artışı tespit edilen NOTCH1 ve NOTCH2 genleri istatistiksel olarak analiz edildiğinde  $p=0.000006$  ve  $p=0.000414$  olarak anlamlı farklılık gösterdikleri bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Fallot Tetralojisi, mRNA Ekspresyonu, NOTCH Sinyal Yolağı, NOTCH1, NOTCH2

## ABSTRACT

### **Investigation of the Relationship with NOTCH Signaling Pathway of Tetralogy of Fallot**

**Aim:** Tetralogy of Fallot (TOF) is the most common cyanotic congenital heart defect. TOF is a multifactorial disease that constitutes 7-10% of all congenital heart disease (CHD). TOF is one of the congenital pathologies in which genetic factors associated with at least 50-60% of patients cannot be detected. Most non-syndromic cases are sporadic. NOTCH signaling pathway genes are known to play an important role in the development and differentiation of the heart. The aim of this study was to determine the expression levels of NOTCH1 and NOTCH2 genes, which were predicted to be related to the disease in this pathway and to determine the molecular mechanisms of TOF pathophysiology and prognosis.

**Materials and Methods:** The study included 8 volunteers who had applied to the Pediatric Cardiovascular Surgery Polyclinic of İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Training and Research Hospital and whose parents had signed a written informed consent form. Tissue samples taken during the surgical procedure were kept in -80° freezer until the study was performed. After homogenization, total RNA isolation was performed. After cDNA synthesis and cDNA control PCR, mRNA expression levels were determined with optimized primers by Real Time PCR method. SPSS 20.0 Version was used to compare the categorical features of expression and clinical and demographic data of volunteers, and  $2^{\Delta\Delta CT}$  method was used for the analysis of expression data.

**Results:** The NOTCH1 and NOTCH2 genes were found to have at least 2-fold upregulation of 66 and 12 fold change values compared to the control group of patients with FT in terms of mRNA expression level.

**Conclusion:** When the gene expression increase NOTCH1 and NOTCH2 genes were analyzed statistically, it was found that  $p=0.000006$  and  $p=0.000414$  showed significant difference.

**Keywords:** Tetralogy of Fallot, mRNA expression, Notch signaling pathway, NOTCH1, NOTCH2.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca eğitimime katkılarından ve gösterdikleri güler yüzünden dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca sonsuz bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında yardımcı olan, laboratuvar çalışmalarının tümünde yol gösteren ve her konuda benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Ender COŞKUNPINAR'a,

Değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen, tezimin neticelenmesi için sınırsız destek veren, gönüllülere ait örneklerin ve klinik verilerin toplanmasında ve değerlendirilmesinde katkı sağlayan değerli hocam, Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Kalp Cerrahi Sayın Prof. Dr. Ali Can HATEMİ'ye,

Tez çalışmam boyunca engin tecrübelerini ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a ve değerli hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üy Betül AKÇEŞME'ye,

Çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı olan, gösterdikleri anlayış ve destekten ötürü laboratuvar çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı tüm Tıbbi biyoloji bölüm arkadaşlarıma,

Beni daima destekleyen eşime ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından **2019/029** nolu proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 KONJENİTAL KALP HASTALIĞI.....	3
2.2.1 Konjenital Kalp Hastalığı Epidemiyolojisi.....	5
2.2 FALLOT TETRALOJİSİ.....	7
2.2.1 Fallot Tetralojisi Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi .....	7
2.2.2 Fallot Tetralojisi Patolojisi.....	9
2.2.3 Fallot Tetralojisi Tanı ve Tedavisi .....	10
2.2.4 Fallot Tetralojisi ile İlişkilendirilen Biyobelirteçler .....	11
2.3 NOTCH SİNYAL YOLAĞI .....	15
2.3.1 NOTCH Reseptörleri ve Ligandı .....	16
2.3.2 NOTCH Geni Yapısı ve İşlevi .....	18
2.3.3 NOTCH Sinyal Yolağının Fallot Tetralojisindeki Yeri ve Önemi .....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1 GEREÇ .....	24
3.1.1. Hasta Örneklerin Toplanması .....	24
3.2 YÖNTEMLER.....	24
3.2.1 Kit ile Dokudan RNA izolasyonu .....	24
3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm .....	26
3.2.3. Spektrofotometre ile RNA Kalite Kontrol ve Miktar Ölçümü .....	27
3.2.4. cDNA Eldesi ve Kontrol PZR. ....	27
3.2.5. Gerçek Zamanlı PZR (Real-Time PCR).....	30
3.2.6. qRT-PZR .....	31
3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi .....	32

<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>EK 1.....</b>	<b>57</b>
<b>EK 2.....</b>	<b>58</b>
<b>EK 3.....</b>	<b>60</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>61</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. KKH alt tiplerinin doğum prevalansı ve zaman içindeki değişimleri.....	5
Şekil 2.2. KKH alt tiplerinin Türkiye'nin coğrafi bölgeleri arasındaki dağılımı .....	6
Şekil 2.3. FT'nin risk faktörleri .....	7
Şekil 2.4. FT'nin klinik belirtileri .....	8
Şekil 2.5. FT kalp anatomisi .....	10
Şekil 2.6. Memeli NOTCH reseptörü ve ligand aileleri .....	17
Şekil 2.7. Kromozom 9 üzerindeki NOTCH1 geninin konumu.....	17
Şekil 2.8. Kromozom 1 üzerindeki NOTCH2 geninin konumu .....	18
Şekil 2.9. NOTCH hücre içi sinyalizasyon kaskadı .....	19
Şekil 3.1. RNA izolasyonu standart prosedürü .....	24
Şekil 3.2. Tek ve çoklu reaksiyonlarda cDNA sentezi standart prosedürü.....	28
Şekil 3.3. Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analiz görüntüsü.....	31
Şekil 4.1. $\beta$ - Aktin RT-PCR cDNA deneme sonuçları.....	36
Şekil 4.2. NOTCH1 RT-PCR sonuçları .....	37
Şekil 4.3. NOTCH2 RT-PCR sonuçları .....	38
Şekil 4.4. Hasta grubun kontrol grubuyla kıyasla kat değişim (fold change) değerleri .....	40
Şekil 4.5. Hasta grubun kontrol grubuyla kıyasla kat değişim (fold change) değerleri .....	41



## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. KKH sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2. Hasta gruplarının bölgeye göre korelasyonu. ....	6
Çizelge 2.3. FT’de yer alan genlerin özeti.....	13
Çizelge 2.4. NOTCH sinyal yolağı bileşenlerinde görülen mutasyonlarla ilişkili doğumsal kardiyovasküler hastalıklar .....	22
Çizelge 3.1. Kullanılan dokuların miktarı .....	26
Çizelge 3.2. Doku parçalanması ve homojenizasyon için tampon RLT hacmi .....	26
Çizelge 3.3. A260 / A280 oranına dayanan saflık değeri. ....	27
Çizelge 3.4. cDNA sentez bileşenleri 1.....	28
Çizelge 3.5. cDNA sentez bileşenleri 2.....	29
Çizelge 3.6. cDNA deneme RT-PZR bileşenleri .....	29
Çizelge 3.7. RT-PZR koşulları.....	30
Çizelge 3.8. qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler .....	31
Çizelge 3.9. $\beta$ -Aktin, NOTCH1, NOTCH2 genleri için RT-PCR protokolü.....	32
Çizelge 3.10. Veri tabanından alınan TPM değerleri ve birey sayıları .....	33
Çizelge 4.1. RNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları .....	35
Çizelge 4.2. Hastaların demografik bilgileri.....	38
Çizelge 4.3. RT-PCR sonucu elde edilen hasta Cp değerleri.....	39
Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grupların AVG.Cp, AVG. $\Delta$ Cp değerleri.....	39
Çizelge 4.5. Kontrol grubuyla kıyasla kat değişim (fold change) değerleri ve p-değeri .....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ASD</b>	: Atriyal Septal Defekt
<b>AS</b>	: Aort Stenoz
<b>AK</b>	: Aort Koarktasyonu
<b>AVSD</b>	: Atriyoventriküler Septal Defekt
<b>ACTB</b>	: Beta-Aktin Geni
<b>AVG</b>	: Ortalama
<b>BAK</b>	: Biküspid Aortik Kapak
<b>cDNA</b>	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
<b>Ct</b>	: Threshold Cycle
<b>Cp</b>	: Crossing Point
<b>DLL</b>	: Delta-Like geni
<b>DORV</b>	: Çift Çıkışlı Sağ Ventrikül
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotidtrifosfat
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>EKG</b>	: Elektrokardiyografi
<b>FT</b>	: Fallot Tetralojisi
<b>JAG</b>	: Jagged Geni
<b>KKH</b>	: Konjenital Kalp Hastalığı
<b>KSV</b>	: Kopya Sayısı Varyasyonları
<b>KAKH</b>	: Kalsifik Aort Kapak Hastalığı
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton

<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>PDA</b>	: Patent Duktus Arteriyozus
<b>PS</b>	: Pulmoner Stenoz
<b>qPCR</b>	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asid
<b>RT</b>	: Revers Transkriptaz
<b>RT-PZR</b>	: Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>T-ALL</b>	: T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>UV</b>	: Ultraviyole Işık
<b>VSD</b>	: Ventriküler Septal Defekt
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital Kalp Hastalığı (KKH) kalpte meydana gelen, doğumda veya sonradan tanısı konulabilen yapısal ve işlevsel anomalilerdir. Tüm KKH'ler siyanozun bulunup bulunmamasına göre siyanotik ve asiyanotik KKH şeklinde iki tipe ayrılır (1, 2, 3). Bunlardan Fallot Tetralojisi (FT) en sık görülen siyanotik KKH türüdür. FT, tüm konjenital anomalilerin %7-10'unu oluşturmaktadır ve yaklaşık her 3600 canlı doğumda bir görülmektedir (4). Konjenital kalp defektleri bebek ölümlerinin en büyük nedenidir. Bu sebeple bebeklerde, çocuklarda erken tanı ve erken tedavi, KKH'ye bağlı bebek doğum ve ölüm oranının azaltılması açısından oldukça önemlidir. FT patolojisinin, hem genetik hem de genetik olmayan çevresel faktörlerden kaynaklandığı literatür bilgilerine dayanarak multifaktöriyel bir hastalık olduğu bilinmektedir. FT'nin etiyojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte non-sendromik vakaların çoğu sporadiktir. FT'li hastaların en az %50-60'ında nedensel genetik etkiler bilinmemekle birlikte her sene artan çalışmalarla %10'luk kısmında *de novo* kopya sayısı değişiklikleri bulunmaktadır (5). NOTCH sinyal yolağı evrim süresince korunmuş, dokunun gelişimi ve farklılaşma sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynayan hücre etkileşim mekanizmalarından biridir. NOTCH sinyal yolağı organ oluşumunu ve morfogenezi etkileyerek hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozda düzenleyici rol oynar. İlk kez 1914 yılında *D. melanogaster*'da Morgan tarafından gözlemlenip tanımlanmıştır. NOTCH, komşu hücrelerdeki reseptörler ve ligandlar arasında iletişim kurarak hücrelerin farklılaşmasında rol oynayan tek geçişli transmembran proteindir. Memelilerde NOTCH sinyal yolağının NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4 olan dört NOTCH reseptörü ve JAG1 (jagged), JAG2, DLL1 (delta-like), DLL3, DLL4 olan beş ligandı vardır. NOTCH ligandı ve reseptörlerinde meydana gelen mutasyonların birçoğunun konjenital ve edinilmiş insan hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir. NOTCH sinyalleşmesi memeli kardiyogenez sırasında atriyoventriküler kanal, aort kapağı, ventriküler çıkış yolunun gelişiminde yer alır. NOTCH sinyal yolağı bileşenlerinde görülen mutasyonlar yüksek oranda KKH'nin çeşitli formlarında görülmektedir. Omurgalılarda yapılan fonksiyonel çalışmalar, NOTCH'ın kardiyovasküler gelişim için gerekli olduğunu ve bunun insanlardaki önemini, çeşitli NOTCH sinyal elemanlarındaki mutasyonların konjenital kardiyovasküler hastalığa neden olduğu gerekçesiyle göstermektedir. Tüm bu bilgilere rağmen, NOTCH'ın gelişen kardiyovasküler sistemde düzenlediği moleküler mekanizmalar ve hücresel süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır (6). Çalışmamızda FT tanısı almış

hastaların NOTCH sinyal yolağı ile ilişkisini belirlemek amacıyla bu yolda yer alan, hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen aday genlerin ekspresyon seviyelerinin tespit edilerek, hem FT patofizyolojisi hem de prognoza yönelik moleküler mekanizmaların ortaya konması amaçlanmıştır. NOTCH sinyal yolağında yer alan genlerin kalbin gelişiminde ve farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu yolda yer alan genlerin ekspresyon farklılığının FT patofizyolojisi ile ilgili olabileceği hipotezi ile kurguladığımız bu projede NOTCH1 ve NOTCH2 genlerindeki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi ile tedavi ve prognoza yönelik protokollerin oluşturulması mümkün olabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 KONJENİTAL KALP HASTALIĞI

Konjenital Kalp Hastalığı (KKH) doğumda veya sonradan tanımlanabilen, kalpte veya kan damarlarında meydana gelen yapısal, işlevsel ya da metabolik bozuklukları olan pediatrik yaş grubunda sıkça karşılaşılan anomalilerdir. Bu yapısal bozukluk, konjenital kalp malformasyonu veya konjenital kalp defekti olarak tanımlanabilir. KKH, tüm dünyada en sık gözlemlenen anomaliler olup tüm konjenital anomalilerin %28'ini oluşturmaktadır. KKH'nin sıklığı canlı doğumda yaklaşık %0.5-0.8 civarında olup, ölü doğumda yaklaşık %3-4, spontan düşüklerde %10-25 oranına sahiptir (7). Konjenital kalp defekti, bebek mortalitesinin en sık karşılaşılan nedenidir. Bu sebeple çocuklarda erken tanı ve tedavi, KKH'ye bağlı morbidite ve mortalite oranının azaltılması açısından oldukça önemlidir. KKH ile doğan bebeklerin %40-50'sinde ilk haftada, %50-60'ında ise ilk ayda tanı konulabilmektedir. Doğan bebeklerin yarısı ilk bir yıl içinde mortaliteyle sonuçlanmaktadır. KKH insidansının yaklaşık %20'si genetik sendromlarla ilişkilidir. Hastalığın %80'inin genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklandığı literatürlere dayanarak multifaktöriyel bir hastalık olduğu bilinmektedir (1, 8, 9). KKH, siyanotik ve asiyanotik olmak üzere iki geniş kategoride sınıflandırılmaktadır (**Çizelge 2.1**)

**Asiyanotik KKH:** Obstrüktif KKH genellikle daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde görülür, ancak yenidoğanda görülmesi hem pulmoner hem de aort kapak darlığı için kritiktir. Ventriküler giriş yollarında, çıkış yollarında ve büyük damarlarda tıkanma olabilir ve proksimal kalp odacığının stenoz distalinde dilatasyonla birlikte hipertrofiye neden olabilir. Asiyanotik doğumsal kalp lezyonları ventriküler septal defekt, atriyal septal defekt, patent duktus arteriyozus olan sol-sağ şanlı lezyonlar ve aort stenozu, aort koarktasyonu ve pulmoner stenoz gibi basınç yüküne sebep olan obstrüktif lezyonlar şeklinde 2 gruba ayrılmaktadır.

**Siyanotik KKH:** Siyanotik kalp hastalarında kanın, akciğerlerde yeterince oksijenlenemediği direkt olarak sistemik arteriyel dolaşıma karışması sonucunda siyanoz oluşur. Bu hastalıklarda fallot tetralojisi, triküspid atrezisi, pulmoner atrezi, pulmoner stenoz ve ventrikül septum defekti ile birlikte olan büyük arter transpozisyonunda pulmoner kan akımı azalırken büyük arter transpozisyonu, trunkus arteriyozus, tek ventrikül, total pulmoner venöz dönüş anomalisinde artmış pulmoner kan akımı görülebilmektedir (1, 9).

**Çizelge 2.1.** KKH sınıflandırılması (1, 3, 10, 11)

<b>Siyanotik KKH</b>	<b>Asiyanotik KKH</b>
<b>Pulmoner kan akımı azalmış</b> Fallot tetralojisi (FT) Triküspit atrezisi (TA) Pulmoner darlık ve VSD ile olan büyük atrerlerin transpozisyonu (PVSD) Pulmoner atrezi (PA)	<b>Sol-sağ şanlı</b> Atriyal septal defekt (ASD) Ventriküler septal defekt (VSD) Patent duktus arteriyozus (PDA)
<b>Pulmoner kan akımı artmış</b> Büyük arterlerin transpozisyonu (BAT) Tek ventrikül Trunkus arteriyozus Total pulmoner venöz dönüş anomali (TPVD)	<b>Obstrüktif lezyonlar</b> Aort stenozu (AS) Aort koarktasyonu (AK) Pulmoner stenoz (PS)

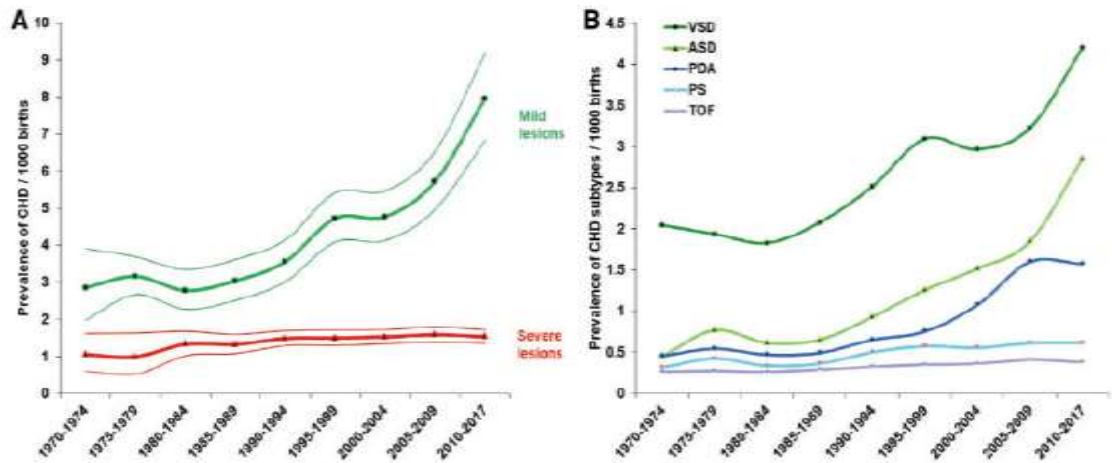
KKH, doğum kusurlarından kaynaklanan en önemli ölüm sebepleri arasındadır. Cerrahi onarımdan sonra hastalar kardiyak aritmi, kalp yetmezliği, nörogelişimsel eksiklikler ve diğer konjenital anomalikler açısından risk altındadır. Anöploidiler ve kopya sayısı varyasyonları (KSV), KKH'lerin yaklaşık %23'ünü oluşturur. Nadir mendel genetiğine uyan KKH formlarına neden olan genler tanımlanırken sporadik KKH'nin büyük çoğunluğuna neden olan genler bilinmemektedir (12).

İnsan ve fare üzerinde yapılan genetik çalışmaların etkisinin kalıtsal değişikliklerdeki rolü büyüktür. Nadir görülen çok kuşaklı KKH taşıyan ailelerin analizinde, kardiyak transkripsiyon faktörlerinde, sinyal moleküllerinde ve yapısal bileşenlerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. Kalıtsal heterozigot varyantları, sendromik ve non-sendromik KKH için farklı genetik yapılar sunmuştur. Bugüne kadar resesif kalıtımın rolü ve dominant kalıtım yoluyla faaliyet gösteren yeni genlerin rolleri sistematik olarak çalışılmamıştır. Çok sayıda ve etkili mutasyonların keşfi için geniş kohortlu çalışmalar, kapsamlı genomik veriler ve sağlam istatistiksel analizler gerekmektedir (12).

Geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca, kalp gelişimini düzenleyen moleküler yollar daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Gen hedefleme teknolojisinin gelişimi, gelişimsel kalp defekti oluşturulan birçok fare modelinin üretilmesine neden olmuştur. Bu çalışmalar normal kalp morfogenezi için kritik olan sayısız transkripsiyonel düzenleyicinin, sinyal molekülünün ve yapısal genlerin tanımlanmasına yol açmıştır. Bunun sonucunda moleküler sinyal yollarında yer alan birçok gen tanımlanmıştır. Kardiyak gelişimin moleküler mekanizmaları hakkındaki bu araştırmalar, KKH'nin genetik etiyolojilerinin tanımlanmasına katkı sağlamış ve birçok genin insan KKH'de etiyolojik rolleri olabileceğine dair kanıtlar getirmiştir (13).

## 2.1.1 Konjenital Kalp Hastalığı Epidemiyolojisi

Yingjuan Liu ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, 1970-2017 yıllar arasındaki konjenital kalp defektlerinin dünya çapındaki doğum prevalansını belirlemek amacıyla güncellenmiş sistematik derleme ve 260 çalışmanın meta-analizini kullanmışlardır. Çalışma analizlerine toplam 130 758 851 canlı doğumdan 1 161 030 KKH vakası dahil edildi. Çalışma sonucuna göre 1970-2017 yıllar arasında, KKH prevalansı her 5 yılda bir yaklaşık %10 artarken, bu oranın %90'ından fazlası daha hafif lezyonların (VSD, ASD ve PDA) saptanmasından dolayı olmaktadır. Buna karşılık, sol ventrikül çıkış yolu tıkanıklığı (hipoplastik sol kalp sendromu içeren) olarak gruplandırılmış lezyonların prevalansı 1995–1999 seneleri arasında 0.689/1000'den 0.475/1000'e düşmüştür (**Şekil 2.1**). Coğrafi bölgeler arasındaki belirgin farklılık Afrika'da en düşük prevalansı (2.315/1000) ve Asya'da en yüksek (9.342/1000) prevalansı göstermektedir (14).



**Şekil 2.1.** KKH alt tiplerinin doğum prevalansı ve zaman içindeki değişimleri.

(A) 1970-2017 döneminde hafif ve şiddetli KKH lezyonlarının prevalansı. Kalın çizgiler KKH lezyonlarının tahmini prevalansıdır, ince çizgiler %95 güven aralığını temsil eder. (B) 1970-2017 yılları arasında en sık görülen beş KKH alt tipinin doğum prevalansı. PS, pulmoner darlık (14).

Serdar K ve ark. yaptıkları “KKH'nın Türkiye'deki Dağılımı” adlı çalışmada 1997-2007 seneleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Ana Bilim Dalına kayıt yaptıran ve incelenen 1300 olgunun Türkiye'deki bölgesel dağılımını ve epidemiyolojisini belirlemeyi amaçlamıştır. Hastalar 2 gruba ayrılmıştır. Grup1 ASD (atriyal septal defekt), VSD (ventriküler septal defekt), PDA (patent duktus arteriyozus), AS (aort stenoz), PS (pulmoner stenoz) ve AK (aort koarktasyonu) olan basit doğuştan kalp hastalığı grubunu içermektedir. Grup 2 ise AVSD (atriyoventriküler septal defect), FT (fallot tetralojisi), DORV (çift çıkışlı sağ ventrikül) ve triküspid atrezisi, trunkus arteriyozus,



pulmoner atrezi, ebstein malformasyonu, tek ventrikül ve büyük arterlerin transpozisyonu olan kompleks kalp defektlerini içermektedir. Yaş grupları; yenidoğan (0-28 gün), bebekler (1 ay ile 2 yıl), okul öncesi çocuklar (2-5 yıl), okul çocukları (5-12 yıl) ve ergenler (>12 yıl) olarak kabul edilmiştir. Kız/Erkek çocuk oranı 0.9/1'dir. Grup 1'de 717, grup 2'de ise 583 hasta vardır. Yaş ve cinsiyet dağılımının gruplar ve bölgeler arasında anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir. Sonuçlar VSD'nin (%22.2) en sık görülen KKH olduğunu göstermiştir. En büyük hasta popülasyonu 4. bölge (% 57.7) olan Orta Anadolu'dan gelmiştir. Grup 2'deki hastalar en çok 3, 6 ve 7. bölgeler olan Akdeniz, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2.2) (Çizelge 2.2). Grup 1 ve 2 arasındaki önemli farkın 3, 6 ve 7.ci bölgede olması bu bölgelerin Orta Doğu'ya yakın olması ve sonuç olarak bu bölgedeki güneş enerjisi aktivitesi ile ilgili olabileceği vurgulanmıştır. Bu bölgelerdeki kompleks KKH'nın görülme sıklığını Türkiye'de akraba evliliği sıklığının yüksek olmasına bağlamışlardır. Ulusal bir çalışmada akraba evliliği sıklığının 6. ve 7. bölgelerde %40 olduğu bildirilmiştir (15).



**Şekil 2.2.** KKH alt tiplerinin Türkiye'nin coğrafi bölgeleri arasındaki dağılımı. Bölge 1: Marmara, Bölge 2: Ege, Bölge 3: Akdeniz, Bölge 4: Orta Anadolu, Bölge 5: Karadeniz, Bölge 6: Doğu Anadolu, Bölge 7: Güneydoğu Anadolu (15).

**Çizelge 2.2.** Hasta gruplarının bölgeye göre korelasyonu  
\*: gruplar arası önemli fark var (15).

Bölge	Grup1	Grup2	Toplam n(%)	P
1	16	16	32	Fark yok
2	23	14	37	Fark yok
3	58	70	128	0.03*
4	448	302	750	Fark yok
5	63	52	115	Fark yok
6	25	36	61	0.006*
7	84	93	177	0.003*

## 2.2 FALLOT TETRALOJİSİ

Fallot tetralojisinin (FT) anatomisi ilk olarak 1671’de ektopia kordisi olan bir fetüste Danimarkalı anatomist ve doğa uzmanı Niels Stensen tarafından tanımlanmıştır. Sonrasında 1777’de Edward Sandifort, 1784’de William Hunter, 1814’de Farre ve 1846’da Thomas Peacock da dahil olmak üzere başka araştırmacılar da benzer anatomiyi tanımlamışlardır. 1888’de, Etienne-Louis Arthur Fallot, Marsilya Tıp Dergisi’nde FT anatomisi ve kusurlarına neden olan patolojik süreci açıklayan bir dizi rapor yayınlamıştır. Fetal gelişim sırasında dört anatomik özelliğin rastgele olmayan birleşimini açıklayan bir patolojik süreç olduğunu öne sürmüştür. Fallot, “Fallot tetralojisi” terimini kullanmamıştır, la maladie bleue (mavi malady) veya siyanoz kardiyak (kardiyak siyanoz) olarak adlandırmıştır. “Fallot tetralojisi” olarak adlandırılan isim, ilk kez 1924 yılında pediatrik kardiyoloji ve patolojide öncü olan Kanadalı Maude Abbott tarafından tanımlanmıştır (16, 17).

### 2.2.1 Fallot Tetralojisi Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

FT, tüm KKH’ların %7-10’unu oluşturmaktadır ve yaklaşık her 3600 canlı doğumda bir görülmektedir (18, 19, 20). FT, erkek ve kız çocuklarda, tüm ırklarda ve etnik gruplarda eşit olarak bulunmaktadır. FT’nin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. FT’nin risk faktörleri ve klinik belirtileri aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.3, Şekil 2.4).



Şekil 2.3. FT'nin risk faktörleri (21)



Şekil 2.4. FT'nin klinik belirtileri (22).

Klinik belirtilerinde hipoksinin neden olduğu oksidatif DNA hasarının FT'li çocuklardaki rolü bilinmemektedir (22). FT, multifaktöryel bir hastalıktır. Bazı anatomik ve klinik değişikliklerin genetik bir temeli olduğunu öne süren kanıtlar vardır. FT'nin etiyojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte çoğu vaka sporadiktir. FT'li hastaların yaklaşık %25'inde kromozomal anomaliler, %10-20'sinde tek gen mutasyonları tanımlanmışken, FT'li hastaların en az %50-60'ında nedensel genetik etkiler bilinmemektedir. Her sene artan çalışmalarla %10'luk kısmında *de novo* kopya sayısı değişiklikleri bulunmaktadır. Fallot tetralojisi literatürünün çoğu sendromik ve non-sendromik olmak üzere iki hasta popülasyonunu oluşturmaktadır. Sendromik hastalar FT popülasyonunun yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Literatürde FT ile ilişkilendirilmiş bazı sendromlar mevcuttur. Bunlar 22q11 delesyon sendromu (DiGeorge sendromu), Alagille sendromu, Trizomi 13, Trizomi 21 ve Holt-Oram sendromudur (23, 24). Bunlardan %7'sini oluşturan trizomi 21 (İnsandaki Online Mendel Kalıtım [OMIM] 1 190685) ve %10-15'ini oluşturan 22q11.2 (OMIM 188400, 192430 ve 611867) mikrodelsyonları en sık rastlananlardır. Kromozom 22q11.2 mikrodelsyonları; FT'li hastaların yaklaşık %20'sinde pulmoner stenozda ve %40'ında pulmoner atrezide görülmektedir (24, 25). FT, fenotipik olarak iyi tanımlanmıştır ancak non-sendromik vakaların %80'iyle ilişkili genetik faktörler çoğunlukla bilinmemektedir. FT'li çocukların %85-%90'ı cerrahi onarımla en az 30 yaşına kadar hayatta kalırken, 40 yaşından sonra sağkalım sadece %25'tir. Çünkü 5 cerrahi onarım sonrası ortaya çıkan skar dokusu ve pulmoner yetersizlik erişkinlikte önemli morbiditeye neden olmaktadır (26). FT'li bebek ölümlerinin alta yatan nedenlerini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle mortalite üzerindeki çevresel ve sosyoekonomik etkileri araştıran çok az araştırma

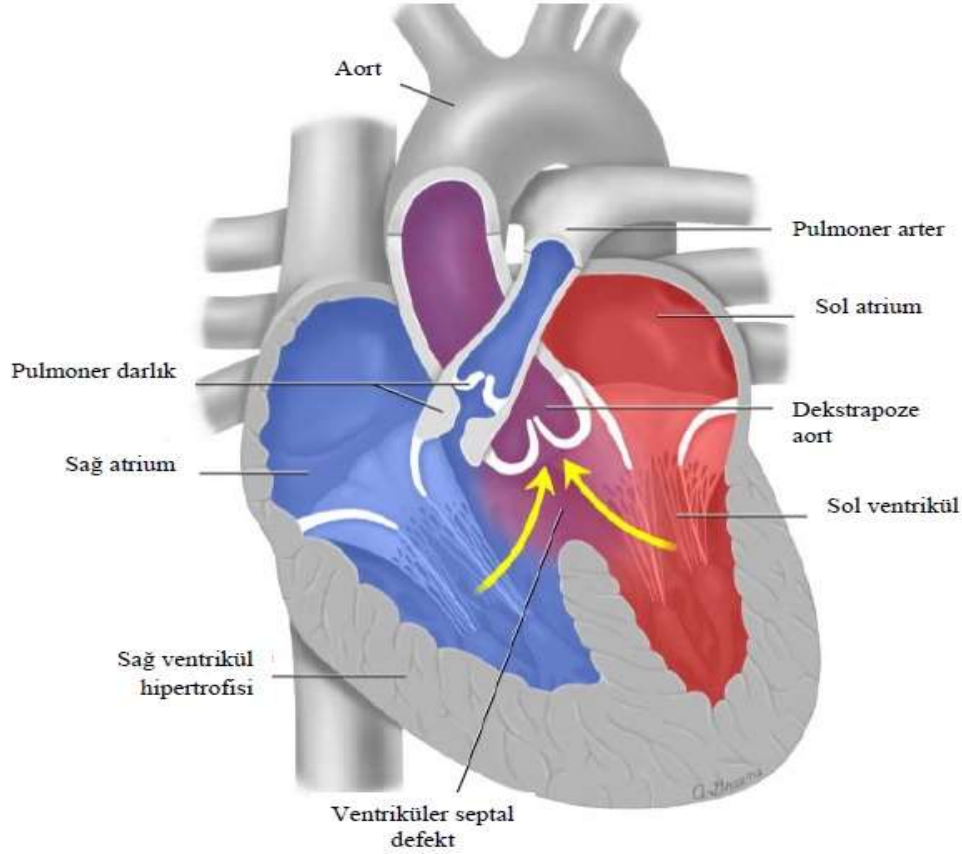
vardır. KKH'da düşük doğum kilosu, prematürite, ırk, defektin ciddiyeti, tanı koyma zamanlaması ve spesifik organ sistemlerinin varolan malformasyonlarının tümü sağkalımı olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak FT'ye özgü risk faktörleri değerlendirmek için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. FT ilişkili malformasyonların, kromozomal anomaliklerin ve demografik değişkenlerin farklılığını anlamak, çocukluk dönemindeki riski değerlendirmek ve sonuçları optimize etmek için hayati öneme sahiptir (25). Yenidoğan döneminde FT'li çocukların oksijen yetersizliği, zatürre, konjestif kalp yetmezliği ve erken mortalitesi yüksek diğer komplikasyonları gösterebildiği bilinmektedir. Çocuklarda FT tedavisine rağmen kötü prognoz nedeniyle hala bazı komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. FT, aile ve toplum sağlığına ve sağlık yönünden ekonomiye ağır yük getirmektedir. Bu nedenle FT etiyojisinin araştırılması prenatal tanı, danışmanlık ve prognostik değerlendirmede olası patogenezi ve risk faktörlerinin önemi büyüktür.

### **2.2.2 Fallot Tetralojisi Patolojisi**

KKH'ler siyanozun bulunup bulunmamasına göre asiyanotik ve siyanotik KKH olarak ikiye ayrılmaktadır (2). Fallot tetralojisi en sık görülen siyanotik KKH türüdür. Oksijenden fakir kanın kalpten dolaşıma katılmasıyla, cildin siyanotik (mavimsi) renk değiştirmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla "Mavi Bebek Sendromu" olarak da bilinmektedir. Fallot tetralojisi ilk kez 1671'de Stensen tarafından tanımlanmış olup 1888'de Dr. Etienne-Louis Arthur Fallot hastalığın tüm anomaliklerini belirlemiştir. FT, dört anatomik özelliğe sahip ilk tanımlanan KKH'dan biridir (27). Bunlar:

1. Sağ ventrikül çıkış yolu darlığı (RVOTO): Kalbin sağ ventrikülü ile akciğerler arasındaki bağlantı daralmış ve akciğerlere kan akışı azalmıştır. Ana daralma bölgesi, bu bölgedeki kalın kasın neden olduğu pulmoner kapak altındadır. Kapak ayrıca dar olabilir (stenotik) ve pulmoner arter de küçük olabilmektedir (hipoplastik).
2. Ventriküler septal defekt (VSD): Duvarında kalbin sağ ve sol ventriküllerinin (pompalama odaları) arasında bir delik (septum) vardır. Bu delik, sağ ventriküldeki deoksijenlenmiş kanın sol ventriküle akmasına izin verir. Oksijenden fakir kan akciğerde yeterince oksijenlendirilmeden aort yoluyla vücuda gönderilmektedir.
3. Dextrapoze aort: Kalpten vücuda giden ana aort kan damarı normalden daha sağa yerleşmiştir ve ventriküler septal defektin üzerinde oturmaktadır. Bu, aortun sağ ventrikülden oksijenden fakir kanı ve sol ventrikülden oksijenden zengin kanı almasına neden olur.

4. Sağ ventrikül hipertrofisi: Sağ ventrikül çıkış yolu tıkanıklığı ve daha sert pompalama ihtiyacı nedeniyle sağ ventrikül normalden daha kaslı ve kalınlaşmıştır (28) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. FT kalp anatomisi (29)

### 2.2.3 Fallot Tetralojisi Tanı ve Tedavisi

FT, pek çok karmaşık doğumsal kalp hastalığına benzer şekilde fetal yaşamda sıklıkla teşhis edilebilmektedir. FT'li birçok yenidoğan, normalden daha düşük oksijen seviyelerine sahiptir veya gözle görülür derecede mavi dudaklara veya tırnaklara (siyanoz) sahip olabilmektedir. Günümüzde yenidoğanların hastaneden ayrılmadan önce kalp sağlığı açısından taranması, önerilen bir nabız oksimetresi adı verilen makine tarafından oksijen seviyesi ölçülmektedir. Steteskopla bir kalp hırıltısı (kan akışından kaynaklanan anormal kalp sesleri) duyulabilmektedir. Tanı, kalbin ayrıntılı görüntülerini veren bir ultrason olan ekokardiyogramla doğrulanmaktadır. Bugün birçok bebeğe doğumdan önce hamilelik sırasında ultrason ile kalp defekti tanısı konmaktadır. FT semptomları, akciğere giden kan akışı engellenmesinin şiddetine bağlı olarak değişir. Bazı bebekler ciddi tıkanıklık nedeniyle

doğumdan kısa bir süre sonra mavi görünürken, daha az tıkanıklığı olan diğer bebekler normal pembe renktedir. Tıkanma genellikle zamanla daha da kötüleşmektedir, bu nedenle mavi dudakların görünmesi ilk olarak birkaç aylıkken ortaya çıkabilmektedir. Hafif tıkanıklığı olan bazı bebekler mavi görünmeyebilir ve akciğerlere çok fazla kan akışının gitmesi (hızlı nefes alma, zayıf beslenme ve yavaş kilo alma) belirtileriyle sadece ventriküler septal defekti olan bir bebek gibi gözükülebilmektedir (28). Ciddi derecede tıkalı pulmoner kan dolaşımı olan bebekler için, fetal tanı perinatal tedavinin daha iyi planlanmasını sağlar ve böylece erken yenidoğan döneminde hayatı tehdit eden siyanozu önler. Deneyimli bir çocuk doktoru veya kardiyoloji uzmanı genellikle klinik olarak tanıdan şüphelensedeyse, transtorasik kesitsel ekokardiyografi, intrakardiyak anatomisinin kapsamlı bir tanımını sunabilmektedir (27).

Sonuç olarak FT semptomları, akciğere giden kan akışını engellenmesinin şiddetine bağlı olarak yenidoğan döneminde şiddetli tıkanmanın olmasından dolayı görülen belirgin siyanozun olması, 2-4 ay arası bebeklerde beslenmeden dolayı bir bağırsak hareketinden sonra veya uyandıktan sonra bebek bacaklarını tekmelemesiyle bilinen tet nöbeti, oksijen saturasyonunun (SpO<sub>2</sub>) %90'dan az olması, beslenme ile yorgun bebek ve zayıf kilo alımı gibi klinik değerlendirmelerden sonra yapılan akciğer grafisi, EKG ve ekokardiyogram olan üç önemli test sonucunda kesin tanısı konulabilmektedir (21).

FT, uzun yıllardır başarılı bir şekilde ameliyatı gerçekleştirilen konjenital patolojilerinden biridir. 31 Ağustos 1954'te Walton C. Lillehei, siyanotik konjenital kalp hastalığının en yaygın nedeni olan FT'nin ilk operasyonel onarımını denemiştir. O zamandan beri etkin mortalite oranı önemli ölçüde azalmıştır ve günümüzde genellikle bebeklik döneminde veya erken çocuklukta cerrahi onarım yapılmaktadır (30). FT'li bebeklerin çoğu 3-6 aylıkken cerrahi onarım geçirmektedir. Bebekler genellikle yaklaşık bir hafta hastanede kalmakta ve 4 ila 6 hafta arasında tamamen iyileşmektedir. Cerrahi sonuçlar %2'den az cerrahi mortalite ve uzun dönem sağkalım ile karakterizedir. Ameliyattan sonra bebekler birkaç gün boyunca yoğun bakım ünitesinde, nefes almaları için ventilatöre bağlıdır ve ameliyattan sonra kalbin iyileşmesine yardımcı olacak ilaçlar almaktadırlar (27, 28).

#### **2.2.4 Fallot Tetralojisi ile İlişkilendirilen Biyobelirteçler**

Kalp gelişimi, kesin bir düzenleme mekanizması oluşturmak üzere farklı alanlarda ve farklı zamanlarda eksprese edilip etkileşime giren birçok gen ile ilişkilidir. Bu genlerin herhangi birinde meydana gelen anormal ekspresyonun kalp gelişimini etkilemesi muhtemeldir (18). Boon ve ark. 1972'de FT kalıtım oranının yaklaşık %54 olduğu ve bir kardeşin FT'li olması durumunda, ikinci bir kardeşine geçirme riskinin %1 olduğu sonucuna

varmışlardır. FT'li hastaların yaklaşık %15'i, 22q11 kromozomunda delesyona sahiptir. Konotrunkal kalp defektlerin (çift çıkışlı sağ ventrikül, fallot tetralojisi, büyük damar transpozisyonu ve ventriküler septal defekt), kromozom 22 üzerindeki spesifik bir lokusun hemizigotluk durumu, konjenital kalp defektlerinin olası bir etiyolojisi olarak tespit edilen klinik bulgulardan biridir. Kromozom 22 mikrolelesyonunun taranması günümüzde rutin olarak yenidoğanlarda ve konotrunkal defektli fetüslerde gerçekleştirilmektedir. Ek olarak, FT kromozomal anöploidisi ile de ilişkilidir ve FT'li hastaların yaklaşık %7'si trizomi 21 sendromu ile ilişkilidir. JAG1 geni, NOTCH sinyal yolağında yer alan bir ligandır. Hücre kaderinin belirlenmesinde çok önemli olduğu gösterilen hücre içi sinyal yolağının bir bileşeni olan yüksek derecede korunmuş bir hücre yüzey proteinini kodlar. Bu protein *D. Melanogaster*'de insan hücrelerinde olduğundan daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. JAG1 mRNA, gelişen memeli kalbinde yüksek düzeyde eksprese edilir ve farelerde JAG1'in hedefli olarak mutasyona uğraması anormal düzeyde kardiyovasküler gelişim ve embriyonik ölümle sonuçlanmaktadır (31).

FT'li hastaların yaklaşık %4'ünde NKX2.5 mutasyonu saptanmıştır. NKX2.5 geni, normal kalp gelişimi için gerekli olan bir kardiyak homeobox proteindir ve CSX genindeki (NKX2.5'i kodlayan) mutasyonlar, farklı konjenital kalp malformasyonlarına neden olmaktadır. Bazı araştırmacılar, çoklu tip 2 çinko-parmak protein (ZFPM2) geninde meydana gelen bir mutasyonun heterozigotluğu ve bu gendeki mutasyonların bazı sporadik FT vakalarına katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir. Pizzuti ve ark. ZFPM2 geninin kromozom 8q22 ile eşleştiğini keşfetmiştir. Bir çinko parmak kofaktörü olan ZFPM2, GATA bağlayıcı protein 4 (GATA-4) transkripsiyon faktörü N-terminal alanı ile etkileşime girer ve kalbin gelişimi sırasında transkripsiyonel aktivitesini hem in vitro hem de in vivo olarak modüle eder. Bir başka çalışmada FT'li 26 hastanın sadece ikisinde GATA-4'ün nokta mutasyonunu (G/C) göstermişlerdir. Ayrıca GATA-4 mutasyonları FT'den daha sık ASD'lerle (OMIM 607941) ilişkilendirilmiştir. Genlerdeki çoklu mutasyonlar olan NKX2.4, GATA-4 ve diğerleri, çevresel risk faktörleri ve/veya her ikisinin etkileşimi hastalığın patogenezinin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bazı kardiyak transkripsiyon faktörü genlerinde baskın mutasyonlar nedeniyle oluşan haplo-yetersizliğin FT'ye neden olabileceği bilinmektedir (19, 31, 32).

Greenway ve ark. FT'li 114 hasta ve ebeveynlerinde yaptıkları çalışmada kopya sayısı varyasyonlarını (KSV) tespit etmek için yüksek çözünürlüklü bir mikroarray yöntemi kullanmışlardır. Çalışma sonunda sporadik, non-sendromik FT vakalarının %10'unun *de novo* KSV'lerden kaynaklandığını gözlemlədiler. Sporadik FT riskindeki artışla ilişkili 7 yeni KSV

lokusu tanımlamışlardır. Bunlar daha önceki çalışmalarda KKH ile ilişkili olan 3 gen lokusunu içermektedir. Bunlar TBX1, NOTCH1, JAG1 lokusunu içeren mikrodelesyonlardı (33).

TBX1, kalbin erken gelişiminde kritik bir role sahiptir ve 22q11.2 mikrodelesyon sendromunun patogenezinde en önemli faktörlerden biri olarak çalışılmıştır. Fare çalışmaları NKX2.5, TBX1, TBX5 ve GATA4 gibi kardiyak transkripsiyon faktörü genlerin haplo-yetersizliğinin, FT ve diğer KKH'ler ile ilişkili olduğunu göstermiştir (**Çizelge 2.3**) (19).

FT ile ilişkili tek gen mutasyonları nadiren tanımlanmıştır. Son zamanlarda ekzom dizileme yöntemi kullanılan büyük kohortlu bir grup çalışmada, FT'li çocukların %2.3'ünde FLT4 fonksiyon kaybı mutasyonları tanımlanmıştır. Ekzom sekanslama çalışması ayrıca FT'li hasta grubunda başka bir FLT4 çerçeve kayma mutasyonu ortaya koymuştur. Sonuçlar, düzensiz VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) sinyal yolağının FT'nin genetik etiyojisine katkıda bulunduğu hipotezini desteklemektedir (34).

**Çizelge 2.3.** FT'de yer alan genlerin özeti (AD: otozomal dominant, SNP: tek nükleotid polimorfizmi, CNV: kopya sayısı varyasyonu, TF: transkripsiyon faktörü) (19).

GEN	MUTASYON	HÜCRESEL MEKANİZMASI
<i>GATA4</i> (Çinko Parmak TF)	AD: Ailesel ve sporadik mutasyonlar. Non-sendromik vakalarda rapor edilen SNP ve CNV.	Zayıf DNA bağlanması, <i>TBX5</i> ile zayıf etkileşim
<i>NKX2.5</i> (Homeobox TF)	Değişken penetrasyon ile homeodomain bölge dışındaki heterozigot mutasyonları	DNA'yı içeren modifiye intramoleküler etkileşimler
<i>JAG1</i> (NOTCH sinyal ligandına bağlı)	Haplo-yetersizliği Alagille sendromuyla sonuçlanır. Yanlış anlamlı mutasyonlar FT'a neden olmaktadır.	Post-translasyonel modifikasyonlar hücreyel yerleşimi etkiler
<i>TBX5</i> (T-Box TF)	Holt-Oram sendromunda fonksiyon kaybı meydana gelir. Fonksiyonel Nokta mutasyonlarının kazanılması FT ile sonuçlanır.	<i>NKX2.5</i> ile izole edilmiş etkileşim
<i>TBX1</i> (T-Box TF)	TBX1 ve 22q11.2 delesyonları, DiGeorge sendromu ile ilişkili. Sendromik ve non-sendromik FT ile ilişkili nokta mutasyonları	Non-sendromik nokta mutasyonları işlevselliğini korur ancak kararlılığını azaltır.





## 2.3 NOTCH SİNYAL YOLAĞI

NOTCH sinyal yolağı, dokuların gelişimi ve yenilenmesi sırasında birçok hücreyel işlevi olan hücre proliferasyonu, hücre kaderinin belirlenmesi, hücre farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde yer alan evrim süresince korunmuş hücre etkileşim mekanizmalarından biridir (35).

İlk kez 1914 yılında, Morgan tarafından *D. melanogaster*'de gözlemlenip tanımlanmıştır (36). Kanatlarının ucunda küçük çentikler bulunan sinekler tespit edilmiş ve vahşi tip sinekler ile çaprazlandığında yavruların fenotipinde çentikli kanat gözlemlenmiştir. Bu gözlem, kanat şeklinin genetik olarak düzenlendiğini ve bu kanat fenotipinden sorumlu olan genin "NOTCH" olarak adlandırıldığını göstermiştir. NOTCH mutasyonları ile *Drosophila* üzerinde yapılan ileri çalışmalar NOTCH lokus mutasyonlarının anormal embriyonik gelişimede yol açtığını ortaya koymuştur. 1983 yılında, NOTCH lokusunun bir kısmı *Drosophila*'da klonlanmış, gen ve protein yapısını anlama yolunu açmıştır (36). NOTCH geni *D. melanogaster*'da tanımlandıktan sonra canlıda organ gelişimi, hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır. NOTCH sinyal yolağının insan gelişimi ve hastalıklardaki rolü 1991'den sonra NOTCH1'deki mutasyonların T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) formu ile ilişkilendirildiği zaman tanınmıştır (6). 1995'te Weinmaster grubu, bir memelide (sıçan) NOTCH1'i aktive edebilen NOTCH yolağı ligandını klonlamıştır. Ligand, *Drosophila* serratina benzerliği nedeniyle JAG1 olarak adlandırılmıştır. İlk olarak kas hücre farklılaşmasını önlediği gösterilmiştir ve daha sonraki analizler bu bulguları diğer vücut dokularına taşımıştır (36).

NOTCH geni hücre kaderinin belirlenmesini, hücre farklılaşmasını ve modellenmesini düzenleyen evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolaktır. NOTCH ligand ve reseptörlerinde meydana gelen mutasyonların birçoğunun konjenital ve edinilmiş insan hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir. NOTCH aktivitesi, kalp gibi karmaşık yapıya sahip organlarda, çoklu parçaların düzenli olarak geliştirilmesini gerektirir. Omurgalılarda yapılan fonksiyonel çalışmalar, NOTCH'ın kardiyovasküler gelişim için gerekli olduğunu ve insanlarda bunun önemini çeşitli NOTCH sinyal elemanlarındaki mutasyonların konjenital kardiyovasküler hastalığına neden olduğu gerekçesiyle göstermektedir. Tüm bu bilgilere rağmen, NOTCH'ın gelişen kardiyovasküler sistemde düzenlediği moleküler mekanizmalar ve hücreyel süreçler aydınlatılmaya devam etmektedir (6).

Yumurtalık kanserinde, tümörlerin %19'unda NOTCH3 gen amplifikasyonunun olduğu ve yumurtalık seröz karsinomlarının yarısından daha fazlasında NOTCH3'ün aşırı

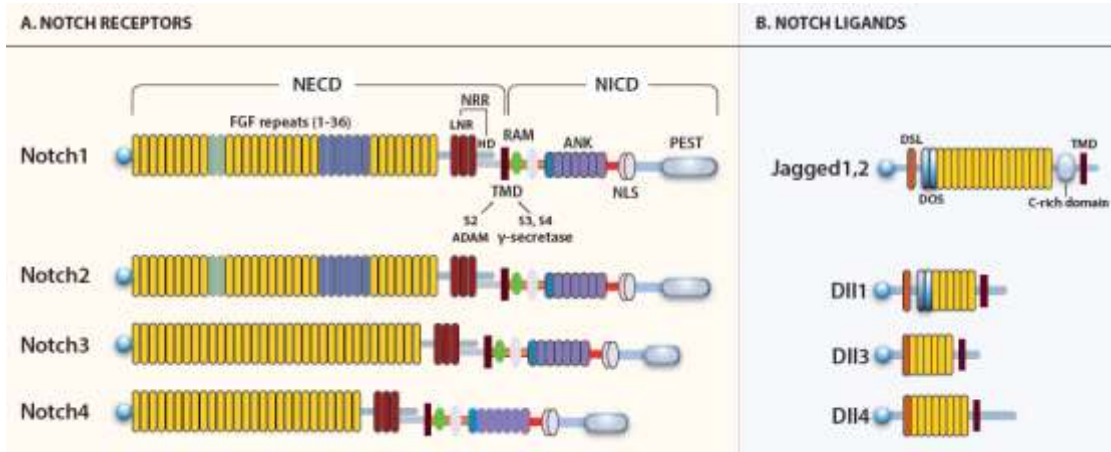
ekspresyonuna rastlandığı bulunmuştur. Benzer şekilde, NOTCH sinyal aktivasyonunun meme kanseri gelişiminde de rolü olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde, yapısal olarak aktif NOTCH4 ekspresyonu, farelerde meme tümörlerine neden olmuştur ve NOTCH1 aktive eden mutasyonlar, T-ALL'in (T hücreli akut lenfoblastik lösemi) gelişimine katkıda bulunmuştur. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada transgenik farelerde aktif NOTCH1 ve NOTCH3'ün aşırı ekspresyonunun meme bezi gelişimini bloke ettiğini ve fare meme tümörlerini indüklediğini göstermektedir (37).

1996 yılında, NOTCH3 mutasyonlarının 3. veya 4. on yılda başlayan inme ve demans ile karakterize bir hastalık olan CADASIL'a (serebral otozomal dominant arteriopati, subkortikal infarktlar ve lökoensefalopati) neden olduğu bulunmuştur. CADASIL, NOTCH3'ün hücre dışı alanındaki mutasyonlarından, epidermal büyüme faktörü benzeri (EGFR) tekrarlarla kazanım veya sistein kalıntılarının kaybedilmesinden kaynaklanmaktadır. CADASIL hastalarından yapılan dokunun patolojik çalışmaları, beyin lezyonlarında NOTCH3 protein birikimini ortaya çıkarmaktadır ancak hastalık için kesin bir mekanizma bilinmemektedir. NOTCH3'ün CADASIL'deki rolünün keşfedilmesinden bir yıl sonra çok sistemli gelişimsel bozukluk olan Alagille sendromunda JAG1 mutasyonu saptanmıştır ve bu durum, daha önce az gelişmiş organizmalarda gösterilmiştir. O tarihten sonra, NOTCH sinyalleriyle ilişkili diğer gelişimsel bozukluklar tanımlanmış ve NOTCH sinyal yolağı elemanlarının hastalık çalışmalarında yer alan sayısız organ sisteminin gelişimine nasıl katkıda bulunduğunu belirlemek için hayvan modelleri geliştirilmiştir. NOTCH1 mutasyonları, aort kapak darlığı, aort koarktasyonu ve hipoplastik sol kalp sendromu gibi ciddi sol ventrikül çıkış yolu anomalikleri bulunan kişilerde tanımlanmıştır. Sol ventrikül çıkış yolu anomalikleri ile ilişkilendirilen yanlış anlamli mutasyonlar üzerinde yapılan işlevsel çalışmalar, mutant reseptörün NOTCH ligandlarına bağlanmasının azaldığını ve ayrıca endoplazmik retikulumda lokalizasyonun artmasıyla birlikte yüzeydeki reseptör miktarının azaldığını göstermiştir (6).

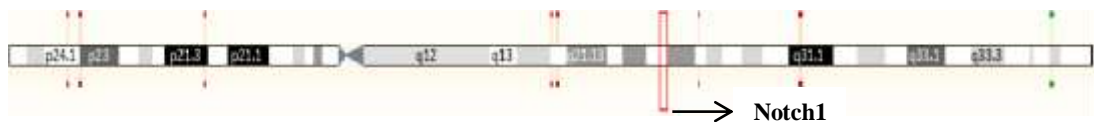
### **2.3.1 NOTCH Reseptörleri ve Ligandı**

NOTCH geni ilk olarak *D. melanogaster*'de karakterize edilen 300 kD'lik ve 2370 amino asit tarafından kodlanan tek geçişli transmembran proteindir. NOTCH sinyal yolağı üç bölümden oluşur: NOTCH reseptörü, NOTCH ligandı ve DNA bağlama dizisi CSL. Memelilerde, NOTCH reseptörün NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 ve NOTCH4 olmak üzere dört izoformu ve Delta benzeri ligandlar olan Dll1, Dll3, Dll4, Serrate benzeri ligandlar olan JAG1 ve JAG2 olan beş ligandı vardır. NOTCH reseptörü, NOTCH hücre içi bölge (NOTCH

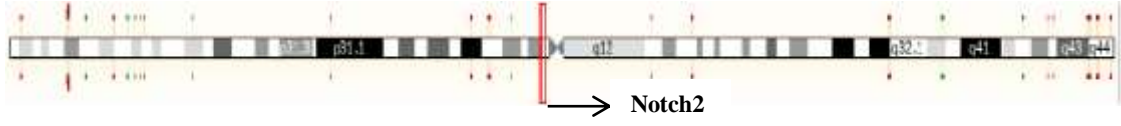
Intracellular Domain: NICD) ve hücre dışı bölge (Notch Extracellular Domain: NECD) olmak üzere iki kısımdan oluşur. NOTCH hücre dışı bölge 36 homolog epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tandem tekrarları ve üç sistein zengin Lin-12/NOTCH tekrarından (LNR) oluşur. EGF tekrarlarının sayısı farklı NOTCH reseptörlerinde farklılık gösterir ancak yapıları aynıdır. EGF benzeri tekrarlar ise NOTCH reseptörlerinin spesifik ligandlarla fiziksel olarak bağlanmasını sağlar. NICD ise altı ankirin benzeri tekrar (ANK), CSL-bağlayıcı domain RBP-Jk ilişkili molekül (RAM), iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), ardından reseptör yarı ömrünü düzenleyen bir işlem alanı (transaktivasyon domain (TAD)) ve sırasıyla prolin, glutamin, serin ve treonin kalıntıları içeren bir PEST dizisi içerir (38, 39, 40, 41). NOTCH reseptörleri, yapısında birçok benzerlik olmasına rağmen, hücre içi ve hücre dışı kısımlarında farklılıklar gösterir. EGF-benzeri tekrarların sayısı hücre dışı kısımda farklıdır. NOTCH1 ve NOTCH2 reseptörleri 36 EGF tekrarına sahipken, NOTCH3 ve NOTCH4 29 EGF benzeri tekrarlara sahiptir. Hücre içi kısımda, NOTCH1 güçlü TAD ve NOTCH2 zayıf bir TAD içerirken NOTCH3 ve NOTCH4'te TAD yoktur. JAG1, JAG2 ve Dll1 tip 1 hücre yüzey proteinleridir. Bunlar Delta /Serrate/LAG-2 (DSL), Delta ve OSM-11 benzeri proteinlerden (DOS) ve EGF tekrarlarından oluşur. Buna karşılık Dll3 ve Dll4 ligandları DOS alanlarını içermez. DOS ve DLL etki alanları, NOTCH reseptörüne bağlanmada önemlidir (**Şekil 2.6**) (39, 41).



**Şekil 2.6.** Memeli NOTCH reseptörü ve ligand aileleri (42).



**Şekil 2.7.** Kromozom 9 üzerindeki NOTCH1 geninin konumu (43)

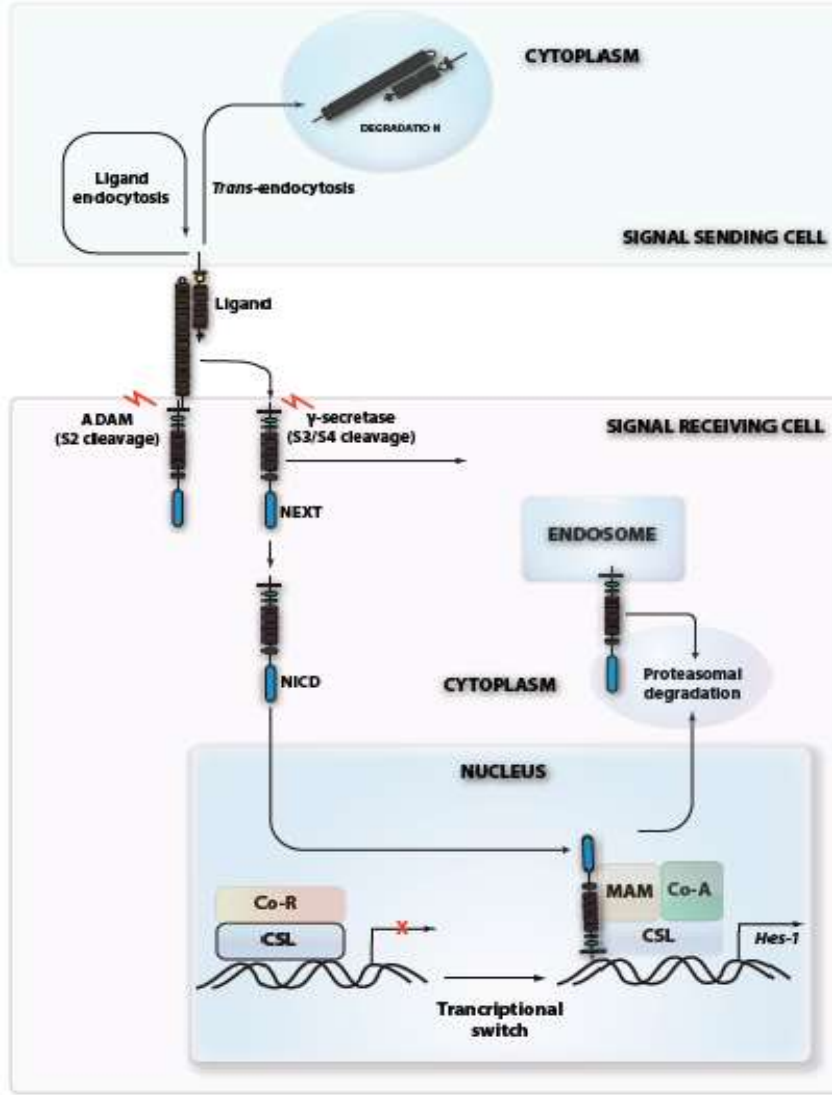


Şekil 2.8. Kromozom 1 üzerindeki NOTCH2 geninin konumu (44)

### 2.3.2 NOTCH Geni Yapısı ve İşlevi

NOTCH sinyali, NOTCH komşu hücrelerdeki reseptörler ve ligandlar arasındaki etkileşimler sonucunda hücre-hücre bağlantılarıyla aktive olur. NOTCH reseptörünün ligandı ile bağlanması NOTCH reseptöründe iki proteolitik bölünme olayını başlatır (Şekil 2.9). Hücrelerin birinde diğerine göre daha fazla ligand varsa o hücre sinyalcı rolünü üstlenir. Ligandın bağlanması, NOTCH hücre içi alanını (NICD) sitoplazmaya bırakarak NOTCH reseptörünün ilk proteolitik (S1'i) bölünmesini tetikler. S1 bölünmesi, NOTCH1 reseptörünün olgunlaşmasında önemli bir adımdır. Ligandın reseptörüne bağlanmasıyla ikinci bölünme olan 'S2 bölünme' gerçekleşir. Bunun sonucunda NOTCH hücre dışı bölgesi serbest kalır. İlk bölünme, ADAM (metaloпротеаз ailesi) tarafından katalize edilirken, ikinci bölünmeye presenilin, nicastrin, PEN2 ve APH1 içeren bir enzim kompleksi olan  $\gamma$ -sekretaz aracılık eder. Bu nedenle,  $\gamma$ -sekretaz kompleksinin inhibisyonu veya presenilin kaybı NOTCH yolağını etkisiz hale getirir. İkinci bölünme, DNA bağlayıcı protein RBPJ (immünoglobulin J-kappa bölgesi için rekombinasyon sinyal bağlama proteini), koaktifleştirici mastermindlike (MAML) ve diğer ortak aktivatörler (CoA) ile aktif bir transkripsiyonel kompleks oluşturduğu NOTCH hücre içi alanını (NICD) sitoplazma içerisine serbest bırakır. Transkripsiyonel olarak aktif olan NOTCH'ın hücre içi kısmı (NICD) zardan ayrılır ve böylece aktif NOTCH oluşur. Aktif NOTCH bir taşıyıcı protein aracılığıyla nükleusa geçer. NICD, doğrudan DNA'ya bağlanamaz ancak DNA bağlayıcı proteinlerle ve transkripsiyonel baskılayıcı CSL (RBP-Jk veya CBF1 / Su (H) / Lag-1 transkripsiyon faktörleri ailesi için rekombinasyon sinyali bağlama proteini), (insanlarda C promotörü bağlayıcı faktör L, *Caenorhabditis elegans*'ta LAG, ayrıca farelerde immünoglobulin kappa J (RBP-Jk) olarak da adlandırılır) ile kompleks oluşturur. Aktive edilmiş NICD-CSL kompleksi mastermindlike (MAML), p300 ve NOTCH hedef gen transkripsiyonlarına aracılık eden koaktivatörleri (ko-A) alır. RBPJ bağlama bölgesi içeren genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bu hedef genler, farklı hücrelerde diğer genlerin hareketlerini düzenleyen transkripsiyonel faktörler olarak çalışır. Bu nedenle NOTCH indüksiyonu, RBPJ'yi bir baskılayıcıdan bir aktivatöre dönüştüren transkripsiyonel bir anahtar görevi görür (45, 46). NICD nükleusta olmadığı durumda her yerde bulunan ortak

baskılayıcı (Co-R) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) CSL ile etkileşime girer ve NOTCH hedef genlerinin transkripsiyonunu bloke eder (39, 40). NOTCH sinyali uyarılmadığında, CSL proteini hedef genleri üzerindeki promotörlere bağlanır ve gen transkripsiyonunu engellemek için histon deasetilazlar ve yardımcı baskılayıcıları alır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. NOTCH hücre içi sinyalizasyon kaskadı (42).

### 2.3.3. NOTCH Sinyal Yolağının Fallot Tetralojisindeki Yeri ve Önemi

Nadir genetik varyantların, KKH riskine önemli katkıları olduğu bilinmektedir ancak bugüne kadar çok az sayıda FT vakası çalışılmıştır. Donna J. ve ark. yaptıkları çalışmada (2018) bildirilen en geniş ve sendromik olmayan 829 FT'li hasta kohortunda, FT'ye özgün ve zararlı varyantların prevalansını değerlendirmek amacı ile tüm ekzom dizileme metodunu

kullanmışlardır. Çalışmada NOTCH1'in en fazla özgün ve zararlı varyantları içerdiği bulunmuştur (26).

Yapılan bir çalışmada BAK (biküspid aortik kapak) ile ilişkili ailesel, non-sendromik, otozomal dominant kalsifik aort kapağı hastalığında (KAKH) NOTCH1 mutasyonları tanımlanmıştır. Bu çalışmada iki tip mutasyon saptanmıştır. Bir ailede, NOTCH1 hücre dışı alanında bir stop kodonu bulunurken, diğer bir ailede hücre dışı alanın karboksil ucunda 74 yanlış amino asitin eklenmesiyle bir çerçeve kayması mutasyonu bulunmaktadır. NOTCH1 haplo-yetersizliğinin KAKH'nin altta yatan mekanizması olduğu öne sürülmüştür (6).

NOTCH1'deki mutasyonların ayrıca NOTCH1'in gelişimsel aort kapak anomalikleri ve ciddi kapak kalsifikasyonunun bir spektrumuna neden olan aort kapak hastalığı dahil çeşitli hastalıklardan sorumlu olduğu bildirilmiştir (47).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada NOTCH1 haplo-yetersizliğinin, kalp kapak gelişimini ve osteojenik faktörleri etkileyen spesifik gen ağlarını değiştirdiğini ve bunun da aort kapak hastalığına yol açtığını göstermiştir. NOTCH1 haplo-yetersizliği, insan ve hayvan modellerinde Alagille sendromu ve aort kapak hastalığına neden olduğu bilinen NOTCH1 ligandı olan JAG1 ve DLL4'ün tanımlanması ile bilinmektedir (45).

Mutantlarda RNA'nın farklı ekspresyonu, ekspresyonu değiştirilmiş belirli dokularda veya hücre popülasyonlarında gelişimsel kusurlara neden olan doğrudan veya dolaylı hedeflere işaret etmektedir. Farelerde ve zebra balıklarında yapılan fonksiyonel çalışmalar, NOTCH'in tüm kalp gelişimi için önemli olduğunu göstermektedir. Kalp kapakçıkları, kalp odaları ve koronerleri NOTCH sinyal yolağına bağlıdır. Ekspresyon profili, kalp kapakçık gelişimi ve miyokardiyal kompaksiyonu sırasında NOTCH'in, epitelyal-mezenşim geçişi (EMT), hücre dışı matris (ECM) üretimi ve kalp odacıkların olgunlaşmasında yer alan çeşitli genleri ve yolakları düzenlediğini ortaya koymaktadır (48).

Yapılan bir çalışmada, FT'li sadece bir bireyde bulunan, hastalıkla ilişkili genleri kodlayan 6 *de novo* KSV'leri bulunmuştur. Bunlardan iki tanesi daha önceki çalışmalarda KKH ile ilişkili genler olan NOTCH1 ve JAG1 olarak tanımlanmıştır. NOTCH1 null (anlamsız) mutasyonları, öncelikle ailesel biküspid aort kapağına ve daha az sıklıkla diğer malformasyonlara neden olmuştur. Bulgular sporadik non-sendromik FT vakalarının en az %10'unun *de novo* KSV'lerden kaynaklandığını ve bu lokuslardaki mutasyonların diğer FT vakalarında etiyolojik olabileceğini öngörmektedir (33).

Ailesel vakalar ise, FT'li hastaların genetik mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Çalışmalar otozomal dominant kalıtım paterninin güçlü kanıtlarını sunmaktadır. Bu nedenle, kromozomal anomalikleri olmayan birçok hastanın sporadik

mutasyonları temsil ettiği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla farklı seviyelerde fenotipik penetrasyon ile birlikte taşıyıcı ebeveynlerde çoklu mutasyonlar tanımlanmıştır (23, 24).

Bir başka çalışmada, NOTCH2’de gözlemlenen mutasyonlar etkilenmiş iki ailede tanımlanmıştır. Hastalar çok çeşitli konjenital kalp defektlerine sahiptir ancak en yaygın defektler kalp çıkış yolunu etkilemektedir. Bunlar arasında pulmoner arter darlığı ve FT gibi sağ taraflı obstrüktif lezyonlar ve ventriküler septal defektler (VSD) bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre NOTCH2 ve JAG1 geninde görülen mutasyonlar pulmoner arter darlığı ve FT ile ilişkilendirilmiştir (**Çizelge 2.4**), (45).

Christoph Preuss ve ark. yaptıkları çalışmada NOTCH sinyal yolağı bileşenlerinde görülen mutasyonlar, yüksek oranda KKH’nın çeşitli formlarında da görülmektedir. Bu çalışmada 12 bağımsız ailede yapılan tüm ekzom dizileme yöntemi sonucu seçilen zararlı varyantlar büyük ölçüde NOTCH sinyal yolağı ekseninde boyunca genlerde kümelenmiştir. Çalışmanın devamında NOTCH1’deki yeni ve zararlı mutasyonları paylaşan üç ailede etkilenen aile bireylerinin ayrıntılı bir analizi yapılmıştır. Etkilenen aile bireylerinin fenotipik analizi, sendromik hastalığın olmadığını ve yüksek oranda kalp kapak anormalisi ve damar tıkanıklığı bulunduğunu ortaya koymuştur. İki bağımsız ailede iki yeni NOTCH1 anlamsız mutasyonu tanımlanmış olup bunların her ikisi de NOTCH proteininin hücre dışı alanında bulunmuştur. NOTCH1, valvüler defektler ve FT gibi ciddi kardiyak malformasyonlarla ilişkili olan Adams-Oliver sendromu (OMIM 100300, OMIM 616028) ile ilişkili bulunmuştur. FT öyküsü olan aile bireylerinde yapılan hedef yeni nesil dizileme yöntemi sonucunda bu hastalarda NOTCH1 geninde yeni anlamsız mutasyonlar saptanmıştır (49).

Wilhelmina S ve ark. yaptıkları çalışmada, sol taraflı konjenital kalp hastalığında NOTCH1 mutasyonlarının prevalansını ve fenotipik spektrumunu belirlemeyi amaçlamışlardır. NOTCH1, 428 sendromik olmayan probanddaki mutasyonlar için taranmıştır ve tüm hastalardan aile öyküleri alınmıştır. Çalışmanın sonunda patojenik NOTCH1 mutasyonu taşıyan ailelerin çoğunda, hastalık spektrumunun sadece sol taraflı kalp defektlerini değil aynı zamanda pulmoner atrezi ve FT’yi içeren hastalık spektrumunu da içerdiğini gözlemlemişlerdir. Sendromik olmayan FT’de NOTCH1 ve JAG1 bölgelerini içeren kopya sayısı varyasyonları tespit edilmiştir (50).



**Çizelge 2.4.** NOTCH sinyal yolağı bileşenlerinde görülen mutasyonlarla ilişkili konjenital kardiyovasküler hastalıklar (45)

GEN İSMİ	HASTALIK	KARDİYOVASKÜLER BULGULAR	KAYNAKLAR
JAG1	Alagille sendromu	Pulmoner arter stenoz, FT, VSD, vasküler anormallikler	2,3,46,54
JAG1	Izole KKH	Pulmoner arter stenoz, FT	6,7
NOTCH1	Aortik kapak hastalığı	Biküspid aortik kapak, aortik kapak kalsifikasyonu	4,38
NOTCH2	Alagille sendromu	Pulmoner arter stenoz, FT	8
NOTCH3	CADASIL	İnme ve demansa neden olan serebral arteriyopati, vasküler düz kas hücrelerinde granüler birikimler	5

CADASIL, cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukencephalopathy. JAG, jagged.



## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1 GEREÇ

#### 3.1.1. Hasta örneklerinin toplanması

Çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi (SBÜ) Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından 2019/1/65 karar numarasıyla kabul edilmiştir ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2019/029 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmaya, ebeveynleri tarafından Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu imzalanan, Fallot Tetralojisi tanısı almış 8 gönüllü dahil edilmiştir. Tanısı konulmuş, çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan ameliyat sırasında belli miktarda doku alınmıştır. Örnekler alındıktan hemen sonra, RNA later solüsyonu (hücrel RNA'nın bütünlüğünü stabilize etmek ve korumak için dokulara hızla nüfuz eden toksik olmayan bir doku depolama reaktifidir) konulan 1.5ml'lik tüplere alınmıştır. Alınan doku örneği soğuk zincirle Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır. Çalışma yapılan kadar örnekler -80°C derin dondurucuda bekletilmiştir.

##### 3.1.1.1. Hasta örneklerinin araştırmaya dahil olma kriterleri:

- Sadece FT tanısı alan hastalar
- 1-5 yaş arasında ameliyat endikasyonu alan tüm hastalar
- Ebeveynleri tarafından Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu imzalanan hastalar

##### 3.1.1.2. Hasta örneklerinin araştırmaya dahil olmama kriterleri:

- Sendromik olan hastalar
- Kromozom anomalisi olan hastalar
- Fallot Tetralojisine ek olarak başka kardiyak patolojisi olan hastalar

#### 3.1.2 Kullanılan kimyasallar

- RNA later
- Etil Alkol
- Hidrojen Peroksit
- $\beta$ -Merkaptoetanol ( $\beta$ -ME)

### 3.1.3 Kullanılan kitler

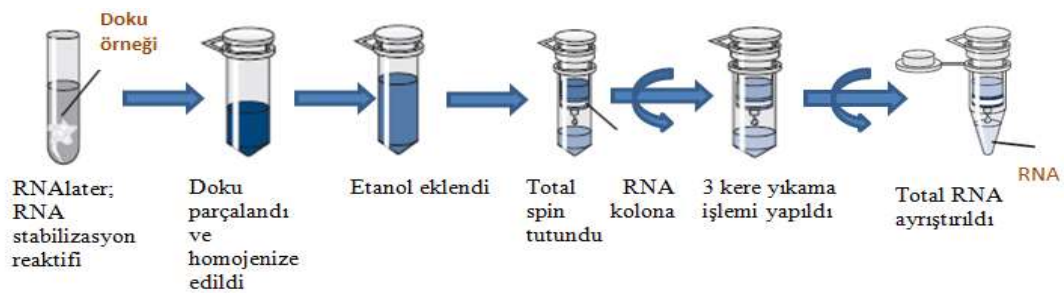
- RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen)
- Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche)

### 3.1.4 Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (+4°C ve -20°C, Arçelik ve Bosch)
- Derin dondurucu (-80°C, Daihan)
- Laminar Flow Kabin (Biobase)
- Çeker Ocak
- Distile su cihazı (Elga)
- İnkübator (Daihan)
- Masaüstü soğutmalı ultrasantrifüj (Gyrozen 158OR)
- Otomatik pipetler (Eppendorf)
- Spektrofotometre (Denovix)
- Vorteks (Wisd)
- Kar buz makinesi (IMS-50)
- Real-time PZR cihazı (Roche Light Cycler 480)
- Homojenizatör (Qiagen)
- Isıtıcı bloğu (Stuart)
- Spin (Clever)
- Otoklav (ALP)

## 3.2 YÖNTEMLER

### 3.2.1 Kit ile Dokudan RNA izolasyonu



Şekil 3.1. RNA izolasyonu standart prosedürü (51).

Dokudan total RNA izolasyonu için RNeasy Tissue Mini Kiti (Qiagen) kullanıldı.

**Kit içindeki solüsyonlar:**

- Lysis Buffer (RLT)
- Washing buffer (RW1, RPE)
- RNaz free – water

**Başlamadan önce:**

- 6µl β-ME 600µl tampon RLT'ye eklendi.
  - 4 hacim %96-100'lik etanol tampon RPE'ye eklendi.
  - Dokular –80°C'den çıkartıldı ve kısmen çözüldükten sonra RNazların salınmasını önlemek için derhal buz üzerine yerleştirildi.
  - Pens kullanılarak RNAlater'le sabitlenmiş doku reaktifinden ayrıldı.
  - Dokuların miktarı yaklaşık 30mg olacak şekilde bistüriyle petri kabında kesilerek hassas terazide tartıldı (**Çizelge 3.1**).
  - Dokuların homojenizasyon işlemi için homojenizatör boncuklarını koyduğumuz 2ml'lik tüpe dokular konduktan sonra üzerine 600µl tampon RLT solüsyonundan eklendi.
  - Tissue Lyser (LT) homojenizatör ile 50 1/s titreşim hızında 3.30 dk homojenize edildi.
  - Çalışmanın devamı cold block üzerinde gerçekleştirildi.
- ✓ **Doku:** Max 30 mg doku kullanıldı. Doku parçalandı ve lizat (lysate) uygun tampon RLT hacminde homojenize edildi (**Çizelge 3.2**). Lizat 12000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatantı (600µl) pipetle dikkatlice yeni tüpe alındı.
- ✓ Lizata bire bir oranda olacak şekilde 600µl %70'lik etanol eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı.
- ✓ 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilen RNeasy Mini spin kolonuna, çökelti dahil 700 µl'ye kadar örnek aktarıldı. Kapağı kapatıp 8000 x g'de 15s santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı. Örnek miktarı 700µl'yi aştığından aynı RNeasy spin kolonunda arka arkaya gelen kısımlar santrifüjlendi. Her santrifüjlenmeden sonra toplama tüpü atıldı.
- ✓ RNeasy spin kolonuna 700µl Tampon RW1'i eklendi. Kapağı kapatıp 8000 x g'de 15s santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı.
- ✓ RNeasy spin kolonuna 500µl Tampon RPE eklendi. Kapağı kapatıp 8000 x g'de 15s santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı.

- ✓ RNeasy spin kolonuna 500µl Tampon RPE eklendi. Kapağı kapatıp 8000 x g'de 2dk santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı.
- ✓ RNeasy spin kolonuna yeni bir 2 ml toplama tüpü yerleştirildi. Membranın kuruması için 8000 x g'de 1dk santrifüjlendi.
- ✓ RNeasy spin kolonuna yeni 1,5 ml'lik tüp yerleştirildi. Spin kolon membranının tam ortasına gelecek şekilde 25µl RNaz-free su eklendi. Kapağı kapatıldı ve RNA'nın elde edilmesi için 8000 x g'de 1dk santrifüjlendi. Örnek membrandan aşağı 1,5ml'lik tüpe geçmiş oldu. Çalışmanın devamında RNA kalite kontrol ve miktar tayini yapıldı.

**Çizelge 3.1.** Kullanılan dokuların miktarı

Örnek No:	1	2	3	4	5	6	7	8
Miktarı (mg)	29	34	32	34	27	26	33	25

**Çizelge 3.2.** Doku parçalanması ve homojenizasyon için tampon RLT hacmi

\*: RNA later'de stabilize edilen dokulara 600µl Tampon RLT kullanılır

Örnek	Miktar	Tampon RLT	Parçalama ve Homojenizasyon
Doku	<20mg ≤30mg	350µl* 600µl	Doku parçalayıcı (LT), havanda dövme, iğne ve enjektör

### 3.2.2. Spektrofotometrik Ölçüm

Spektrofotometrik analiz, nükleik asitlerin UV'yi belirli bir düzeyde absorbe ettiği prensibine dayanmaktadır. DNA ve RNA durumunda, bir örnek 260 nm dalga boyunda UV'ye maruz bırakılır ve bir foto-dedektör örnekten geçen ışığı ölçer. UV'nin bir kısmı geçecek ve bir kısmı DNA/RNA tarafından emilecektir. Örnek tarafından ne kadar fazla ışık emilirse, örnekteki nükleik asit konsantrasyonu o kadar yüksek olur. Nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanması, daha ileri uygulamalardan (dizileme, restriksiyon enzim kesimi, qPCR gibi) önce örneğin saflığının belirlenmesi açısından önemlidir. Proteinler ve fenol ekstraksiyon işlemiyle ilişkili tuzlar gibi diğer kirletici maddeler örneğin gerçek değerine etki ederek sonuçları etkileyebilir. Nükleik asit örneğin saflığı, nükleik asit ölçümünün yapıldığı 260 nm ve protein ölçümünün yapıldığı 280 nm absorbans oranı olan A260 / A280'nin bulunmasıyla belirlenir. **Çizelge 3.3'**de gösterilen ideal bir saflık oranıdır, ancak mutlak bir değer değildir. Proteinler en yüksek 280 nm'de ışığı emdiği için, bu oranlar

nükleik asit izolasyon işleminden kalan protein kontaminasyon miktarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır (52).

**Çizelge 3.3.** A260 / A280 oranına dayanan saflık değeri.

Nükleik Asit Tipi	Yaklaşık A260 / A280 oranı
Saf DNA	1.8
Saf RNA	2.0

### 3.2.3. Spektrofotometre ile RNA Kalite Kontrol ve Miktar Ölçümü

- ✓ Cihaz çalıştırılıp üst ve alt yüzeyleri temizlendi.
- ✓ Spektrofotometreyi sıfırlamak için RNA'nın seyreltiildiği tampon RNaz free-water'dan 1µl cihazın optik yüzeyine pipetlendi ve blank butonuna basıldı ve okutuldu.
- ✓ Sonra RNA örnekleri sırasıyla 1µl olacak şekilde optik yüzeye pipetlendi ve measure butonuna basılarak konsantrasyonları ölçüldü. Her seferinde örnek konmadan önce cihazın üst ve alt optik yüzeyleri kuru peçete ile temizlendi.
- ✓ Tüm örnekler cihaza ait 230, 260 ve 280nm dalga boylarında ölçüldü.
- ✓ RNA konsantrasyonları ve saflığını belirten oranlar not alındı.
- ✓ RNA örnekleri bir sonraki çalışma yapılarına kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'e kaldırıldı.

### 3.2.4. cDNA Eldesi ve Kontrol PZR'ı

Dokudan RNA izolasyonu yapıldıktan sonra RNA'dan reverz tranaskriptazla cDNA bankası oluşturuldu. cDNA eldesi için "random hexamer primer" ile cDNA sentez kiti kullanıldı (Şekil 3.2.).



RNA, Random hexamer primer, Distile su,  
eklendi



$65^{\circ}\text{C}$ 'de 10dk inkübe edildi, buzda soğutuldu



Tampon, Koruyucu, dNTP, DTT, RT (Revers transkriptaz) eklendi



Sırayla 29°C'de 10dk, 48°C'de 60dk, 85°C'de 5dk inkübe edildi



qPCR

**Şekil 3.2.** Tek ve çoklu reaksiyonlarda cDNA sentezi standart prosedürü (10).

#### **Kit içindeki solüsyonlar:**

- Random Hexamer Primer, 600 pmol/ml
- Water, PCR Grade
- Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc.
- Protector RNase Inhibitor, 40 U/ml
- Deoxynucleotide Mix, 10 mM
- DTT
- Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (RT)

- ✓ Kit içindeki solüsyonlar buz üzerine yerleştirildi ve çözünmesi beklendi.
- ✓ Reaksiyonlar ayarlanmadan önce tüm reaktifler kısaca santrifüjlendi.
- ✓ Buz üzerinde reaksiyon bileşenleri 0,5µl'lik tüpe 8 örnek için hazırlandı.

#### **Çizelge 3.4.** cDNA sentez bileşenleri 1.

<b>Reaktifler</b>	<b>Miktar</b>
Random hexamer primer	2µl
Distile su	4,4µl
Total RNA	5µl
<b>Toplam</b>	<b>11,4µl</b>

- ✓ Reaksiyon bileşenleri eşit miktarda 8 adet 0,2µl'lik tüplere dağıtıldı ve üzerine 5µl'şer RNA örneğinden dağıtıldı ve herbir tüpün toplam hacmi 11,4µl oldu.
- ✓ Tüpteki reaktifler dikkatlice karıştırıldı.

- ✓ Örnekler 65°C ısıtıcı blokda 10 dakika inkübe edildi.
- ✓ Tüpler hemen buz üzerinde soğutuldu.
- ✓ RT karışımının kalan bileşenleri aşağıda listelenen sırayla 0,5µl'lik tüpe 8 örnek için hazırlandı.

**Çizelge 3.5.** cDNA sentez bileşenleri 2.

Reaktifler	Miktar
RT reaksiyon tampon	4µl
Rnaz inhibitör	0,5µl
dNTP karışım	2µl
DTT	1µl
RT	1,1µl
<b>Toplam</b>	<b>8,6µl</b>
<b>Ara toplam</b>	<b>20µl</b>

- ✓ RT karışımı önceden hazırlanmış 8 örneğin üzerine eşit miktarda dağıtıldı ve toplam hacim 20µl oldu.
- ✓ Tüpteki reaktifleri dikkatlice pipetlendi.
- ✓ Sırayla 29°C'de 10 dk, 48°C'de 60 dk, 85°C'de 5 dk inkübe edildi ve cDNA elde edildi.
- ✓ Deneme RT-PZR için 1'ci, 2'ci, ve 3'cü cDNA örnekleri 1/2, 1/5, 1/10 ve 1/25 oranlarında RNaz free water ile sulandırıldı.
- ✓ Farklı oranlarda sulandırılmış toplam 12 cDNA örneğinden deneme RT-PZR yapıldı. PZR için aşağıda listelenen bileşenlerle 12 örnek için bir karışım hazırlandı.

**Çizelge 3.6.** cDNA deneme RT-PZR bileşenleri

Reaktifler	1x
Distile su	5µl
Sybr green	10µl
Primer	1µl
<b>Toplam</b>	<b>16µl</b>

- ✓ 16µl'lik karışım 96'lık plate'e dağıtıldı ve üzerine 4µl'şer sulandırılmış cDNA örneğinden konuldu ve toplam hacim 20µl olacak şekilde dizayn edildi.
- ✓ Hedef olarak β-aktin geni kullanıldı.
- ✓ 4000rpm'de 1dk spin yapıldı.



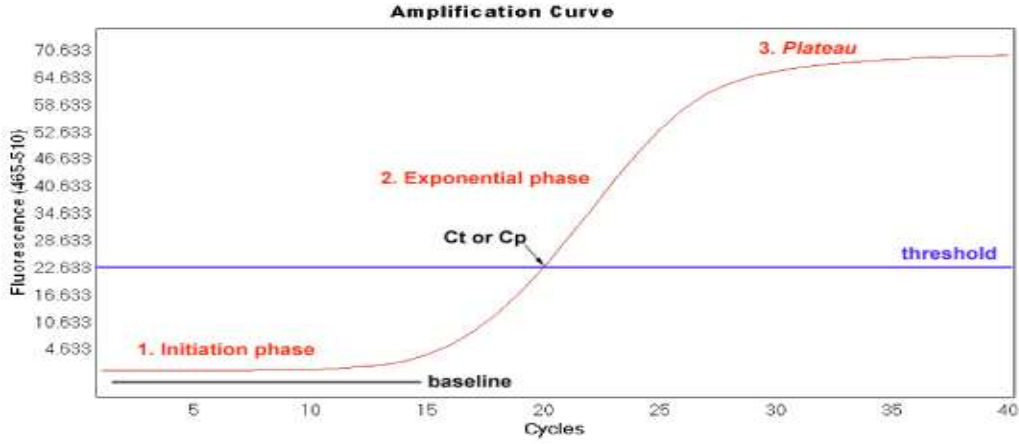
- ✓ Uygun sıcaklık ve koşullarda RT-PZR yapıldı (**Çizelge 3.7**).

**Çizelge 3.7.** RT-PZR koşulları

	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	<u>Döngü/Cycle</u>
Ön Denatürasyon	95°C	10dk	1
Denatürasyon	95°C	15sn	} 45
Primer Bağlanması	60°C	1dk	
Zincir Uzaması	72°C	5sn	
	95°C	5sn	
Eğrime Eğrisi/Melting Curve	65°C	1dk	} 1
	97°C	continuous	
Soğutma/Cooling	40°C	30sn	1

### 3.2.5. Gerçek Zamanlı PZR (Real-Time PCR)

qPCR (Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gerçekleştirmek için yapılan ilk girişimler, deneysel olarak belirlenmiş bir PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) döngü sayısında etidyum bromürün (veya diğer birleşen boyaların) eklenmesini kullanarak PZR ürünlerinin görselleştirilmesine dayanıyordu. 1993 yılında Higuchi tarafından rapor edilen ilk gerçek zamanlı PZR yöntemi, PZR işlemi sırasında etidyum bromürün eklenmesi ve numuneleri ultraviyole (UV) ışığı ile ışınlamak için değiştirilmiş bir ışıl döngü kullanıldı ve daha sonra elde edilen floresan sinyali CCD kamera ile algılandı. Floresan sinyali döngü sayısının bir fonksiyonu olarak çizildi. Artık çok bilinen bir görüntü olan sonuç grafiği (**Şekil 3.3**) her PZR döngüsü sırasında üretilen PZR ürününün miktarına dair iyi bir bulgu vermektedir. Etidyum bromür gibi kanserojen madde kullanımı dışında bu yaklaşımın birincil dezavantajı, spesifik olmayan PZR ürünlerinin eşit olarak algılanması ve ölçülen toplam floresan sinyal miktarına dahil edilmesidir. Gerçek zamanlı qPCR uygulamaları çoktur. Bunlar arasında: mRNA ekspresyon çalışmaları, genomik veya viral DNA'lardan DNA kopya sayısı ölçümleri, transgen kopya sayısı varyasyonları, alelleri ayırıştırma deneyleri ve mikroarray verilerinin validasyonu vardır. Gerçek zamanlı PZR'da Ct değerlerinin elde edilmesi için sybrgreen deteksiyon metodu kullanıldı. Ct değeri, gerçek zamanlı PZR yönteminde önemli değişkendir. Ct değeri örnekte ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir (**Şekil 3.3**), (53).



Şekil 3.3. Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analiz görüntüsü (54).

### 3.2.6. qRT-PZR

#### Kullanılan cihaz ve malzemeler

- Light Cycler 480 qRT-PCR cihazı (Roche)
  - SYBR green super mix (Applied Biosystem)
  - NOTCH1 Primer (Roche)
  - NOTCH2 Primer (Roche)
  - Beta Aktin Primer (Roche)
  - Distile su
- ✓ RT-PCR için, dokudan izolasyonu gerçekleştirilmiş RNA molekülünden elde edilmiş cDNA örnekleri kullanılmıştır.
  - ✓ Primerler için araştırmada hedef gen olarak NOTCH1 ve NOTCH2 genleri, hedef gen için, ekspresyon profilinin normalizasyonu için tüm diğer dokularda gen ifadesinin değişmediği, her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen  $\beta$ -Aktin *housekeeping* geni kullanıldı.

Çizelge 3.8. qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler (55, 56).

Genler	Forward Primer	Reverse Primer
Beta-Aktin	5'-GCA CCA CAC CTT CTA CAA TG -3'	5'- TGC TTG CTG ATC CAC ATC TG-3'
NOTCH1	5'-CACTGTGGGCGGGTCC-3'	5'-TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG-3'
NOTCH2	5'-TCCACTTCATACTCACAGTTGA-3'	5'-TGGTTCAGAGAAAACATACA-3'

- ✓ RT-PCR için referans  $\beta$ -Aktin geni ile hedef NOTCH1, NOTCH2 genler için aşağıda listelenen bileşenler hazırlanıp 96'lık plate'e dağıtıldı.
- ✓ 8 hasta örneği için reaksiyon bileşenleri ayrı ayrı hazırlandı.
- ✓ Uygun sıcaklık ve koşullarda RT-PZR yapıldı.

**Çizelge 3.9.**  $\beta$ -Aktin, NOTCH1, NOTCH2 genleri için RT-PCR protokolü

$\beta$ -Aktin		Notch-1		Notch-2	
Reaktifler	1x	Reaktifler	1x	Reaktifler	1x
Distile su	5 $\mu$ l	Distile su	5 $\mu$ l	Distile su	5 $\mu$ l
Sybr green	10 $\mu$ l	Sybr green	10 $\mu$ l	Sybr green	10 $\mu$ l
Primer	1 $\mu$ l	Primer	1 $\mu$ l	Primer	1 $\mu$ l
cDNA	4 $\mu$ l	cDNA	4 $\mu$ l	cDNA	4 $\mu$ l
<b>Toplam</b>	<b>20<math>\mu</math>l</b>	<b>Toplam</b>	<b>20<math>\mu</math>l</b>	<b>Toplam</b>	<b>20<math>\mu</math>l</b>

### 3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler RT-PCR analizi sonunda elde edilen Threshold Cycle (Ct) değerlerine göre  $\Delta$ Ct ve  $\Delta\Delta$ Ct formülü ile hesaplandı ve kat sayıları değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde "RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Template" data analizi kullanıldı (57).

mRNA ekspresyon düzeyinin saptanması için kullanılan hedef mRNA geninin Ct değerleri ile referans (housekeeping) mRNA geninin Ct değerleri ile  $\Delta$ Ct formülü kullanıldı. Elde edilen bu değerlerin standart eğrideki  $\Delta$ Ct değerine oranı ise  $\Delta\Delta$ Ct formülü ile hesaplandı.

1.  $\Delta$ Ct= Ct (hedef gen) - Ct (referans gen)
2.  $\Delta\Delta$ Ct=  $\Delta$ Ct (hasta doku) -  $\Delta$ Ct (kontrol doku)

Kat değişimi  $2^{(-\Delta\Delta$ Ct) hesaplanması için, hasta örneğindeki normalize edilmiş gen ifadesi  $2^{(-\Delta$ Ct), kontrol örneğindeki normalize edilmiş gen ifadesine  $2^{(-\Delta$ Ct) bölünmüştür.

Birden fazla olan kat değişim değerleri, pozitif ya da up-regüle'ye işaret ederken birden az olan kat değişim değeri, negatif ya da down-regüle'ye işaret eder. p değerleri, kontrol grubu ve hasta gruplarındaki her bir gen için tekrar eden  $2^{(-\Delta$ Ct) değerlerine dayanan Student's T testi ile hesaplandı. p değeri 0.05'ten küçükse ( $p < 0.05$ ) sonuç anlamlı kabul edildi (58).

Gen ifade düzeylerinin hesaplanmasında haritalanmış RNA-seq verilerinden normalleştirilmiş ifade ölçümleri elde edilir. Bu değerler RPKM (reads per kilobase per

million), FPKM (fragments are counted rather than reads) ve TPM (transcripts per million) , bir countig'in (sayım) referans sekansındaki her CDS (count of reads) notu için hesaplanır ve sonuçlar bir ısı haritası bilgi notu olarak gösterilir. Her örnek için birden fazla referans sekansı ya da tek bir numuneden tüm countig'ler seçilerek tek bir adımda sonuca gidilir. Numuneler arasındaki diferansiyel ifadeyi hesaplamak için her numune için ayrı ayrı expression seviyesi hesaplaması yapılır ve ardından bu expression seviyeleri kullanılarak sonuçları karşılaştırılır. Biz de çalışmamızda elde ettiğimiz expression seviyelerini iki ayrı database'den elde ettiğimiz sonuçlarla normalize ederek hesaplama yaptık.

Biogps veritabanında normal kalp dokusuna ait mikroarray tabanlı analiz kullanılmış olup normal kontrol kas dokusu için NOTCH1 *house keeping* gene olan ACTB'ye göre ekspresyonu %0.9 (Yani 111 de 1i kadar) ve NOTCH2'nin benzer şekilde ACTB'ye göre ekspresyonu %0.53 (yani ortalama 186 da 1'i kadar eksprese olmaktadır) olarak değerlendirilebilir (59).

Gtexportal veritabanında RNA-seq ile yapılan normal kalp dokusuna ait 2 farklı bölgeden alınan (normal kalp dokusu sol ventrikul n= 432 ve atrial tepeciğine n=429 örneğe ait) veriler bulunmaktadır. Bu veri tabanında NOTCH1, NOTCH2 ve ACTB genlerine ait veriler orantılandığında NOTCH1; ACTB'ye göre (atrial tepesi dokusuna göre %0.92 (103.44 de 1'i) ve sol ventriküle göre %1.7 (63 de 1'i)) ve NOTCH2; ACTB'ye göre (atrial tepesi dokusuna göre %0.76 (130 da 1'i) ve sol ventriküle göre %0.79 (126 da 1'i)) gibi bir ekspresyon düzeylerine karşılık gelmektedir (60), (**Çizelge 3.10**).

**Çizelge 3.10.** Veri tabanından alınan TPM değerleri ve birey sayıları  
TPM=Transcript per million, N= Birey sayısı

	NOTCH1		NOTCH2		ACTB	
	TPM	N	TPM	N	TPM	N
Heart -Atrial Appendage	11,06	429	9,224	429	1200	429
Heart - Left Ventricle	7,714	432	3,572	432	452	432



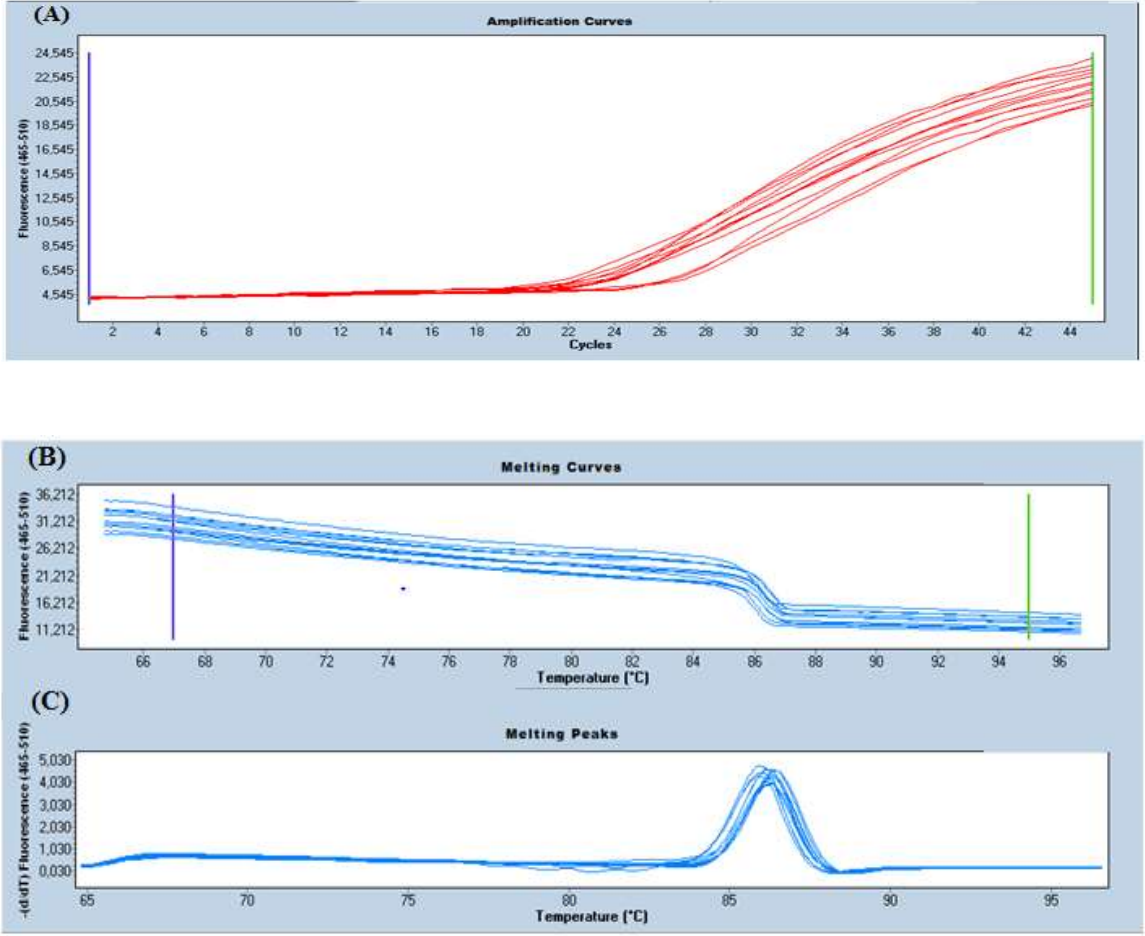
## 4. BULGULAR

Dokular,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarıldıktan sonra Tissue Lyser homojenizatör cihazı ile homojenizasyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın devamında RNeasy Tissue Mini (Qiagen) kiti ile dokulardan total RNA izolasyonu yapıldı. RNA'ların kalite kontrolü ve miktarının ölçümü için spektrofotometrik ölçüm cihazı kullanıldı. Tüm örnekler cihaza ait 230, 260 ve 280nm dalga boylarında ölçüldü. RNA konsantrasyonları ve saflığını belirten oranlar tabloda özetlendi (**Çizelge 4.1**).

**Çizelge 4.1.** RNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları

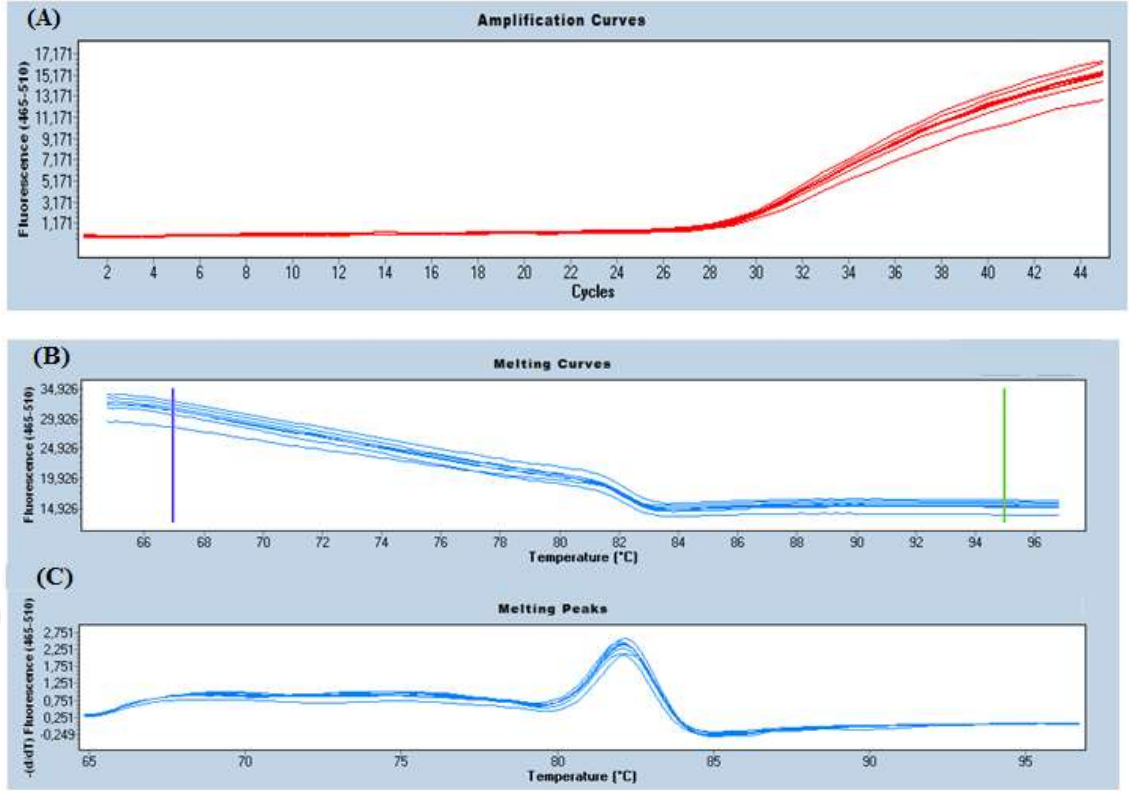
Örnek No	Konsantrasyon	RNA 260/230 oranı (ng/ $\mu\text{l}$ )	RNA 260/280 oranı (ng/ $\mu\text{l}$ )
1	375,919	2,08	2,02
2	377,021	1,87	2,01
3	501,129	2,10	2,04
4	533,356	2,10	2,04
5	338,770	1,83	2,02
6	393,693	2,01	2,02
7	365,305	2,12	2,02
8	225,086	1,45	2,02

Dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen total RNA molekülleri, Poli A kuyruğu ekleme reaksiyonuyla, revers transkriptazla cDNA'ya çevrildi. cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis (Roche) kiti kullanıldı. Elde edilen cDNA örnekleri için kontrol RT-PCR yapıldı (**Şekil 4.1**).



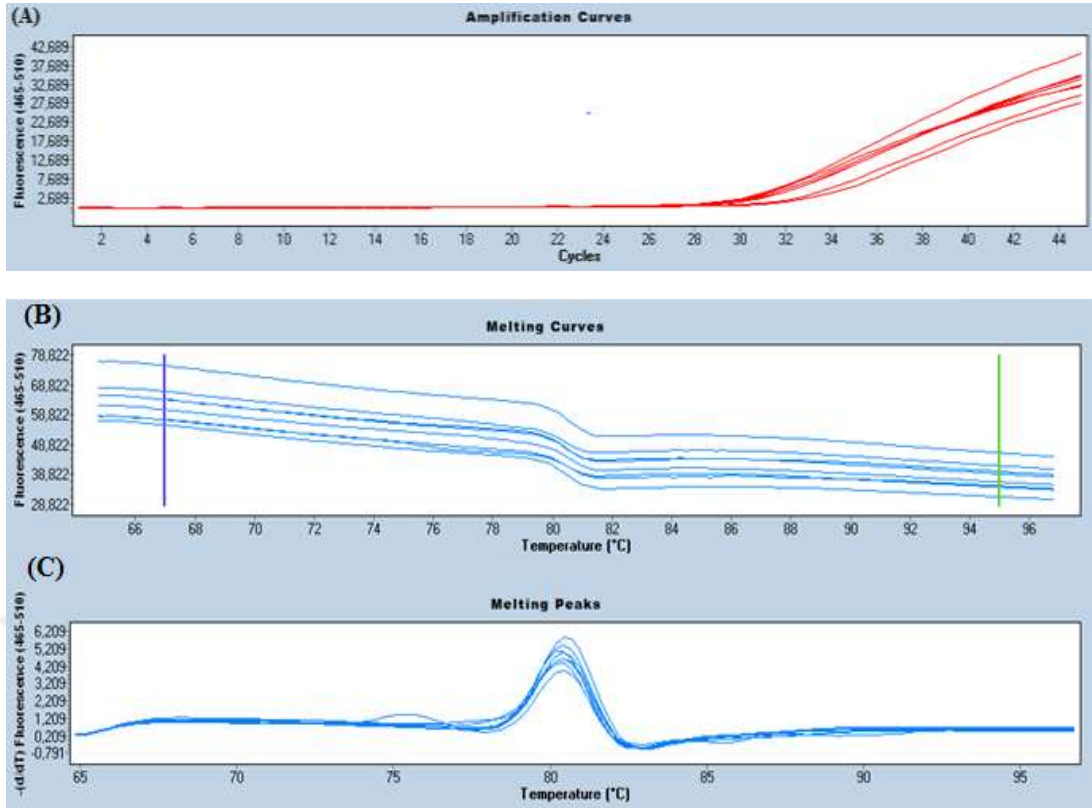
**Şekil 4.1.** Beta-Aktin referans genine ait RT-PCR cDNA deneme sonuçları  
A) Amplification curve B) Melting curve C) Melting peak

RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra NOTCH1 ve NOTCH2 genlerine ait dizayn edilmiş primerlere, gerçek zamanlı kantitatif PZR (qRT-PCR) reaksiyonlarıyla optimize kondüsyonlarda mRNA ekspresyon seviyelerini tespit edildi (**Şekil 4.2 ve Şekil 4.3**).



Şekil 4.2. NOTCH1 hedef genine ait RT-PCR sonuçları  
A) Amplification curve B) Melting curve C) Melting peak





**Şekil 4.3.** NOTCH2 hedef genine ait RT-PCR sonuçları  
A) Amplification curve B) Melting curve C) Melting peak

Ebeveynlerinden yazılı bilgilendirilmiş onam formu imzalatılan, FT tanısı almış 8 gönüllünün demografik verileri tabloda özetlenmiştir. FT'li hastalarda yaş grupları ve cinsiyet bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0.392$ ,  $p=0.463$ ). Demografik verilerin değerlendirilmesinde ki-kare analiz metodu kullanılmıştır (**Çizelge 4.2**).

**Çizelge 4.2.** Hastaların demografik bilgileri

HASTA NO	CİNSİYET	YAŞ	BOY (cm)	KİLO (kg)
1	K	2	80	8
2	E	1,5	70	6
3	E	1	80	9
4	K	1	58	6
5	E	7	124	24
6	E	1,5	70	9
7	E	1	60	7
8	E	1	70	10

RT-PCR sonucu elde edilen NOTCH1, NOTCH2, ACTB genlerine ait mRNA ekspresyon seviyelerinin crossing point (Cp) değerleri özetlendi (**Çizelge 4.3**).

**Çizelge 4.3.** RT-PCR sonucu elde edilen hasta Cp değerleri.

Veri tabanından alınan kontrol Cp değerleri (59, 60).

Hasta Cp değerleri				Kontrol Cp değerleri
Hasta No	ACTB (referans gen)	NOTCH1 (hedef gen)	NOTCH2 (hedef gen)	NOTCH1 NOTCH2
1	23,4	28,95	32,56	38
2	22,25	28,86	30,77	38
3	23,43	28,91	30,8	38
4	22,83	28,94	30,26	38
5	23,64	28,89	33,18	38
6	23,58	28,9	31,12	38
7	22,94	29,12	31,24	38
8	21,94	28,97	31,22	38

$\Delta$ Cp değerlerin hesaplanmasında, mRNA ekspresyon düzeyinin saptanmasında kullanılan hedef NOTCH1, NOTCH2 genlerin Cp değerleri ile referans ACTB geninin Cp değerleri kullanılarak  $\Delta$ Cp= Cp (hedef gen) - Cp (referans gen) formülüne göre hesaplandı. Elde edilen bu değerlerin standart eğrideki  $\Delta$ Cp değerine oranı ise  $\Delta\Delta$ Cp formülü ile hesaplandı.  $2^{\Delta\Delta$ Cp data ekspresyon sonucu hasta grubun kontrol grubu ile kıyasla kat değişimi değerini verdi (**Çizelge 4.4**).

**Çizelge 4.4.** Hasta ve kontrol grupların AVG.Cp, AVG. $\Delta$ Cp değerleri.

HKG: housekeeping gen

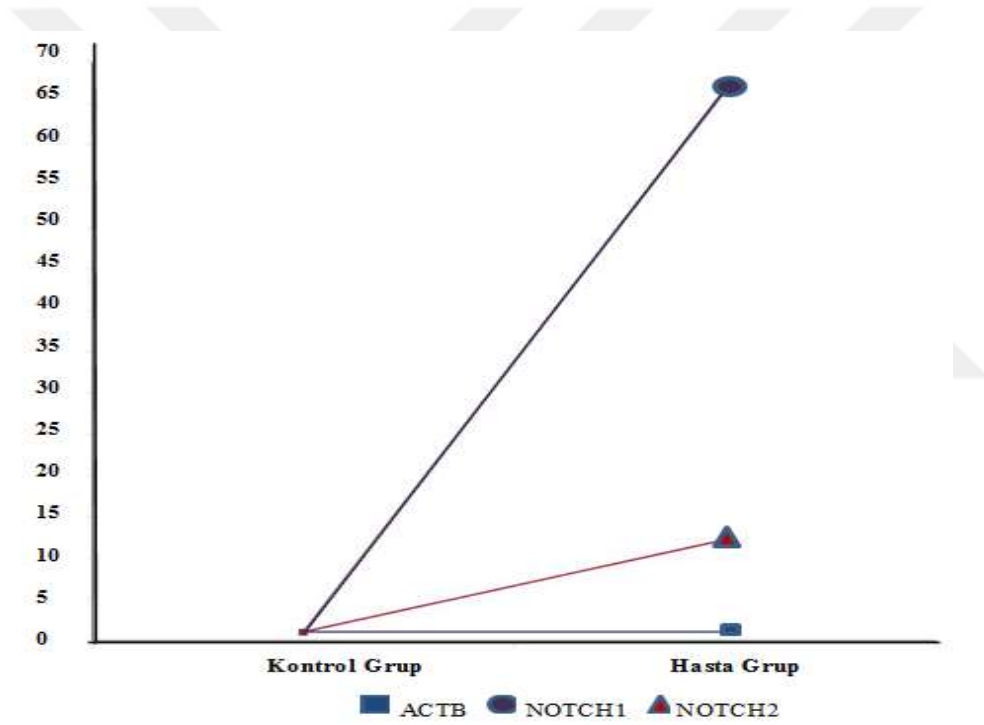
Gen	AVG (Ortalama) Cp		Standard Sapma		AVG $\Delta$ (Cp)= Cp(hedef gen) -Avg Cp (HKG)		Standard Sapma		2 <sup>(-Avg. <math>\Delta</math>Cp)</sup>	
	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol
ACTB	23	23	0,633	0,633	0	0	0	0	1	1
NOTCH 1	28,94	35	0,080	0	5,941	11,999	0,649	0,633	0,016	0,0002
NOTCH 2	31,39	35	0,979	0	8,392	11,999	0,880	0,633	0,003	0,0002

Veri analiz sonuçları, NOTCH1 ve NOTCH2 genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri bakımından FT'li hastaların kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla 66 ve 12 kat değişimi değerlerini verdi. Gen ekspresyon artışı tespit edilen NOTCH1 ve NOTCH2 genleri istatistiksel olarak analiz edildiğinde sırasıyla p= 0.000006 ve p= 0.000414 olarak anlamlı farklılık gösterdikleri bulunmuştur (**Çizelge 4.5**).

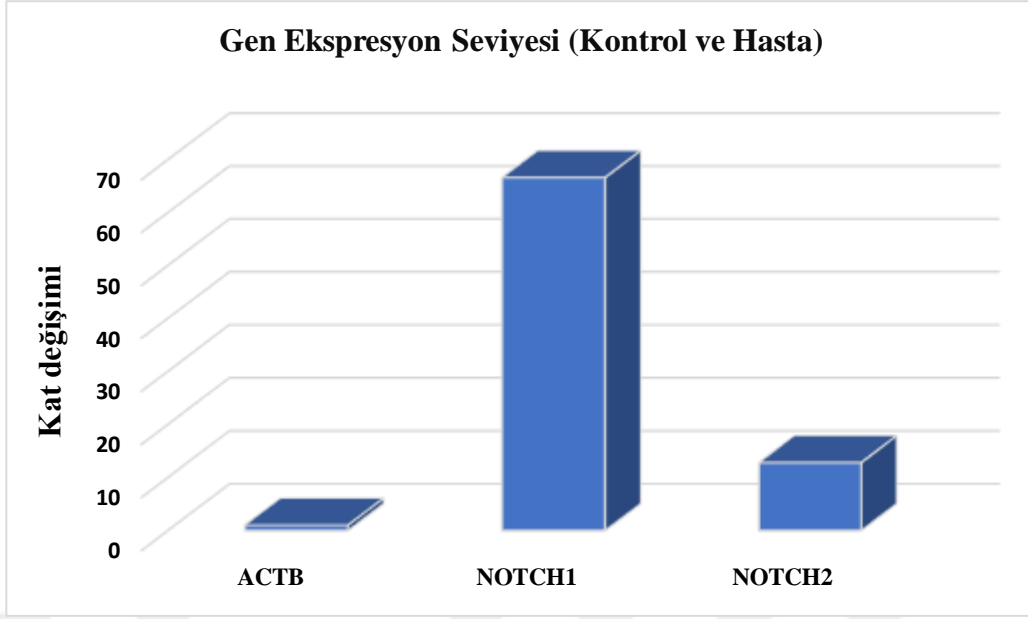
**Çizelge 4.5.** Kontrol grubuyla kıyasla kat değişim değerleri ve p-değeri  
2'den büyük kat değişim değerleri kırmızı olarak belirtilmiştir.

GEN	KAT DEĞİŞİMİ	p DEĞERİ
ACTB	1	
NOTCH1	66,6023	0.000006
NOTCH2	12,1784	0.000414

NOTCH1 ve NOTCH2 genlerin ekspresyon seviyeleri bakımından kontrol grubu ile kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucu elde edilen verilerin anlamlılık ifadelerini belirten grafikler aşağıda özetlenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



**Şekil 4.4.** Hasta grubun kontrol grubuyla kıyasla kat değişim değerleri



şekil 4.5. Hasta grubun kontrol grubuyla kıyasla kat değişim değerleri



## 5. TARTIŞMA

KKH'ler en yaygın görülen doğum defekti türüdür ve çocuklarda doğumsal defektlere bağlı morbidite ve mortalitenin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. FT en sık görülen siyanotik KKH türüdür. FT hem genetik ve hem de çevresel faktörlerden kaynaklandığı bilgilerine dayanarak multifaktöriyel bir hastalık olduğu bilinmektedir. FT vakalarında bugüne kadar yapılan araştırmalarda; anormal gen ekspresyonu değişimleri, kromozomal anomaliler, *de novo* kopya sayısı varyasyonları ve tek gen polimorfizmlerinde tanımlanan genler ve gen ağları bulunmaktadır. Kardiyak çıkış yolu gelişiminde vasküler endotel büyüme faktörü-A'nın (VEGF) ve NOTCH sinyal yolağında yer alan genlerin önemi genel olarak kabul edilmektedir. Her ne kadar insanlarda ve fare modellerinde genetik heterojenlik ve bu genlerin mutasyonları Fallot tetralojisi ve periferik pulmoner darlık gibi çıkış yolu malformasyonları gelişimi ile ilişkilendirilmiş olsa da şu ana kadar hastalık etiyolojisi ile ilgili bilgilerimiz açık değildir. Fare embriyonik kalpleri kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda çıkış yolu hiperplazisi gelişen örneklerde immünohistokimya, in situ hibridizasyon ve kantitatif RT-PCR metodları kullanılarak VEGF, Notch1 ve Jagged2 genlerinde sinyal akışının anormal olduğu gösterilmiştir. Bu durum, özellikle çıkış yolu yastıklarının hiperplazisi ve sonraki aşamalarda pulmoner darlık ve ventriküler septal defekt olarak ortaya çıkan yüksek derecede subpulmoner miyokard apoptozisi ile örtüşmektedir.

Biz yaptığımız bu çalışmada, NOTCH1 ve NOTCH2 genlerinde, gelişimsel olarak anomali gösteren hasta dokularında, normal gelişim gösteren dokuya göre ekspresyon farklılığı olup olmadığını belirlemeyi amaçladık. Buna göre FT'li hasta grubundaki ekspresyon değerlerinin genel dağılım paternini analiz ettik ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark bulduk. Elde ettiğimiz bulgular, NOTCH1 ve NOTCH2 genlerindeki ekspresyonunun artışının (up-regüle) kalbin gelişim ve farklılaşma sürecini etkilediği ve Fallot Tetralojisinin ortaya çıkışına sebebiyet verdiği yönündedir.

Bittel DC ve ark. tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmaya göre FT'li 19 çocuktan cerrahi operasyon sırasında alınan kardiyovasküler dokudan ekspresyon paternleri karakterize edilmiş ve genom boyu analizler yapılmıştır. Gen ekspresyon paternleri normal gelişim gösteren sağlıklı dokularla karşılaştırılmış ve sonuç olarak 1000'den fazla genin FT'li çocukların sağ ventrikülündeki (RV) eşleşmiş kontrol örneklerden alınan RV'ye kıyasla 2 kat up-regülasyon gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak kalp gelişiminde kritik rol oynadığı bilinen WNT ve NOTCH sinyal yollarındaki birçok genin downregüle olduğu belirtilmiştir. İlginç olarak 22q11.2 delesyonu olan FT'li hastalarda hem sendromik hem non-sendromik ortak bir

transkripsiyonel faktörü vurgulayan NOTCH sinyal bileşenlerinin down regülasyonu gözlemlenmiştir (11). Bizim çalışmamızdaki sonuçlar bu çalışma ile örtüşmemektedir. Bu durumu kardiyak gelişim sürecinin erken aşamalarındaki embriyolarda mutasyon meydana gelmiş olması ve buna bağlı olarak hem sendromik hem de non-sendromik olguların tümünde ekspresyon eksikliğine bağlı, aslında daha ileri evrelerde ortaya çıkması beklenen ancak daha erken evrede görülen ventriküler septal defekt gelişimi ile açıklamak mümkündür.

Kaynak B ve ark. yaptıkları çalışmada FT'li 9 çocukta dokulardaki ekspresyon bakımından SNIP, A2BP1 ve KIAA1437 dahil olmak üzere potansiyel olarak önemli bazı genlerin eksprese edildiğini ve STK33, BRDG1 ve TEKT genlerindeki ekspresyon seviyelerinin belirgin şekilde down regüle olduğunu belirtmişlerdir (61). Bu durum FT hastalığının multigenik olduğu savını bir kez daha ortaya koymak açısından önemlidir.

Sharma HS ve ark. yaş aralığı 0,8–1,8 yıl olan 12 (FT-1) çocuk hasta grubu, yaş ortalaması 19,3–38,8 yıl 8 (FT-2) olan yetişkin hasta grubu, yaş aralığı 0,8-1,9 yıl olan beş kontrol (C-1) grubu ve yaş aralığı 17,1-44,6 yıl olan 11 yetişkin kontrol (C-2) grubu ile, yüksek yoğunluklu DNA microarray dizi analizi yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada 200'den fazla miyokardiyal genin deregülasyonunu belirlemişlerdir. FT'li çocuklardan alınan dokulardaki gen ekspresyon değişikliklerinin ve çeşitli ECM (hücre dışı matriks) proteinlerinin artmış seviyelerinin FT'ye katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır (62). NOTCH sinyal iletiminin kalp kapakçık gelişimi ve miyokardiyal kompaksiyonu sırasında epitelial-mezenşim geçişi (EMT), hücre dışı matriks (ECM) üretimi ve kalp odacıklarının olgunlaşmasında yer alan çeşitli genleri ve yolları düzenlediği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da VEGF ve NOTCH genlerinin kardiyak çıkış yolu gelişimi ile bağlantılı olması bakımından bu sonucu destekler niteliktedir.

O'Brien ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 16 non-senromik FT'li bebeklerde sağ ventrikül miyokardiyum dokusundan aldıkları örneklerde kalp gelişimi için önemli olduğu bilinen 229 genden mikroRNA ekspresyon seviyesini incelemişlerdir. Bu genlerden 44'ünün FT miyokardında normal gelişim gösteren miyokardiyuma göre downregüle oldukları tespit edilmiştir (63). Ekspresyon seviyeleri düşük olan bu miRNA'ların genomda yer alan hedef genleri arasında NOTCH genleri de bulunmaktadır. Bu durum bu genlerin upregülasyonunu sağlaması açısından bizim bulgularımızla örtüşmektedir.

Bittel DC ve ark 2014 yılında yaptıkları bir çalışmaya, FT'li bebeklerde hasta ve sağlıklı gruplar arasında ekspresyon bakımından O'Brien ve ark. yaptıkları çalışmaya göre önemli farklılık gösteren miRNA'ları çalışmaya dahil ettiler. miR-421'in FT'li bebeklerin sağ ventrikül dokusunda over eksprese edildiğini göstermiştir (64).

Yine Bittel DC ve ark 2014 yılında tüm genom ve ekzom dizileme metodunu kullanarak yaptıkları başka bir çalışmada sporadik FT'li 34 hastadan sağ ventrikül gelişiminin düzenlenmesinde kritik olduğu bilinen 13 farklı gen içeren 33 farklı kopya sayısı varyasyonlarına (KSV)'ye sahip 16 hasta tespit etmişlerdir. Bu genlerden ikisi NOTCH sinyal yolağında yer alan JAG1 ve NOTCH1 genleridir (65). Bu genlerde görülen mutasyonlar pulmoner arter darlığı ve FT ile ilişkilendirilmiştir. NOTCH1 null mutasyonlarının, öncelikle ailesel biküspid aort kapağına ve daha az sıklıkla diğer malformasyonlara neden olduğu bilinmektedir. Sporadik non-sendromik FT vakalarının en az %10'unun de novo KSV'lerden kaynaklandığı ve bu lokuslardaki mutasyonların diğer FT vakalarında etiyolojik olabileceği (33) düşünüldüğünde bu genlerdeki ekspresyon farklılığının hastalık etiyolojisini aydınlatmada kullanılabileceği görülmektedir.

Kerstjens-Frederikse WS ve arkadaşlarının 428 sendromik olmayan sol taraflı KKH'li ailelere odaklanan çalışmalarında NOTCH1'de patojenik mutasyonları barındıran FT'li aile üyelerini de tanımlamışlardır (50). Jin SC ve ark. tarafından 2017'de yayımlanan ve bu zamana kadar incelenen en büyük (2871 proband) kohortu içeren çalışmada, yalnızca LOF (loss of function) heterozigot varyantlarına odaklanan 426 FT'li hastaların ekzom dizilimi, NOTCH1 varyantlarının hem LOF hem de yanlış anlamlı (missense) mutasyonları içermesi, FT riskine katkısını önemli ölçüde göstermektedir (12). NOTCH1 genindeki otozomal dominant germ-line mutasyonları, temel olarak Adams-Oliver sendromunun (AOS) nedenlerinden biridir. Bunun dışında hastaların yaklaşık yarısında ASD, VSD, AS, PS ve FT gibi doğuştan kalp anomalileri vardır (66). Timmerman LA ve ark. yaptığı çalışmada NOTCH1'in, kalp kapak oluşumu sırasında gereken bir işlem olan endokardiyal epitelyal mezenşimal geçiş için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte rapor edilen tüm NOTCH1 değişkenlerinin heterozigot olduğu bilinmektedir (67). Gerek mutasyon, gerek genotip ve gerekse ekspresyon farklılığına dayalı yapılan tüm bu çalışmalar özellikle NOTCH1 geninin FT oluşumu ile direkt olarak ilgili olduğunu göstermektedir. Bizim sonuçlarımız da bu bulguları destekler niteliktedir.

Bugüne kadar yapılmış tüm çalışmalar KKH ile NOTCH1 varyantlarının ilişkisini biküspid aort kapağı, aort kapak darlığı, aort koarktasyonu ve hipoplastik sol kalp sendromu ve FT olan kardiyak malformasyonları üzerine tanımlamıştır. Ancak NOTCH varyant değişkenliğinin FT'ye katkısı şu ana kadar kesin olarak tanımlanamamıştır. Diğer izole kardiyovasküler anomalilerde bildirilenlere kıyasla FT'de tanımlanan NOTCH varyantlarının tipi ve bölgesi arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (5). FT'nin multifaktöriyel bir



hastalık olarak tanımlanması, bu sebeple genetik ve çevresel faktörlerin fenotipik ekspresyonu belirleyebileceği görüşü üzerinde durulması gereken bir durumdur.

Lai C.T.M. ve arkadaşlarının toplamda 104 FT hastası ve 70 kontrol ile yaptığı çalışmada ilk olarak 49 hasta ve 30 kontrol ile sol kalp hastalıklarında dolaşımdaki kalp ile ilgili mi-RNA'lar belirlenmiştir ve çalışmanın ikinci aşamasında 55 hasta ve 40 kontrol ile serum örneklerinin ekspresyon profili ve validasyonu yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda hastalar ve kontroller arasında sol kalp kaynaklı miRNA'ların serum düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ekspresyon profili oluşturulan 19 miRNA aday genlerinden, miR-99b'nin up-regülasyonu ve miR-766'nın down-regülasyonu tespit edilmiştir (68). Bu miRNA'ların genomda yer alan komplementerlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi ile hastalık patofizyolojisinin aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Abu Halima M ve ark. 3 semptomatik sağ kalp yetmezliği olan FT'li hastalarda cerrahi onarımından sonra 37 hastada miRNA ekspresyon profillerini belirlemek için insan v16 miRNA dizilerini kullanmışlardır ve seçilen miRNA'ların ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Çalışmanın sonucunda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, tüm FT hastalarında, semptomatik sağ kalp yetmezliği olan (FT-HF) ve semptomatik sağ kalp yetmezliği olmayan (FT-noHF) FT hastalarında sırasıyla toplam 49, 58 ve 77 miRNA'nın önemli ölçüde değiştiği bulunmuştur. Tüm FT gruplarında miR-181d-5p, miR-206 ve miR-625-5p belirlenmiştir. Ayrıca, miR-625-5p, miR-1233-3p ve miR-421'in ekspresyon seviyelerinin FT-HF hasta grubunda FT-noHF hasta grubu ile kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir (P = 0.012) (69). Bu durum FT gelişiminin genomdaki birçok genin up-regülasyonuna bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Wu KH ve arkadaşlarının 40 tane D7 gebe fare ile yaptıkları çalışmalarında, KKH'lı (n=20) ve sağlıklı (n=20) grup olarak belirlenmiştir. Kalp dokularında miR-34a, NOTCH1, Jagged1, Hes1, Hey2 ve CSX ekspresyonları belirlenmiştir. Sağlıklı gruba kıyasla miR-34a, Jagged1, Hes1 ve Hey2 gen ekspresyonları up-regüle iken, NOTCH1 ve CSX ekspresyonları KKH'lı grubunda down regüle tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, miR-34a'nın NOTCH sinyal yolağını modüle ederek NOTCH1'in down regülasyonu yoluyla KKH riskini arttırdığı rapor edilmiştir (70). Ancak bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu raporu destekler nitelikte değildir. Bu durum miRNA'ların RNA translasyonunu inhibe ederek genomdaki yüzlerce genin ekspresyonuna etki edebildiğinin bir göstergesi olmakla birlikte aslında literatürde yer alan ve bizimde yukarıda örneklerini vermiş olduğumuz birçok çalışma ile de örtüşmemektedir. Bir miRNA'nın bir sinyal iletim yolunda yer alan tüm genleri etkilemesi demek o miRNA'nın artık biyobelirteç olarak kullanılabileceği anlamına

gelmektedir. Ancak literatürde tanımlanmış olan ve bu amaçla rutin kullanımda olan bir miRNA'da halihazırda bulunmamaktadır.

Liu Y ve ark. yaptığı çalışmada ratlarda akut miyokard infarktüsü (AMI) modelleri oluşturdu. Çalışma grupları AMI grubu, sham grubu ve normal grup (her grupta N = 10) şeklinde 3 gruba ayrıldı. MiR-29b mimikleri, inhibitörleri, mimik negatif kontrolü (NC), H9c2 (2-1) hücrelerine transfekte edildi. Daha sonra hücreler, bir mimik grubuna, inhibitör grubuna, NC grubuna ve blank gruba bölündü. MiR-29b, NOTCH1, DII4 ve Hes1'in ekspresyon seviyeleri, qRT-PCR ile tespit edildi. Normal ve sham gruplar ile karşılaştırıldığında miR-29b ekspresyonu down regüle edilirken, NOTCH1, DII4 ve Hes1 ekspresyonu artmıştır (p <0.05). NC ve blank gruplarla karşılaştırıldığında NOTCH1, DII4, Hes1 ve NICD1'in ekspresyonu mimik grubunda (p <0.05) up regüle olurken inhibitör grubunda ekspresyonu azalmıştır (p <0.05) (71). Bizim sonuçlarımızda bu çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Ayrıca yukarıdaki paragrafta söz edilen biyobelirteç olma durumu hakkındaki yorumun isabetliliği de Liu Y ve ark tarafından yapılan bu çalışma ile bir kez daha irdelenmiştir.

Sonuç olarak tüm bu çalışmalar FT'nin NOTCH sinyal yolağı ile ilişkisini doğrulamaktadır. Çalışmaların çoğunda FT'li çocuklardaki dokuların, sağlıklı kontrol grubuyla kıyasla ekspresyonunda anlamlı şekilde kat değişimi olduğu görülmektedir. Bu ekspresyon çalışmalarında anlamlılık gösteren aday genler, özellikle kalbin gelişiminde önemli olduğu bilinen NOTCH sinyal yolağı ile ilişkilendirilmiştir. Embriyonik kalp gelişimini düzenleyen genetik mekanizmaların aydınlatılması doğumsal kalp hastalıklarının tanı ve tedavisi açısından önemli gelişmelere katkıda bulunmaktadır.



## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda Fallot Tetralojili hastaların NOTCH sinyal yolağı ile ilişkisini belirlemek amacıyla bu yolda yer alan hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen NOTCH1, NOTCH2 genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Sonuçlar bu genlerde, hasta grubun kontrol grubuyla kıyasla anlamlı bir ekspresyon farklılığı olduğunu göstermiştir. NOTCH1 ve NOTCH2 genlerinin hastalarda kontrol grubuna göre 2 kat ekspresyon artışı tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuç, özellikle kalbin gelişimi ve farklılaşmasında önemli hücre etkileşim mekanizması olan NOTCH sinyal yolağı elemanlarının, Fallot Tetralojili hastalarla ilişkisini doğrulamaktadır. Sağ ventrikül çıkış yolu gelişimi sırasında NOTCH sinyalinin artmasının hem yastıkta hem de miyokard yapılarında anormal bir gelişmeye yol açabileceği ve bunun sonucu olarak Fallot Tetralojisinin görülebileceği savını destekler niteliktedir. Bu sebeple bu yolda yer alan genlerin tespiti kardiyak gelişimi için önemli olan hücresel süreçler ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması açısından önemlidir.

Fallot Tetralojili hastalarda erken tanı ve tedavi, konjenital kalp hastalıklarına bağlı morbidite ve mortalite oranının azaltılması açısından önemlidir.

Fallot Tetralojisi hastalık oluşumu ve prognozu ile ilgili yollarda yer alan genlerin etkileşimlerinin ortaya konması yeni nesil tedavi olanaklarının daha kısa sürede ve hedefe yönelik olarak uygulanabilmesine imkan sağlamaktadır. Bu anlamda NOTCH sinyal iletim yolağında yer alan bu genlerin ekspresyon düzeyleri Fallot Tetralojisinin hem etiolojisi hem prognoza yönelik moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yol gösterici olabilir.



## KAYNAKLAR

1. Erbay RK. Konjenital kalp hastalığı olan çocuklarda malnütrisyon sıklığı ve etkileyen faktörler. Tıpta Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD., 2018.
2. Akpınar A. Konjenital kalp hastalıklarında GATA4, NKX2-5, TBX5, CRELD1 ve BMP4 gen bölgelerinin MLPA yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD., 2014.
3. Ulusoy S. Siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan çocuklarda hemostatik değişiklikler. Uzmanlık tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, 2008.
4. Liu L, Wang HD, Cui CY, Qin YY, Fan TB, Peng BT et al. Whole exome sequencing identifies novel mutation in eight Chinese children with isolated tetralogy of Fallot. *Oncotarget*. 2017 Oct 31;8(63):106976-106988. doi:10.18632/oncotarget.22202. eCollection 2017 Dec 5. PubMed PMID: 29291004; PubMed Central PMCID: PMC5739789.
5. Page DJ, Miossec MJ, Williams SG, Monaghan RM, Fotiou E, Cordell HJ et al. Whole Exome Sequencing Reveals the Major Genetic Contributors to Nonsyndromic Tetralogy of Fallot. *Circ Res*. 2019 Feb15;124(4):553-563. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313250. PubMed PMID: 30582441; PubMed Central PMCID: PMC6377791.
6. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. NOTCH signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Jun;23(4):450-7. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.010. Epub 2012 Jan 28. Review. PubMed PMID: 22306179; PubMed Central PMCID: PMC3638987.
7. Lara DA, Lopez KN. Public health research in congenital heart disease. *Congenital Heart Dis*. 2014 Nov-Dec;9(6):549-58. doi: 10.1111/chd.12235. Epub 2014 Nov 7. Review. PubMed PMID: 25377072.
8. Kaçmaz T. Konjenital kalp hastalığı tanısıyla izlenen olguların nörogelişim açısından değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, 2018.
9. Rohit M, Shrivastava S. Acyanotic and Cyanotic Congenital Heart Diseases. *Indian J Pediatr*. 2018 Jun;85(6):454-460. doi: 10.1007/s12098-017-2454-6. Epub 2017 Sep 30. Review. PubMed PMID: 28963608.
10. Sigma Aldrich. Transcriptor high fidelity cdna synthesis. Erişim: 4 Eylül 2019. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/roche/general\\_information/1/transcriptor-high-fidelity-cdna-synthesis-kit.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/roche/general_information/1/transcriptor-high-fidelity-cdna-synthesis-kit.pdf)
11. Bittel DC, Butler MG, Kibiryeveva N, Marshall JA, Chen J, Lofland GK, O'Brien JE Jr. Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects. *BMC Med Genomics*. 2011 Jan 5; 4:1. doi: 10.1186/1755-8794-4-1. PubMed PMID: 21208432; PubMed Central PMCID: PMC3023653
12. Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR et al. Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat Genet*. 2017 Nov;49(11):1593-1601. doi:10.1038/ng.3970. Epub 2017 Oct 9. PubMed PMID: 28991257; PubMed Central PMCID: PMC5675000.

13. Richards AA, Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010 May;6(2):91-7. doi: 10.2174/157340310791162703. PubMed PMID: 21532774; PubMed Central PMCID: PMC2892081.
14. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy MK, Li N, Keavney BD. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol.* 2019 Feb 19. pii: dyz009. doi:10.1093/ije/dyz009. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30783674; PubMed Central PMCID: PMC6469300.
15. Kula S, Çevik A, Olguntürk FT, Tunaoglu FS, Oğuz AD, İlhan MN. Distribution of congenital heart disease in Turkey. *Turk J Med Sci.* 2011; 41 (5): 889-893. doi:10.3906/sag-1001-6
16. Starr JP. Tetralogy of fallot: yesterday and today. *World J Surg.* 2010 Apr;34(4):658-68. doi: 10.1007/s00268-009-0296-8. Review. PubMed PMID: 20091166.
17. Evans WN. "Tetralogy of Fallot" and Etienne-Louis Arthur Fallot. *Pediatr Cardiol.* 2008 May;29(3):637-40. doi: 10.1007/s00246-007-9186-8. Epub 2008 Jan 1. Pub Med PMID: 18167015.
18. Liu L, Wang HD, Cui CY, Qin YY, Fan TB, Peng BT et al. Whole exome sequencing identifies novel mutation in eight Chinese children with isolated tetralogy of Fallot. *Oncotarget.* 2017 Oct 31;8(63):106976-106988. doi:10.18632/oncotarget.22202. eCollection 2017 Dec 5. PubMed PMID: 29291004; PubMed Central PMCID: PMC5739789.
19. Aguayo-Gómez A, Arteaga-Vázquez J, Svyryd Y, Calderón-Colmenero J, Zamora-González C, Vargas-Alarcón G, Mutchinick OM. Identification of Copy Number Variations in Isolated Tetralogy of Fallot. *Pediatr Cardiol.* 2015 Dec;36(8):1642-6. doi: 10.1007/s00246-015-1210-9. Epub 2015 Jun 3. PubMed PMID:26036351.
20. Grunert M, Dorn C, Schueler M, Dunkel I, Schlesinger J, Mebus S et al. Rare and private variations in neural crest, apoptosis and sarcomere genes define the polygenic background of isolated Tetralogy of Fallot. *Hum Mol Genet.* 2014 Jun 15;23(12):3115-28. doi: 10.1093/hmg/ddu021. Epub 2014 Jan 23. PubMed PMID: 24459294.
21. Ali N, MS, PA-C. Tetralogy of Fallot. *Journal of the American Academy of PAs:* 2015 June. doi: 10.1097/01.JAA.0000462058.86000.b6
22. Kola S, Koneti NR, Golla JP, Akka J, Gundimeda SD, Mundluru HP. Mutational analysis of JAG1 gene in non-syndromic tetralogy of Fallot children. *Clin Chim Acta.* 2011 Nov 20;412(23-24):2232-6. doi: 10.1016/j.cca.2011.08.017. Epub 2011 Aug 27. PubMed PMID: 21893051.
23. Morgenthau A, Frishman WH. Genetic Origins of Tetralogy of Fallot. *Cardiol Rev.* 2018 Mar/Apr;26(2):86-92. doi: 10.1097/CRD.000000000000170. Review. PubMed PMID: 29045289.
24. Villafañe J, Feinstein JA, Jenkins KJ, Vincent RN, Walsh EP, Dubin AM et al. Adult Congenital and Pediatric Cardiology Section, American College of Cardiology. Hot topics in tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Dec10;62(23):2155-66. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.100. Epub 2013 Sep 27. PubMed PMID: 24076489.
25. Jernigan EG, Strassle PD, Stebbins RC, Meyer RE, Nelson JS. Effect of Concomitant Birth Defects and Genetic Anomalies on Infant Mortality in Tetralogy of Fallot. *Birth Defects Res.* 2017 Aug 15;109(14):1154-1165. doi:10.1002/bdr2.1057. Epub 2017 Jun 19. PubMed PMID: 28627098.
26. Page DJ, Miossec MJ, Williams SG, Monaghan RM, Fotiou E, Cordell HJ et al. Whole Exome Sequencing Reveals the Major Genetic Contributors to Nonsyndromic Tetralogy of Fallot. *Circ Res.*

- 2019 Feb15;124(4):553-563. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313250. PubMed PMID: 30582441; PubMed Central PMCID: PMC6377791.
27. Apitz C, Webb GD, Redington AN. Tetralogy of Fallot. *Lancet*. 2009 Oct 24;374(9699):1462-71. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60657-7. Epub 2009 Aug 14. Review. PubMed PMID: 19683809.
  28. Patricia O'Brien, MSN, CPNP-AC; Audrey C. Marshall, MD. Tetralogy of Fallot. *Circulation Cardiology Patient Page*.2014;130: e26-e29. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005547
  29. Özdem T. Fallot tetralojisinde sağ ventrikül çıkım yolu tamir yöntemlerinin ventrikül fonksiyonu üzerine etkileri. Uzmanlık tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi AD., 2015.
  30. Nollert G, Fischlein T, Bouterwek S, Böhmer C, Klinner W, Reichart B. Long-term survival in patients with repair of tetralogy of Fallot: 36-year follow-up of 490 survivors of the first year after surgical repair. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Nov 1;30(5):1374-83. PubMed PMID: 9350942.
  31. Di Felice V, Zummo G. Tetralogy of fallot as a model to study cardiac progenitor cell migration and differentiation during heart development. *Trends Cardiovasc Med*. 2009 May;19(4):130-5. doi: 10.1016/j.tcm.2009.07.004. Review. PubMed PMID: 19818949.
  32. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, Koch A, Zink S, Trautmann U et al. Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *J Med Genet*. 2010 May;47(5):321-31. doi: 10.1136/jmg.2009.070391. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19948535.
  33. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet*. 2009 Aug;41(8):931-5. doi: 10.1038/ng.415. Epub 2009 Jul 13. PubMed PMID: 19597493; PubMed Central PMCID: PMC2747103.
  34. Reuter MS, Jobling R, Chaturvedi RR, Manshaei R, Costain G, Heung T et al. Haploinsufficiency of vascular endothelial growth factor related signaling genes is associated with tetralogy of Fallot. *Genet Med*. 2019 Apr;21(4):1001-1007. doi:10.1038/s41436-018-0260-9. Epub 2018 Sep 20. PubMed PMID: 30232381.
  35. Ilagan MX, Kopan R. SnapShot: NOTCH signaling pathway. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1246. PubMed PMID: 17382890.
  36. Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB. Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene*. 2016 Jan 15;576(1 Pt 3):381-4. doi:10.1016/j.gene.2015.10.065. Epub 2015 Nov 6. Review. PubMed PMID: 26548814; PubMed Central PMCID: PMC4673022.
  37. Shih IeM, Wang TL. NOTCH signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):1879-82. Review. PubMed PMID: 17332312.
  38. Li L, Tang P, Li S, Qin X, Yang H, Wu C, Liu Y. NOTCH signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol*. 2017 Sep 16;34(10):180. doi: 10.1007/s12032-017-1039-6. Review. PubMed PMID: 28918490.
  39. Küçükköse C, Identification of novel NOTCH target genes that are mediators of NOTCH in inducing epithelial to mesenchymal transition and migration/invasion. Master of Science, Izmir Institute of Technology, Department of Molecular Biology and Genetics, 2016.
  40. Yağcı E, Güneş Hasan Veysi. NOTCH Sinyal Yolağı ve Karsinogenez. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2017 April, 39(109-116): Doi: 10.20515/otd. 287890



41. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of NOTCH signaling in tumorigenesis. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2223-33. Epub 2005 Nov 15. Review. PubMed PMID: 16291593.
42. Yavropoulou MP, Maladaki A, Yovos JG. The role of NOTCH and Hedgehog signaling pathways in pituitary development and pathogenesis of pituitary adenomas. *Hormones (Athens)*. 2015 Jan-Mar;14(1):5-18. Review. PubMed PMID: 25885100.
43. ENSEMBL. Erişim: 11 Eylül 2019. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000148400;r=9:136494433-136546048](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000148400;r=9:136494433-136546048)
44. ENSEMBL. Erişim: 11 Eylül 2019. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000134250;r=1:119911553-120100779](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000134250;r=1:119911553-120100779)
45. High FA, Epstein JA. The multifaceted role of NOTCH in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet*. 2008 Jan;9(1):49-61. Review. PubMed PMID: 18071321.
46. Borggreffe T, Oswald F. The NOTCH signaling pathway: transcriptional regulation at NOTCH target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2009 May;66(10):1631-46. doi:10.1007/s00018-009-8668-7. Review. PubMed PMID: 19165418.
47. Wang J, Xie X, Zhou S, Huang G, Ma X, Suo P et al. The study of copy number variations in the regions of NOTCH1 among Chinese VSD and FT patients. *Int J Cardiol*. 2011 Mar 17;147(3):444-6. doi:10.1016/j.ijcard.2010.04.029. Epub 2011 Jan 31. PubMed PMID:21277031.
48. MacGrogan D, Luxán G, de la Pompa JL. Genetic and functional genomics approaches targeting the NOTCH pathway in cardiac development and congenital heart disease. *Brief Funct Genomics*. 2014 Jan;13(1):15-27. doi:10.1093/bfgp/elt036. Epub 2013 Oct 7. Review. PubMed PMID: 24106100
49. Preuss C, Capredon M, Wünnemann F, Chetaille P, Prince A, Godard B et al. Family Based Whole Exome Sequencing Reveals the Multifaceted Role of NOTCH Signaling in Congenital Heart Disease. *PLoS Genet*.2016 Oct 19;12(10): e1006335. doi: 10.1371/journal.pgen.1006335. eCollection 2016 Oct. PubMed PMID: 27760138; PubMed Central PMCID: PMC5070860.
50. Kerstjens-Frederikse WS, van de Laar IM, Vos YJ, Verhagen JM, Berger RM, Lichtenbelt KD et al. Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families. *Genet Med*. 2016 Sep;18(9):914-23. doi: 10.1038/gim.2015.193. Epub 2016 Jan 28. PubMed PMID: 26820064.
51. QIAGEN. Erişim: 11 Eylül 2019. <https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
52. BİOTEK. Erişim: 17 Eylül 2019. [https://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/Nucleic\\_Acid\\_Quant\\_Application\\_Guide.pdf](https://www.biotek.com/assets/tech_resources/Nucleic_Acid_Quant_Application_Guide.pdf)
53. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. Epub 2006 Feb 3. Review. PubMed PMID: 16460794.
54. Caister Academic Press. Erişim: 17 Eylül 2019. <https://www.caister.com/highveld/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>

55. Clementz AG, Rogowski A, Pandya K, Miele L, Osipo C. NOTCH-1 and NOTCH-4 are novel gene targets of PEA3 in breast cancer: novel therapeutic implications. *Breast Cancer Res.* 2011 Jun 14;13(3):R63. doi: 10.1186/bcr2900. PubMed PMID:21679465; PubMed Central PMCID: PMC3218952.
56. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels. *Thorax.* 2002 Sep;57(9):765-70. PubMed PMID: 12200519; PubMed Central PMCID: PMC1746418.
57. QIAGEN. Erişim: 17 Eylül 2019. <https://dataanalysis.qiagen.com/pcr/arrayanalysis>.
58. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 1999 May 15;270(1):41-9. PubMed PMID: 10328763.
59. BioGPS. Erişim: 18 Eylül 2019. <http://www.biogps.org/#goto=genereport&id=4851>
60. GTExPortal. Erişim:18 Eylül 2019. <https://www.gtexportal.org/home/gene/NOTCH1>
61. Kaynak B, von Heydebreck A, Mebus S, Seelow D, Hennig S, Vogel J et al. Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation.*2003 May 20;107(19):2467-74. Epub 2003 May 12. PubMed PMID: 12742993.
62. Sharma HS, Peters TH, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Bogers AJ. DNA microarray analysis for human congenital heart disease. *Cell Biochem Biophys.*2006;44(1):1-9. PubMed PMID: 16456230.
63. O'Brien JE Jr, Kibiryeveva N, Zhou XG, Marshall JA, Lofland GK, Artman M et al. Noncoding RNA expression in myocardium from infants with tetralogy of Fallot. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012 Jun;5(3):279-86. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.961474. Epub 2012 Apr 23. PubMed PMID: 22528145.
64. Bittel DC, Kibiryeveva N, Marshall JA, O'Brien JE. MicroRNA-421 Dysregulation is Associated with Tetralogy of Fallot. *Cells.* 2014 Jul 11;3(3):713-23. doi:10.3390/cells3030713. PubMed PMID: 25257024; PubMed Central PMCID: PMC4197626.
65. Bittel DC, Zhou XG, Kibiryeveva N, Fiedler S, O'Brien JE Jr, Marshall J et al. Ultra high-resolution gene centric genomic structural analysis of a non-syndromic congenital heart defect, Tetralogy of Fallot. *PLoS One.* 2014 Jan 31;9(1): e87472. doi: 10.1371/journal.pone.0087472. eCollection 2014. Erratum in: *PLoS One.* 2014;9(5): e99148. PubMed PMID: 24498113; PubMed Central PMCID: PMC3909147.
66. Southgate L, Sukalo M, Karountzos ASV, Taylor EJ, Collinson CS, Ruddy D et al. Haploinsufficiency of the NOTCH1 Receptor as a Cause of Adams-Oliver Syndrome With Variable Cardiac Anomalies. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015 Aug;8(4): 572-581.doi: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001086. Epub 2015 May 11. PubMed PMID: 25963545; PubMed Central PMCID: PMC4545518.
67. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J et.al NOTCH promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 2004 Jan 1;18(1):99-115. Epub 2003 Dec 30. PubMed PMID: 14701881; PubMed Central PMCID: PMC314285.
68. Lai CTM, Ng EKO, Chow PC, Kwong A, Cheung YF. Circulating MicroRNA in patients with repaired tetralogy of Fallot. *Eur J Clin Invest.* 2017 Aug;47(8): 574-582.doi: 10.1111/eci.12778. Epub 2017 Jul 18. PubMed PMID: 28664568.

69. Abu-Halima M, Meese E, Keller A, Abdul-Khaliq H, Rädle-Hurst T. Analysis of circulating microRNAs in patients with repaired Tetralogy of Fallot with and without heart failure. *J Transl Med.* 2017 Jul 10;15(1):156. doi:10.1186/s12967-017-1255-z. PubMed PMID: 28693530; PubMed Central PMCID: PMC5504636.
70. Wu KH, Xiao QR, Yang Y, Xu JL, Zhang F, Liu CM, Zhang ZM, Lu YQ, Huang NP. MicroRNA-34a modulates the Notch signaling pathway in mice with congenital heart disease and its role in heart development. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Jan; 114:300-308. doi:10.1016/j. yjmcc.2017.11.015. Epub 2017 Nov 22. PubMed PMID:29175286.
71. Liu Y, Wang H, Wang X, Xie G. MiR-29b Inhibits Ventricular Remodeling By Activating Notch Signaling Pathway in the Rat Myocardial Infarction Model. *Heart Surg Forum.* 2019 Jan 28;22(1): E019-E023. doi: 10.1532/hsf.2079. PubMed PMID:30802192



# EK 1

## ETİK KURUL KARARI

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Fallot Tetralojisinin Notch Sinyal Yolu ile ilişkisinin Araştırılması							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		65							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *	İmza	
Prof.Dr. Hasan Sunar	Kardiyovasküler cerrahisi	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Cevat Karma	Kardiyoloji	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Selçuk Palu	Kardiyoloji	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Biröl Özkan	Kardiyoloji	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ramazan Kargın	Kardiyoloji	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. M. Yunus Emiroğlu	Kardiyoloji	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Mehmet Yanartaş	Kardiyovasküler cerrahisi	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Mustafa Duman	Gastroenteroloji Cerrahisi	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Uğur Arslantaş	Kardiyoloji	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Şule Rabuş	Farmakoloji	Marmara E.A.H.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Sebahat Dilek TORUN	Halk Sağlığı Uzmanı	Tuzla Halk Sağlığı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Avukat Alparslan Kovancı	Hukuk	Kartal Koşuyolu Y.I.E.A.H.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Mühendis Hamdi Armağan	Biyomedikal mühendisi	Kuzey Bölgesi Genel Sekreterliği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Avukat Bedrettin İskender	Vatandaş	Kurum Dışı/ Serbest	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hasan SUNAR  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

## EK 2

### ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ | 07.09.2015 Versiyon no:1|

- 1) Davet edildiğiniz çalışma “ Fallot Tetralojisinin Notch Sinyal Yolağı ile İlişkinin Araştırılması” başlıklı akademik amaçlı bir tez çalışmasıdır. Bu çalışmada Fallot Tetralojisi hastalığı bulunan bireylerde genetik değişiklikler araştırılacaktır. Alınan sonuçlarla hastalığın ileride yapılacak olan tanı ve tedavisine yönelik protokollerin oluşturulması mümkün olabilecektir.
- 2) Bu çalışmanın amacı Fallot Tetralojisi tanısı almış hastaların, özellikle kalbin gelişiminde ve farklılaşmasında önemli olduğu bilinen genlerin anlatım farklılığının ortaya konarak hastalığın bilinmeyen yönlerinin aydınlatılmasıdır.
- 3) Araştırmaya dahil olmayı kabul etmeniz durumunda Prof. Dr. Ali Can Hatemi tarafından muayene edilerek, bulgularınız kaydedilecektir ve bu çalışmayı yapabilmek için sizden doku örneği alınacaktır. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse ve izniniz doğrultusunda bu çalışmaya katılabilirsiniz.
- 4) Sizden bir defaya mahsus olmak üzere ameliyat esnasında, zaten rahatsızlığınızın cerrahi tedavisinin bir aşaması olan, kalbinizden akciğere kan taşıyan karıncık içerisinde darlık oluşturan fazla gelişmiş kas dokularının çıkarılması sırasında elde edilen dokulardan bir miktarı ayrılarak, genetik inceleme amacıyla muhafaza edilecektir.
- 5) Bu araştırma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülecektir.
- 6) Araştırmaya katılımınız sizin isteğinize bağlıdır. İsteddiğiniz zaman herhangi bir cezaya ve yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Aynı şekilde, araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.
- 7) Bu araştırmanın size veya ailenize bir yarar getirip getirmeyeceğini söylemek mümkün değildir, size bu konuda söz verilemez.
- 8) Size bu çalışmada herhangi bir ilaç verilmeyecektir.
- 9) Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret talep edilmemektedir. Bunun yanı sıra size de bir ödeme yapılmayacaktır. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumundan (SGK) herhangi bir ücret alınmayacaktır.
- 10) Sizinle ilgili tüm klinik bilgiler ve elde edilecek genetik bilgiler gizli kalacak ve kimseyle paylaşılmayacaktır. Araştırma sonuçlarının yayınlanması sırasında kimlik bilgileriniz kimseyle paylaşılmayacaktır.
- 11) Araştırma konusuyla ilgili ve araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler edinildiğinde siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilecektir. Araştırma hakkında ve araştırmayla ilgili herhangi bir istenmeyen olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceğiniz doktorunuz Prof. Dr. Ali Can Hatemi'ye (Çocuk Kalp Cerrahisi Ekibi) 0216 5001500; dahili 4240 telefon numarasından ulaşabilirsiniz.
- 12) Bu formu imzalamadan önce, kendi haklarınız ile ilgili sorularınız varsa lütfen sorun. Daha sonra bu konularla ilgili sorunuz olursa, ya da herhangi bir yan etki olayı hakkında daha fazla bilgi almak isterseniz proje yürütücüsü Doç. Dr. Ender M. Coşkunpınar ile 0532 240 7157 numaradan irtibata geçebilirsiniz.
- 13) Toplanan örnekler yurt dışına herhangi bir amaçla gönderilmeyecektir.

- 14) Çalışmaya katılmaya karar verirsiniz kimliğinizin gizli kalması koşuluyla bu araştırmadan elde edilecek bilgi ve bulguların istendiğinde ilgili resmi makamlara verilebileceğini ve bilimsel amaçla yayınlanabileceğini kabul etmiş olursunuz.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilirim ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Bu yazının bir kopyası da size verilecektir.

“Fallot Tetralojisinin Notch Sinyal Yolu ile İlişkinin Araştırılması” isimli çalışma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin:

- Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.  
 İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.  
 Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllünün  
Adı ve Soyadı:  
İmzası:  
Tarih:  
Tel:

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık olan  
kişinin  
Adı ve Soyadı:  
İmzası:  
Tarih:  
Tel:

Araştırmacı  
Adı ve Soyadı:  
İmzası:  
Tarih:

Gerekliyse Yasal Temsilcinin  
Adı ve Soyadı:  
İmzası:  
Tarih:  
Tel:

## EK 3

### OLGU RAPOR FORMU (ORF)

**HASTA ADI VE SOYADI:**

**TC.KİMLİK NO:**

**YAŞ:**

**CİNSİYET:** E  K

**BOY VE KİLO:** .....cm, .....kg

**ÖRNEK ALINMA TARİHİ:**

**TELEFON NO:**

**HASTA ANNE/BABA İSMİ:**

**ADRES:**

**DOĞUM YERİ:**

**ŞİKAYETİ:**

**İLAÇ KULLANIMI:**

**EŞLİK EDEN HASTALIKLAR:**

**DAHA ÖNCE GEÇİRDİĞİ AMELİYATLAR:**

**TTE Raporu:**

**Angiografi Raporu:**

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

<b>Adı</b>	Syerikgul	<b>Soyadı</b>	BOLAT
<b>Doğum Yeri</b>	Moğolistan	<b>Doğum Tarihi</b>	20.11.1992
<b>Uyruğu</b>	Kazak	<b>Medeni hali</b>	Evli
<b>Email</b>	<a href="mailto:sekagul88@gmail.com">sekagul88@gmail.com</a>	<b>Tel</b>	05549997282
<b>Adres</b>	Esentepe mahallesi, Feza sokak, Şişli/İST	<b>Sigara kullanımı</b>	Yok

## EĞİTİM DÜZEYİ

	<b>Okuduğu Kurumun Adı, Bölümü</b>	<b>Tarih</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD	2019
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
<b>Ön Lisans</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi Dil Eğitimi Uygulama ve Araştırma Merkezi, Türkçe Kursu	2011
<b>Lise</b>	Bastama Lisesi	2010

## İŞ DENEYİMİ

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Ay)</b>
Stajyer öğrenci	İstanbul Üniversitesi, İTF (Çapa) Hematoloji AD	1
Stajyer öğrenci	İstanbul Üniversitesi, İTF (Çapa) Tıbbi Genetik AD	1



**KATILDIĞI KONGRE VE SEMİNERLER**

Kongre, Seminer Adı	Kurum	Yıl	Süre (gün)
İUGEN Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu	İstanbul Üniversitesi	2015	3
NLP ile Liderlik ve Zaman Yönetimi Eğitim Programı	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	2016	1
Bioform 4	Yıldız Teknik Üniversitesi Genetik Kulübü	2016	3
Biyobilim Günleri	Yıldız Teknik Üniversitesi KUMTEK Kulübü	2016	2
İnternational Cofactor Life Sciences (Neuroscience and Aging) Congress	İstanbul Üniversitesi	2016	3
Personalized Medicine	Maltepe Üniversitesi	2017	1
LigthCycler 480 cihaz eğitimi	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018	1
MR Görüntülerinde Beyin Parelasyonları Yaparak Hacim Hesaplama	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018	2
MedicRes Good Medical Researcher Online program	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018	4 ay
Western Blot ve Hücre Analizi	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018	3
NGS Tanıtım	İncekaralar	2018	1
Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	2018	7
Sinirbilim Okulu	İstanbul Üniversitesi Biyolojik Bilimler Kulübü	2018	1

**YABANCI DİLLER**

Diller	Okuma	Yazma	Konuşma
İngilizce	iyi	iyi	iyi
Rusça	orta	orta	orta

Yökdil Puanı (YDS)	68.75
--------------------	-------

