

**SENDROMSUZ DUDAK-DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA
MSX1 GEN (G267C) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

Erya ESMER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA

ARALIK 2011

Erva ESMER tarafından hazırlanan “SENDROMSUZ DUDAK-DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA MSX1 GEN (G267C) POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN

.....

Tez Danıőmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu alıőma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Arzu KOKAYA

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G..

Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G..

Doç. Dr. Selami CANDAN

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G..

Tarih 27 /12 /2011

Bu tez ile G.. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıőtir.

Prof. Bilal TOKLU

.....

Gazi Fen bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Erva ESMER

**SENDROMSUZ DUDAK-DAMAK YARIKLI TÜRK HASTALARDA MSX1
GEN (G267C) POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Erva ESMER

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ARALIK 2011**

ÖZET

Sendromsuz yarık dudak/damak (CL/P) malformasyonu en yaygın doğumsal defektlerden biridir. Hastalığın oluşumunda çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu literatürde mevcuttur. Daha önceki çalışmalar, MSX1 geni mutasyonlarının sendromsuz dudak ve/veya damak yarığının oluşumuna katkı sağladığını göstermektedir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, sendromsuz dudak damak yarığının ortaya çıkmasında aday gen olan MSX1 geninin G267C bölgesinin bazı mutasyon analizleri yapılarak, incelenen genin hastalığın oluşumu üzerindeki riskte etkili olup olmadığının ortaya konulması ve daha sonra yapılacak araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır. Bu araştırmada kullanılacak olan kan örnekleri, Ankara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi'ne başvuran sendromsuz dudak damak yarıklı Türk hastalardan elde edilmiştir. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri, Fenol kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu yapılarak, PCR metodu uygulanmıştır. Elde edilen ürünlere RFLP metodu uygulanarak mutasyonlar belirlenmiş ve gen ürünlerinin kesimi gerçekleştirilmiştir. Enzim ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi yapılarak jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir. Sonuç olarak, MSX1 geninin G267C bölgesinde 4 heterozigot bölge belirlenmiştir. Bu bulgular, MSX1 geninin G267C değişiminin sendromsuz dudak damak yarığındaki rolünü Türk populasyonunda desteklemektedir.

Bilim Kodu : 203
Anahtar kelimeler : Yarık dudak, yarık damak, sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı, MSX1 geni, mutasyon, polimorfizm
Sayfa adedi : 76
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN

**MSX1 GENE (G267C) POLIMORPHISM OF THE PATIENTS WITH
NONSENDROMIC CLEFT LIP AND PALATE IN TURKISH POPULATION
(M. Sc. Thesis)**

Erva ESMER

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
DECEMBER 2011**

ABSTRACT

Non-syndromic cleft lip/palate (CL/P) malformation is one of the common congenital defects. Environmental and genetic factors in the formation of the disease is available in the literature. Previous studies of mutations in the MSX1 gene non-syndromic cleft lip and/or palate has contributed to the formation. In this master's thesis, the candidate gene MSX1 gene G267C region, were analyzed for its association with the non-syndromic cleft lip and/or palate malformation. The blood samples used in this study, admitted to, Ankara University, Faculty of Dentistry non-syndromic cleft lip and/or palate were obtained from Turkish patients. Peripheral blood samples from patients, phenol chloroform method was applied for genomic DNA isolation and PCR metod was enforced. After then, RFLP metod applied to the resulting products, mutations determined, gene products was cut with restrinction enzymes. Enzyme products were photographed by performing agaroz gel electroforesis. As a result, 4 heterozygous region were determined in G267C region of the MSX1 gene. This findings, support the role of G267C convention in the MSX1 gene to non-syndromic cleft lip and/or palate in Turkish population.

Science Code : 203

**Keywords : Cleft lip, cleft palate, nonsyndromic cleft lip and/or palate,
polymorphism, MSX1 gene, mutation**

Page Number : 76

Adviser : Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince ve bu tezin oluşturulmasında çok büyük emekleri olan, eğitimim süresince bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, titiz, disiplinli ve yenilikçi çalışmalarından dolayı yanında çalışmaktan onur duyduğum, hiç bir zaman sabır, özveri, destek ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, hayatım boyunca saygı ve sevgiyle anacağım, Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı hocalarından, değerli hocam, Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN'a,

Çalışmalarım sırasında bana destek olan ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve değerli çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek lisans tez çalışmamdaki, istatistiksel değerlendirmelerdeki katkılarından dolayı, Zeynep BIYIKLI'ya,

Her zaman olduğu gibi Yüksek Lisans eğitimim boyunca da yanımda olan, beni destekleyen ve yüreklendiren sevgili annem, Neşe Akkoyun, sevgili teyzem, Mine Akkoyun ve kardeşim, Mert Esmer'e,

Sabrı ve özverisi ile daima yanımda olan, biricik arkadaşlarım, Ahmet Volkan Başaran ve Belkıs Pınar Başaran'a sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Tanım ve Terminoloji.....	4
2.2 Embriyoloji.....	5
2.3 Sınıflandırma.....	6
2.3.1 Yarık dudak.....	10
2.3.2 Yarık damak.....	11
2.4 Teşhis.....	12
2.5 Tedavi.....	13
2.6 Epidemiyoloji.....	15
2.7 Etiyoloji.....	17
2.7.1 Çevresel faktörler.....	18
2.7.2 Genetik faktörler.....	20

Sayfa

2.8 Hastalığı Etkileyen Genler.....	22
2.9 MSX1 Geni.....	25
2.10 MSX1 Geni (G267C) Bölgesi.....	31
3. MATERYAL METOD.....	33
3.1 Materyal.....	33
3.2 Metod.....	33
3.2.1. Fenol-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu.....	33
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PCR).....	35
3.2.3. Restriksiyon endonükleazla kesim.....	37
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	37
3.2.5. İstatiksel analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
5. SONUÇ.....	43
5.1 İstatiksel Analiz.....	44
6. TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Hastalığın bazı ülkelerde görülme oranları.....	16
Çizelge 2.2. Yapılan çalışmalarda ülkelerdeki vakaların dudak ve/veya damak yarığı olarak sınıflandırılması.....	16
Çizelge 2.3. Deformitenin risk gruplarında görülme sıklığı.....	22
Çizelge 2.4. Dudak-damak yarığında etkili olan aday genler.....	23
Çizelge 2.5. Dudak damak yarığını etkilediği düşünülen aday genler.....	24
Çizelge 2.6. Bazı ülkelerde yapılan MSX1 gen değişimi çalışmaları sonuçlarında bulunan p değerleri.....	26
Çizelge 3.1. MSX1 mutasyon analizleri için oligonükleotitler ve PCR koşulları.....	37
Çizelge 5.1 Hasta ve kontrol gruplarında heterozigot ve homozigot olguların dağılımı.....	43
Çizelge 5.2. Sendromsuz dudak damak yarıklı 70 Türk hastada bulunan G267C gen değişimi.....	44
Çizelge 5.3. Hasta ve kontrol gruplarında gözlemlenen heterozigot ve homozigot olguların yüzde oranının istatistiksel tablosu.....	45
Çizelge 5.4. Pearson kıkare testi sonuçları.....	45
Çizelge 5.5. Pearson kıkare testi anlamlılık.....	45
Çizelge 5.6. Hardy Weinberg testi sonuç.....	46

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Dudak-damak yarıklarının sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.2. Hastalığı oluşturan etmenlerin sınıflandırılması.....	18
Şekil 2.3. Hastalığı oluşturan etmenlerin yüzde oranları.....	18
Şekil 2.4. Dudak-damak yarığının oluşmasına neden olan çevresel faktörler.....	19
Şekil 2.5. MSX1 geninin sitogenetik yeri.....	28
Şekil 4.1. G267C bölgesinin MSX1 geni içerisindeki lokalitesi.....	41
Şekil 4.2. DdeI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri.....	41
Şekil 4.3 Restriksiyon endonükleazla kesim sonrasında beklenen tablo.....	42
Şekil 5.1 Hasta ve kontrol gruplarında heterozigot ve homozigot olguların grafikte gösterilmesi.....	43
Şekil 5.2. Hastalığın yüzde oranı.....	44

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 1.1 Sert Damak-yumuşak damak.....	2
Resim 2.1. Yarık dudak-damak görüntüsü.....	4
Resim 2.2. Kernehan'ın Y skalası.....	7
Resim 2.3. Kernehan'ın Y skalasına göre bölgelerin ayrıntılı gösterilişi.....	8
Resim 2.4. Kernehan'ın Y skalasının ağız üzerinde gösterimi.....	8
Resim 2.5. Kernehan'ın Y skalasına göre dudak ve damak yarıklarının oluşumu.....	9
Resim 2.6. Yarık dudak çeşitleri.....	11
Resim 2.7. Yarık damak çeşitleri.....	12
Resim 2.8. Üç boyutlu ultrasonda tespit edilmiş dudak-damak yarığı ok ile gösterilmiştir.....	13
Resim 2.9. Altı aylık bir kız bebeğin düzeltme operasyonundan önceki durumu.....	13
Resim 2.10. Aynı kızın operasyondan bir ay sonraki durumu.....	13
Resim 2.11. Aynı kızın dört buçuk yaşındaki durumu. Operasyondan sonra yara izinin yaş ilerledikçe belirginliğini kaybettiği gözlemleniyor.....	14
Resim 2.12. Aynı kızın 8 yaşındaki hali. Yara izi hemen hemen kaybolmuş durumda.....	14
Resim 2.13. Msh homeobox 1.....	26
Resim 2.14. MSX1 geni.....	27
Resim 2.15. MSX1 gen özellikleri.....	27
Resim 2.16. Sinyal moleküllerinin damak gelişimindeki rolü.....	30
Resim 3.1. İzole edilen DNA.....	35
Resim 3.2. PCR süreci.....	36
Resim 3.3 .Agaroz jel elektroforezi.....	38
Resim 3.4. UV transilluminatör ile jel görüntüleme.....	39
Resim 4.1 DNA izolasyonu sonrası PCR'la çoğaltılan gen ürünlerinin jel görüntüsü.....	40

Resim	Sayfa
Resim 4.2. Restiriksiyon endonükleazlarla kesim sonrası oluşan ürünlerin jel görüntüsü.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
AHR	Aryl-hydrocarbon receptor
ALK5	Activin receptor-like kinaz 5
BMP4	Bone morphogenic protein 4
BZD'S	Benzodiazepines
CL	Yarık dudak
CL/P	Yarık dudak ve/veya damak
CP	Yarık damak
CPI	Yarık damak izole
CPO	Sadece yarık damak
dNTP	Nükleotid karışımı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GABRB3	γ -ami-nobutyric acid receptor subunit β 3
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MSX1	Muscle segment homeobox 1
NSCLP	Nonsendromik (sendromsuz) dudak-damak yarığı
OFC	Yarık dudak-damak
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi

Kısaltmalar	Açıklama
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTC	Patched homolog 1
PVRL1	Paliovirüs receptor-releated1
RBC	Red blood cell (kırmızı kan hücresi)
RE	Restriksiyon enzim
RFLP	Restriksiyon enzim uzunluk polimorfizmleri
SATB2	SATB family member 2
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNP	Tek nükleotit değişimi
STE	Sodyum Chloride-Tris-EDTA buffer
TBE	Tris-borate-acid buffer
TBP	TATA bağlayıcı protein
TE	Tris- EDTA buffer
TBX22	T-box 22
TGFα	Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü beta
YD	Yarık dudak
YDA	Sadece yarık damak
YDD	Yarık dudak/damak

1. GİRİŞ

Dudak-damak yarığı embriyolojik dönemde çeşitli nedenlerden dolayı bebeğin yüz bölgesindeki yapıların birleşme kusuru nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır [1]. Türkçe’de, halk arasında “tavşan dudaklılık” ya da “kurt ağzı” olarak bilinir. Ağızda bulunan yarıklar, dudak ve/veya damak yarıkları, dünya çapında her canlı doğan 1000 bebekten birini etkileyen, sık rastlanılan, doğumsal kusurlardan birini teşkil etmektedir [2]. Çoğu araştırmacı, CL/CLP/CP (dudak ve/veya damak yarığı) vakalarının %50-70’inin sendromsuz, diğerlerinin ek anomaliler teşkil ettiğini (sendromik) belirtmektedir.

Sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı (OFC/CLP), burun ve ağız boşluğunun herhangi bir diğer anomali ile ilişkili olmadan, tam olarak ayrılmaması ile karakterize edilir. Sendromik ve sendromsuz OFC ayrımı, son noktada tanımlanır. [3]. Hem dudak ve/veya damak yarığı hem sadece damak yarığı (CPO) karakteristik ve genetik karmaşık özellikleriyle yaygın doğum kusurlarındandır. CL/P ve CPO ayrımı ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalar, %25-35 CL/P %10-20’nin CPO hastasının yarıklılıkla aile öyküsü ve mendelyan kalıtım modelini kanıtlamak için yetersiz kalmaktadır [4, 5, 6]. Embriyolojik olarak iki kategori birbirinden farklı olsa da, hem CL/P hem CPO vakalarının erken embriyolojik evrede oluşumu aynı belirleyicilerden etkilenmektedir [7]. Dahası, Hollandalı ailelerde yapılan çok aşamalı MSX1 dizi analizleri, CL/P ve CPO hastalarında ekzon 1’de anlamsız (nonsense) mutasyonlar olduğunu göstermiştir [8]. Bu nedenle orofasiyal yarıklarda potansiyel ilişkiler incelenirken, CL/P ve CPO aynı duyarlılık lokuslarda değerlendirilmiştir [9].

Ağızdaki yarıklar, özellikle dudak ve/veya damak yarıkları, çok önemli bir halk sağlık problemidir, dünya çapında her 500-1000 doğumun 1’ini etkilemektedir [10]. Bu rakamlar; etnik köken, coğrafik köken, yaşam tarzı ve sosyoekonomik duruma bağlıdır [11]. Bu nedenle birçok araştırma grubu bu hastalığı aydınlatmak için çalışmalar yapmıştır, ancak bugüne kadar sınırlı sayıda araştırma sonuçları ortaya konulmuştur. CL/P fenotipinde ciddi kromozomal anomaliler içeren, Mendelyan sendromlarının bir parçası olabildiği düşünülebilir, bununla birlikte teratojenler bu

riski artırabilir [12]. 200' ün üzerinde yarık dudak ve/veya damak sendromu özellik olarak, ya kromozomal ya da mendelyan nedenselliğini içerdği belirtilmektedir [3].

Ağızda meydana gelen yarıklar anatomik olarak şu şekilde sınıflandırılabilir;

- Sadece ikinci damak (sert ve yumuşak damak), sadece yarık damak olarak isimlendirilir (CPI) (Resim 1.1) ,
- Yarık dudak ve/veya yarık damağı kapsayan birinci damak [13].



Resim 1.1. Sert damak-yumuşak damak

Bu ayırım biyoloji ile alakalı ve embriyolojik gerekçelerle desteklenmektedir. OFC embriyolojik olarak her iki yetmezlikten türetilmiştir;

- 1) Erimiş orta burun ve çene kemiği çıkıntısı (yarık dudak, CL)
- 2) Damak bölmeleri füzyonu (yarık damak, CP)

Bazı hastalarda her ikisi birlikte bulunmaktadır. (CL/P) [14].

OFC doğum kusurları arasında en sık görülenlerden biridir, iki ayrı etiyolojik kategori içerir: 1) Yarık dudak ve /veya damak, 2) Sadece yarık damak [15, 16]. İki kategori embriyolojik olarak ayrılmasına rağmen, hem CL/P hem CPO vakaları içinde olduğu sendromik yarıklılığın bir formu olan aynı aileler (Van der Woude);

bazı aynı belirleyicilerle, bu iki yarıklılığın alt tiplerinin oluşumunun erken embriyonik dönemde etkilendiğini göstermektedir [7].

Uterus içi yaşamda, fetüsün dudak yapısını oluşturan hücrelerin birleşmesi 4 veya 5. haftada, damak yapısını oluşturan hücrelerin birleşmesi ise 8 veya 9. haftada başlamaktadır. 12. haftanın sonunda, fetüsün damak ve dudak dokularının birleşmesi tamamlanmış olur. Birleşmenin tam olarak sağlanamaması durumunda fetüste oral yarıklar meydana gelir [1, 17]. Bazı hastalarda sadece yarık dudak veya yarık damak olmakla birlikte, bazılarında ise hem dudak hem de damak yarığı bir arada bulunabilmektedir.

Oral Yarık tipleri;

- Primer (Ön) damak yarıkları,
- Sekonder (Arka) damak yarıkları,
- Hem primer hem de sekonder damak yarıkları,
- Tek taraflı yarık dudak,
- İki taraflı yarık dudak,
- Medyan yarık dudak,

Oral yarığın ağız boşluğuna uzanan kısmı bazı durumlarda mukoza ile kaplı olabilmekte ve buna sub-mukozal damak yarığı denmektedir [16].

Bu yüksek lisans tez çalışmasında; sendromsuz dudak damak yarığının, Türk hastalarda ortaya çıkmasında; aday olan MSX1 geninin G267C bölgesinin mutasyon analizleri yapılarak, genin dudak damak yarığı oluşumu üzerindeki riskte etkili olup olmadığının ortaya konulması ve daha sonra yapılacak araştırmalara da katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım ve Terminoloji

Yarık dudak-damak, üst çene kemiği ve ağız tavanını oluşturan yumuşak doku ve kemik dokuları oluşturan embriyonik uzantıların yetersiz birleşmesinden ileri gelmektedir (Resim 2.1) [17].



Resim 2.1.Yarık dudak ve yarık damak görüntüsü

Dudak yarıklarına neden olan gelişimsel anomaliler gebeliğin 4-7. haftalarında, damak yarıklarına neden olan gelişimsel anomaliler ise gebeliğin 7-12. haftalarında etkilerini göstermektedirler [18, 19, 20].

Erkek bebeklerde yarık dudak-damak, kız bebeklerin iki katı kadar daha fazla sıklıkta görülmektedir. Buna karşın sekonder damak yarıklarda erkeklerin iki katı kadar sıklıkta görülmektedir. Sol taraftaki tam yarık dudak-damak sağ taraftaki tam yarık dudak-damaktan iki kat daha sık görülmektedir. Ancak bu ikinci durumun nedeni bilinmemektedir [21]. YD/D olgularının %70'i izole, sporadik bozukluk olarak görülürken, %30'unu sendromik olgular oluşturur [22]. Deformitesi olan bebeklerin %21'inde tek başına yarık dudak (YD) (CL), %46'sında YDD (CLP) ve %33'ünde sadece yarık damak (YDA) (CP) görülmektedir [21].

Bu anomali ile doğan bebeklerde erken dönemde görülen (doğumdan sonraki ilk aylar) en büyük problem bu çocukların beslenme zorluğuna bağlı olarak

gelişimlerinin yavaş olması ve sık üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Oldukça sık görülen bu anomali iyi ve düzenli bir multidisipliner ekip yaklaşımıyla tamamen düzeltilebilir ve bu anomali ile doğan çocuklar tamamen normal bir hayat sürdürebilmesi sağlanabilmektedir [23].

2.2. Embriyoloji

Dudak-damak yarıkları ve diğer yüz yarıklarının oluşumunu anlayabilmek için, embriyolojik gelişimin iyi incelenmesi gerekir. Bugünkü bilgilerimiz ışığında dudak-damak yarıklarının embriyolojik yaşamdaki seyri hakkında hala öğrenmemiz gereken pek çok nokta vardır. Günümüzde hayvan embriyoları üzerindeki incelemeler ve yapılan deneyler konunun aydınlatılmasında önemli aşamalar sağlamıştır. Eldeki bilgiler dudak ve/veya damak yarığının embriyolojik gelişiminin ilk 8 haftası içerisinde ortaya çıktığını göstermektedir. Dudak-damak yarıklarındaki embriyolojik olayları incelemeden önce kısaca baş-boyun embriyolojisinin temellerine bir göz atmak yararlıdır.

Embriyoda dokuların ve organların gelişimini sağlayan 3 germinal tabaka vardır. Bunlar ektoderm, mezoderm ve endoderm'dir. Ektoderm epitelial yapılar ve sinir sisteminin gelişiminden sorumlu tabakadır. Bu gelişme süreci nöral katlantı denilen yapının içinde, nöral krest denilen bölgede başlar. Nöral krest hücrelerinin bir kısmı nöral tüpün yan taraflarına göç ederek daha sonra sinir sistemini oluştururlar. Diğer bir kısmı ise mezoderm içine göç ederek daha sonra epitelial yapıları oluştururlar. Bu göç embriyolojik yaşamın yaklaşık 22. gününde gerçekleşir. Göç sırasında ilgili hücrelerde bazı değişiklikler ortaya çıkarak özel dokuların oluşumunun ilk adımı atılır.

Brankial arklar yüz ve farinks gelişimini sağlayan yapılardır. Toplam 6 adet brankial ark bulunmakla birlikte bunlardan 5 ve 6. sı rudimanterdir. Birinci ve ikinci brankial arklar en gelişmiş arklardır. Birincisine mandibuler ark, ikincisine hyoid ark ismi verilir. Mandibuler arktan mandibula, maksilla, malleus ve inkus; hyoid arktan ise hyoid kemiğin gövdesi, stapes ve bazı boyun yapıları gelişir. Brankial arkları

birbirinden ayıran yapılar oyuk şeklindedir. Embriyolojik yaşamın ileri dönemlerinde bu oyuklardan orta kulak, östaki borusu, timpanik membran, dış kulak yolu, tonsiller fossa gibi yapılar gelişir.

Yüz gelişiminin büyük bölümü 4-8. haftalar arasında gerçekleşir ve 10. hafta sonunda anlaşılır bir yüz görünümü ortaya çıkar. Brankial arkların proksimalindeki yüz taslağında, ektodermin her iki yanında kabartılar belirir. Bu kabartılara nazal plakot adı verilir ve bunlardan medial ve lateral nazal çıkıntılar gelişir. İki taraflı medial nazal çıkıntıların ortasında frontonazal çıkıntı belirir. Nazal plakotların hemen altında, mandibuler arkın proksimalinde maksiller çıkıntı belirir. Daha sonra nazal plakotların orta kısmının rezorbsiyonu ile nazal pitler ve burun boşlukları gelişir. Yüz gelişimi sürecinde medial nazal çıkıntı, lateral nazal çıkıntı ve maksiller çıkıntı birleşerek normal burun, üst dudak ve damak yapılarını oluştururlar. Maksiller çıkıntı ile medial nazal çıkıntının birleşmesi sonucu oral ve nazal kaviteler birbirlerinden ayrılırlar. Medial nazal çıkıntının mediale hareketi ile filtrum, Cupit yayı, burun ucu, premaksilla ve nazal septum oluşur. Maksiller çıkıntı ise üst dudağın lateral bölümü ve yanağın üst kısmını oluşturur. Burun kanatları lateral çıkıntıdan gelişirler. Medial nazal çıkıntıların mediale birbirlerine doğru hareketi sırasında bunların arasındaki frontonazal çıkıntı kranial tarafa yönelerek alın ve nazal dorsumu yapar. Mandibuler çıkıntı alt çeneyi, alt dudağı ve yanağın alt bölümünü oluşturur. Yüz çıkıntılarının birleşme yerleri zayıf yerlerdir ve herhangi bir aşamadaki duraklamadan çok çabuk etkilenirler. Bu çıkıntılardaki gelişme veya birleşme yetersizlikleri dudak ve/veya damak yarıkları ile sonuçlanır.

2.3. Sınıflandırma

Dudak ve damak yarığı farklı kişiler tarafından farklı şekillerde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalarda ilk olarak Davies ve Ritchie alveolar arkı temel alarak,

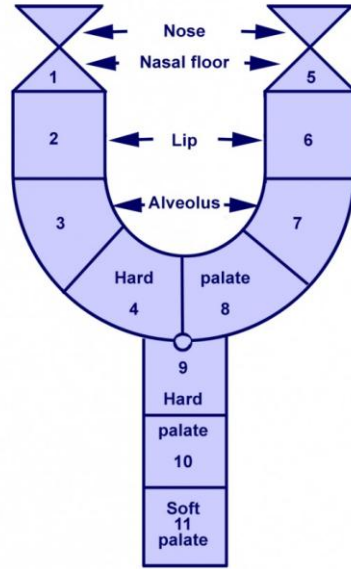
- Prealveolar (Yarık dudak)
- Postalveolar (Yarık damak)
- Transalveolar (Yarık dudak ve damak) şeklinde 3'lü bir sınıflandırma yapmıştır [24].

Bunun yanı sıra; Kernehan ve Stark embriyolojik temele göre;

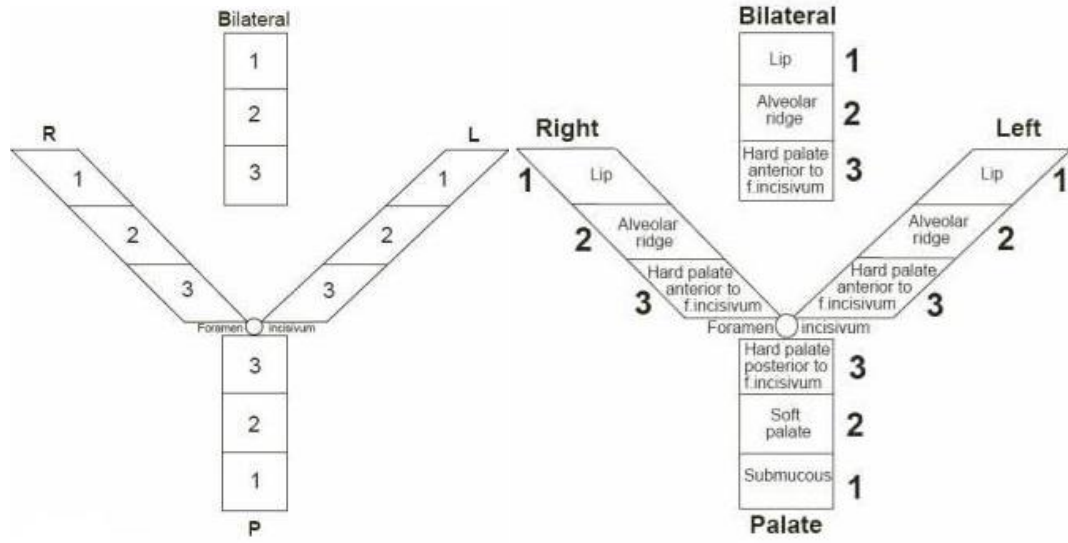
-Primer damak yarığı (insiziv foramen önünde)

-Sekonder damak yarığı (insiziv foramen arkasında) şeklinde 2'li bir sınıflandırma gerçekleştirmiştir [25].

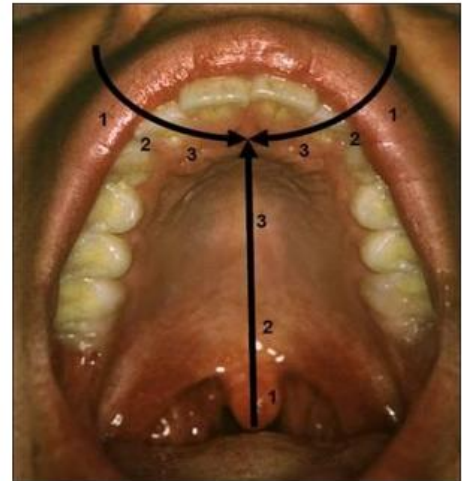
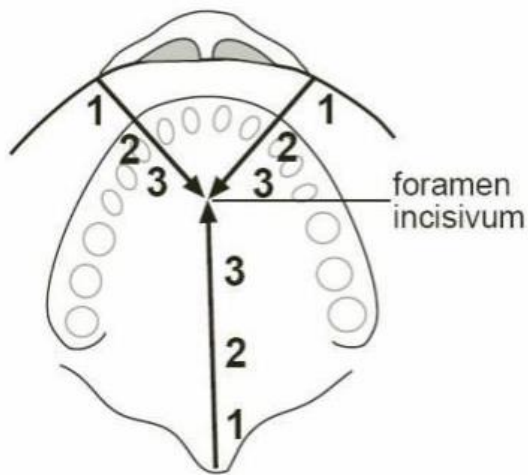
Sınıflamada **Kernahan'ın Stripped Y** skalası dudak, damak ve her ikisinin mevcut defektlerini daha detaylı olarak belirlemektedir (Resim 2.2).



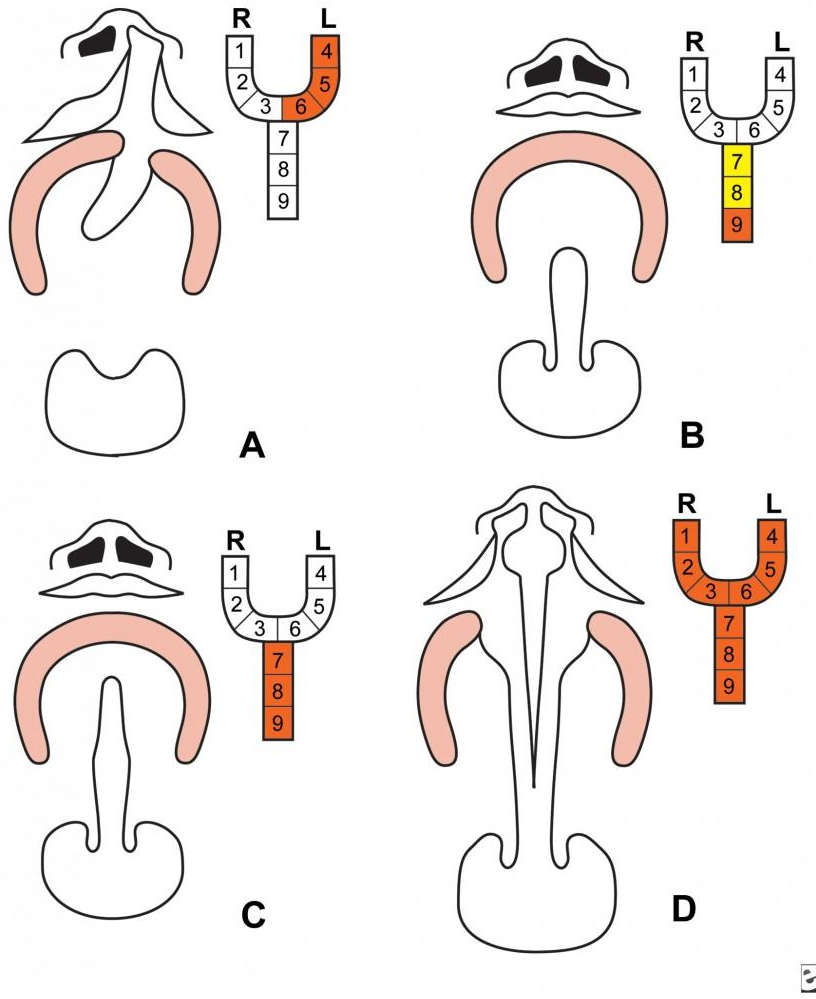
Resim 2.2. Kernehan'ın Y skalası



Resim 2.3. Kernehan'ın Y skalasına göre bölgelerin ayrıntılı gösterilişi



Resim 2.4. Kernehan'ın Y skalasının ağız üzerinde gösterimi [26, 27].



Resim 2.5.Kernehan'ın Y skalasına göre dudak ve damak yarıklarının oluşumu

A: Solda burun, burun tabanı, dudak ve alveol kısmında oluşan bir birleşme kusurundan dolayı sol tarafta meydana gelen dudak yarığı.

B: Sert damak meydana gelen birleşme kusuru sonucunda oluşan tam olmayan damak yarığı.

C: Sert ve yumuşak damakta meydana gelen birleşme kusuru sonucunda oluşan tam damak yarığı.

D: Burnun, burun tabanının, dudağın ve alveolün her iki tarafında ve yumuşak ve sert damakta birlikte meydana gelen birleşme kusuru sonucu oluşan dudak ve damak yarığı.

Dünya çapında genel ve herkes tarafından kabul gören ayrıntılı sınıflandırma ise şu şekildedir (Şekil 2.1).

DUDAK DAMAK YARIĞI

Dudak Yarığı	Damak Yarığı
• Tek taraflı tam olmayan dudak yarığı • Tek taraflı tam dudak yarığı • İki taraflı tam olmayan dudak yarığı • Bir taraflı tam bir taraflı tam olmayan dudak yarığı • İki taraflı tam dudak yarığı • Orta hat dudak yarıkları	• Yumuşak damak yarıkları • Sert damak yarıkları • Submukoz yarıklar • Bifid uvula şeklindeki yarıklar

Şekil 2.1. Dudak- Damak yarıklarının sınıflandırılması

2.3.1. Yarık dudak

Yarık dudak kendi içerisinde 6 alt bölüme sınıflandırılır (Resim 2.6);

1. Tek taraflı tam olmayan dudak yarığı
2. Tek taraflı tam dudak yarığı
3. İki taraflı tam olmayan dudak yarığı
4. Bir taraflı tam bir taraflı tam olmayan dudak yarığı
5. İki taraflı tam dudak yarığı
6. Orta hat dudak yarıkları (nadiren görülür.)



Resim 2.6.Yarık Dudak Çeşitleri

2.3.2. Yarık damak

Yarık damak kendi içerisinde 4 alt sınıfa ayrılır (Resim 2.7);

1. Yumuşak damak yarıkları (yumuşak damak, damağın arka bölümü)
2. Sert damak yarıkları (sert damak, damağın ön bölümü)
3. Submukoz yarıklar (ağız boşluğunun mukoza ile kaplı olması)
4. Bifid uvula şeklinde ortaya çıkar. (küçük dilin ikiye ayrılması)



Resim 2.7. Yarık damak çeşitleri

2.4. Teşhis

Fetüsün anne karnındayken çene kemikleri ve dudak oluşmaya başladıktan sonra, rutin ultrason incelemelerinde dudak- damak yarığı fark edilebilir. Çene ve yüz gelişimi hamileliğin 10. haftasında tamamlanmaktadır. Bu dönemde ya da bundan sonraki dönemlerde tam olarak teşhis koymak mümkündür. Annenin hamileliğini takip eden kadın doğum uzmanı ve detaylı görüntüleme yapan röntgen uzmanının anneden alacağı anamnez (tıbbi öykü) de problemi erken dönemde tanımda etkilidir.

Dudak-damak yarığı çok küçükse ve bebeğin duruşundan dolayı bebeğin yüzü anne karnında iyi gözlemlenememişse, her zaman tespit edilemeyebilir. Bebekteki birçok anormallik ultrasonografi tetkiki ile anlaşılabilir (Resim 2.8). Fakat dudak-damak yarıklarını sadece %25-30 kadarı fark edilebilmektedir. Günümüzde detaylı ultrasonografi yöntemleri ile dudak-damak yarığını belirleme çalışmaları artmaktadır. Anne karnında dudak-damak yarığı teşhisi konulması gebeliğin seyrini ve takibini değiştirmemektedir.



Resim 2.8. Üç boyutlu ultrasonda tespit edilmiş dudak-damak yarığı ok ile gösterilmiştir.

2.5. Tedavi

Bu anomali, bir veya daha çok operasyon ile düzeltilebilmektedir (Resim 2.9) (Resim 2.10) (Resim 2.11) (Resim 2.12).



Resim 2.9. Altı aylık bir kız bebeğin düzeltme operasyonundan önceki durumu.



Resim 2.10. Aynı kızın operasyondan bir ay sonraki durumu.



Resim 2.11. Aynı kızın dört buçuk yaşındaki durumu. Operasyondan sonra yara izinin yaş ilerledikçe belirginliğini kaybettiği gözlemleniyor.



Resim 2.12. Aynı kızın 8 yaşındaki hali. Yara izi hemen hemen kaybolmuş durumda.

Ameliyatın zamanlaması deformitenin ve seçilen ameliyatın türüne göre değişir. Ancak operasyon zamanını sıklıkla ailenin üzerindeki sosyal baskı düzeyi belirlemektedir. Defekt, çocuğun görünümünü ileri derecede bozmuş olabilir. Bu nedenle aile, bebeklerinin başkaları tarafından, hatta ailenin diğer fertleri tarafından bile görülmesini istemeyebilirler. Sonuçta bu durumda bebek ve anne hastaneden taburcu edilmeden dudak onarımı yapılmak zorunda kalınabilir. Ancak bu yaklaşım çok popüler değildir [18]. Dudak onarımı genellikle bebek 3 aylık olduktan sonra yapılmaktadır. Çift taraflı YD deformitelerinde simetrik onarımın sağlanması için her iki taraf aynı seansta onarılmaktadırlar. YDA onarımında ise genellikle 18 ay öncesi dönem tercih edilmektedir. Bu dönemde bebeğin konuşma yetisi gelişmeye başlamaktadır. Son çalışmalarda düzeltici operasyonun 12 aydan önce yapıldığı durumlarda en iyi sonuçların alındığı bildirilmektedir. Damak operasyonunu yapıldığı dönem 6-12 aylar arasındaki dönemdir [28, 29, 30]. Bebeğin diğer konjenital anomaliler açısından da değerlendirilmesi gereklidir. Birçok cerrah

"10'lar" kuralına uymayı tercih eder. Bu kural şöyle açıklanabilir: Bebek 10 pound (4.5 Kg) ağırlığında, hemoglobin düzeyi 10gr/dl'ye ve bebeğin yaşı 10 haftaya ulaşana dek beklenir. Bu şekilde bebeğin, bundan sonra geçireceği operasyonlar dizisine hazır olduğu kabul edilir [31].

2.6. Epidemiyoloji

Yaygın, çok genli bir kongenital bozukluk olan dudak-damak yarığı malformasyonu, üzerinde geniş çaplı olarak çalışılmasına rağmen etiyolojisi karmaşıklığından dolayı hala büyük oranda bilinmemektedir. Etiyolojisi multifaktöriyeldir. Birçok genetik ve çevresel faktörlerin, hastalığın gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Ama bu genetik ve çevresel katkıların niteliği aydınlanmayı beklemektedir [23].

Yarık dudak, yarık damak ya her ikisinin birden görüldüğü durumların yaygınlık oranı; etnik alt yapı, ırksal farklılık, coğrafi köken ve sosyoekonomik duruma göre değişkenlik göstermektedir [32, 33, 34, 35].

Hastalığın prevalansı beyaz ırkta 1/775-1000 civarında olmakla beraber coğrafik bölge ve etkin orijine bağlı olarak 0.4-2.0/1000 arasında değişkenlik göstermektedir [33, 36]. Oral yarık sıklığı yaklaşık 1/700 olarak bildirilmiştir. Siyah ırkta oran daha düşük (1/1370-5000), Amerikalılar, Hintliler, Japonlar ve Çinlilerde ise daha fazladır. Avrupa'da sendromsuz dudak damak yarıklı doğum görülme oranı 10.000'de 12'dir [37]. Yarık dudak vakasının sıklığı 1/300, sadece yarık damak 1/1500 ve her iki vakanın bir arada bulunma sıklığı da 1/2500 olarak bildirilmiştir [1, 38, 39]. Bu verilere göre, en yüksek oranlar Amerika yerlileri ve Asyalılarda görülmektedir. Afrikalılar ise en düşük orandadır (Çizelge2.1).

Çizelge 2.1. Hastalığın bazı ülkelerde görülme oranları [1, 33, 38, 39, 40,41, 42]

Hastalığın Bazı ülkelerde Görülme Oranları
Amerika yerlileri: 3.74/1000
Asya: 2.02/1000
Japonya: 0.82/1000-3.36/1000
Avrupa: 1.2/1000
Kore: 1.81/1000
Çin: 1.45/1000-4.04/1000
Kafkasya: 1.43/1000 -1.86/1000
Latin Amerika: 1.04/1000
Afrika: 0.18/1000-1.67/1000
Finlandiya: 1/1000
Kuzey-Doğu Fransa: 0,41/1000
İtalya: 0.34/1000
Letonya: 1/700
Türkiye: 1/1000
ABD: 1/600-1000

Çizelge 2.2. Yapılan çalışmalarda ülkelerdeki vakaların dudak ve/veya damak yarığı olarak sınıflandırılması [43].

Ülkeler	Vakalar	CL	CLP	CP	Bilinmeyen
Arjantin	91	21	61	8	1
Bolivya	23	6	16	-	1
Brezilya	32	13	14	5	-
Şili	28	4	18	4	2
Ekvator	2	2	-	-	-
Paraguay	7	1	5	-	1
Uruguay	12	3	3	6	-
Venezuela	22	7	12	1	2
Toplam	217	57	129	24	7

Bu çalışmayla; hastalar arasında dudak-damak yarıklığının birlikte görüldüğü vakaların oranının en yüksek olduğu, bunu sadece dudak yarığının takip ettiği, en düşük oranın ise, sadece damak yarığında görüldüğünü belirtilmektedir.

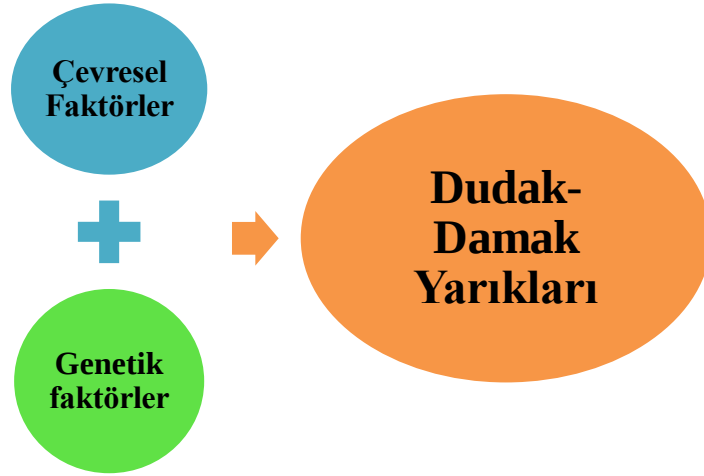
Oranların bu kadar farklı olmasının nedenleri arasında coğrafi, etnik köken ve kalıtım kalıplarının farklılıkları olabileceği gibi oral yarığın tipine göre de farklılık göstermektedir. Yarık dudaklı hastaların %50 sinde yarık damak bulunmaktadır [1, 38, 39].

Irklar arasında çeşitli farklar olmakla beraber, beyaz ırkta görülme sıklığı 1000 canlı doğumda bir olduğu kabul edilmektedir. Türkiye’de ise yarık dudak/damak görülme sıklığı binde 0.95, izole yarık damak görülme sıklığı binde 0.77 olarak bildirilmiştir [44].

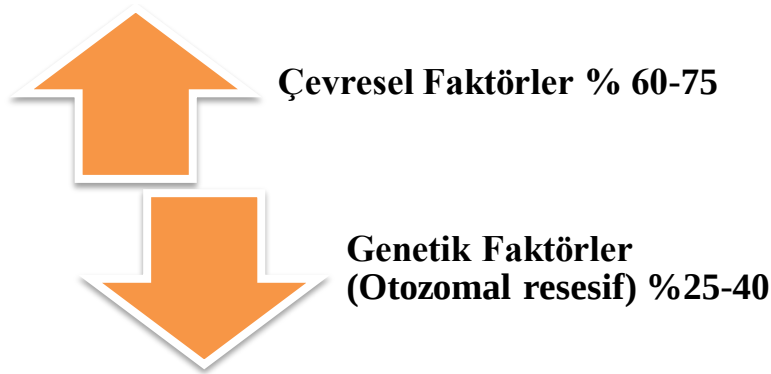
Verilere ölü doğum ve düşükler de katılırsa, deformitenin görülme sıklığı belirgin olarak artmaktadır. Canlı doğmuş bebeklerde yarık dudak-damak sıklığı Asyalılarda 1:470-850, Siyah ırkta 1:1370-5000 ve Beyaz ırkta ise 1:775-1000 olarak tahmin edilmektedir. Tek başına yarık damak, deformitesinin görülme sıklığı canlı doğumlar arasında 0.5:1000'dir ve ırklara göre farklılık göstermemektedir [45].

2.7. Etiyoloji

Sendromsuz OFC’in karmaşık etiyolojisi CL/P ve CPI arasındaki farklardan kaynaklanır, her bir grubun heterojenitesi, bu hastalığa neden olan birçok gen içermeleri, kalıtım türü, çevresel faktörlerle ilişkisi, bu genler ve yerleştikleri yerler yeniden gözden geçirilerek sendromsuz OFC’ nin başlangıcı bilimsel kanıt olarak çok ses getirmiştir. [18].



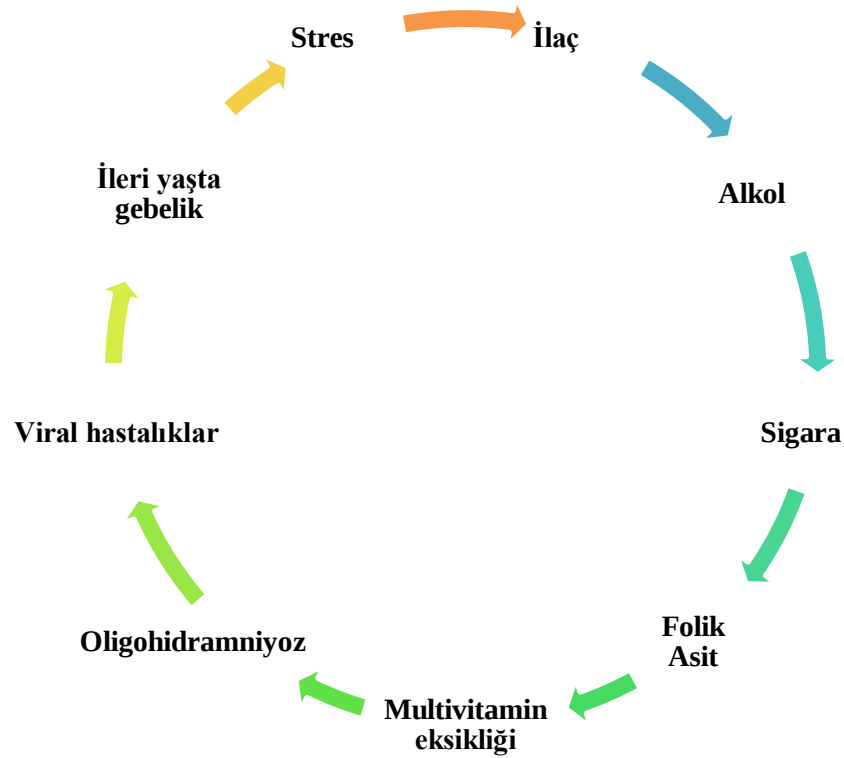
Şekil 2.2. Hastalığı oluşturan etmenlerin sınıflandırılması



Şekil 2.3. Hastalığı oluşturan etmenlerin yüzde oranları

2.7.1. Çevresel faktörler

YDD birçok faktörün etkilediği bir deformitedir [22]. Oral yarıkların oluşumuyla ilgili yapılan birçok çalışma olmasına rağmen etiyolojisi ve patojenitesi hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmasa da yarık damak/ dudak oluşumunun genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle meydana geldiği bilinmektedir. Kimi vakalarda sadece genetik veya çevresel faktörler olabildiği gibi bazı vakalarda hem genetik hem de çevresel faktörler birlikte etkili olmaktadır. Tek yumurta ikizlerinde yarık damak/ dudak oluşumunun %100 olmaması genetik faktörlerin tek başına etkili olmadığını göstermektedir [39].



Şekil 2.4. Dudak-damak yarığının oluşmasına neden olan çevresel faktörler

Gebelik döneminde anti-epileptik ilaç, içki ve sigara kullanımı; folik asit ve multivitamin eksiklikleri gibi genetik olmayan çevresel faktörlerin yarık damak/dudak ile ilişkisi ortaya konmasına rağmen hastalığın genetik temeline dayanan çalışmalar ön plana çıkmasına neden olmuştur [38, 46]. Muhtemel etiyolojik faktörler arasında, B grubu ve A vitamin eksiklikleri gösterilmiştir. Deformitesi bulunan bebeklerin annelerinin %25'inde B grubu vitamin eksiklikleri tespit edilmiştir [47]. Bir başka etiyolojik faktör de oligohidramniyozdur. Oligohidramniyoz, bebeğin anne karnında yüzdüğü sıvı miktarının normalin altında olduğu duruma verilen addır. Steroid ilaçlar, antikonvülzan ilaçlar, diyazepam ve aminopterin de deney hayvanlarında YDD deformitesi oluşturmuştur. Bazı ipuçları göstermektedir ki, fenitoin ve diyazepam insan embriolarında YDD oluşturmaktadır.

Gebeliğin ilk üç ayı içinde geçirilen toksoplazma ve rubella enfeksiyonları da YDD deformitesi oluşturabilmektedirler. [22]. Treacher Collins, Stickler veya Van der Woude sendromları ve D,E ve G grubu kromozomların trizomileri ile birlikte Pierre

Robin anomalisi de YDD deformitesi ile ilgili görülmüştür. Gebelikte alkol alımı da bu deformitelerin gelişiminde suçlanmaktadır [21].

Yaşlı annelerin çocukları YDD deformitesi açısından daha fazla risk altındadırlar. [48]. Daha önce YDD deformiteli çocuğu olmuş ana-babaların da ikinci çocuklarında deformite riskinin arttığı ortaya konulmuştur [21, 49, 50].

Önceki çalışmalar, annelerdeki yüksek stresin de doğan bebeklerdeki yarıklılık oranını artırdığını ortaya koymuştur [51, 52]. Anneni stres altında olmasının, kortikosteroid üretiminin artması sonucunda doğumsal kusurlar meydana getirdiği hipotezi öne sürülmüştür. Kemirgenler ve tavşanlarla yapılan hayvan çalışmaları, yüksek dozda kortikosteroidin sürekli yarık damağa neden olduğunu göstermiştir [51, 53, 54]. Stresli yaşam olayları, annenin kortikotropin salgılatıcı hormon düzeyinin artmasıyla ve hamilelik süresindeki kortikosteroid ile ilişkilidir [55, 56]. Hamileliğin ilk iç ayı boyunca, kortikosteroid ilaçlar alan kadınların bebeklerinde yüksek oral yarık riski olduğu gözlemlenmiştir [57, 58].

2.7.2. Genetik faktörler

Farklı popülasyonlardan hastaların %20'sinin olumlu bir aile öyküsü olsa da, genetik faktörlerin bu doğumsal kusurun ortaya çıkmasında çok önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Fogh Anderson, OFC' nin güçlü genetik bileşenlerinin ilk popülasyon kökenli kanıtlarını ortaya çıkarmıştır. Bu kanıtlar, CPI'den etkilenen aile ve ebeveynlerin farklı genetik alt yapılarının karşılaştırılması ile ortaya çıkarılmıştır. Tam olarak yarık dudak ve yarık damağa sahip olan hastalar, yarık dudak grubu olarak ayrılmıştır. Bu sebepten dolayı, aileler (hastalar) yarık dudak, sadece yarık damak gibi sınıflandırılmaya karar verilmiş, kalan aileler de ise CL/P olarak gruplanmıştır.

OFC'nin nasıl kalıtıldığı yıllardır araştırılmasına rağmen, sonuçların görünür bir şekilde anlaşmazlığa neden olduğu kanısına varılmıştır. Farklılık muhtemelen her iki örnek ve modelin kullanılması nedeniyle meydana gelmiştir. Aslında örneklerin bazen farklı coğrafik bölgelerden toplanması ya da aynı bölgelerden toplanması, farklı ırk ve etnik kökenli hastaları karşılaştırmaya olanak sağlamaktadır. Diğer

yandan, sınırlı sayıda ailelerle yapılan çalışmalar önyargılı olabilir. Aslında, OFC araştırmacıları;

- 1) Genellikle küçük soyağaçlarının kullanılması,
- 2) Soyağacı içindeki etkilenen bireylerin sayısının azalmış olması, (muhtemelen düşük penetrans nedeniyle)
- 3) Genetik heterojenitenin bu kusurluluk tarafından ortaya konulması nedeniyle sınırlanmıştır.

Böylece, büyük bir örnek miktarı olmadan ancak ikna edici olmayan sonuçlara ulaşılabilmektedir [14].

İzole damak yarıklı dominant kalıtım tipi gösteren aileler olmasına rağmen yarık damaklı vakaların çoğu Mendelyen kalıtım tipi (tek gen hastalıkları) göstermez. Curtis ve arkadaşları 1961 yılında yaptıkları çalışmada bir çocukta yarık damak varsa diğer çocukta oluşma sıklığı %2, ebeveynlerden birinde varsa %6, hem ebeveynlerden biri hem de bir çocukta varsa oran %15 olarak bildirmiştir. [59]. Tek yumurta ikizlerinde oran %40 ile %60, çift yumurta ikizlerinde %5 olarak bildirilmiştir (Çizelge 2.3.) [39].

Çizelge 2.3.Deformitenin risk gruplarında görülme sıklığı [60, 61, 62].

Risk Grubu	YDD (%)	YDA(%)
Genel toplumda	0.08	0.02
Daha önce bir çocuklarında deformite olan anne babanın ikinci çocuklarındaki risk	3.7	2.5
Anne ve babadan birinde YDD deformitesi olması halinde ilk çocuktaki risk	4.04	5.82
Anne ve babanın birinde ve ilk çocukta YDD olması halinde ikinci çocuktaki risk	19.4	14.3
Daha önce iki çocuklarında YDD deformitesi olmuş normal anne babanın üçüncü çocukları için olan risk	6.0	0.90
Anne ve babadan birinde YDD varken birinci çocuğun normal olması halinde ikinci çocuktaki risk	4	-
Normal anne ve babanın ilk çocuğunda başka anormalilerle birlikte YDD deformitesi olmuş ise ikinci çocuktaki risk	2	-
Daha önce bir YDA deformiteli çocuğu olmuş normal anne ve babanın ikinci çocukları için riskbi	-	Akrabalarda yarık yoksa 2, varsa 7
Anne ve babadan birinde YDA deformitesi olması halinde birinci ve ikinci çocuk için sıra ile risk	-	6 ve 15

2.8. Hastalığı Etkileyen Genler

Dudak damak yarıklığında etkili olduğu düşünülen genlerle yapılan, linkaj (bağlantı) ve ilişkilendirme çalışmalarıyla birçok aday bölge, farklı insan populasyonlarında araştırılmıştır. Birçok kromozom bölgesi örneğin, 19q13, 2p13, 6p ve 4p ve 4q ve birçok aday gen (19q13.2'de) *BCL3*, 17q21'de *RARA*, 4p16'de *MSX1*, 6p23'de *TGFA*, 14q24'de *TGF3*, vb. dudak-damak yarıklarında rol oynayıp oynamadığı analiz edilmiştir.

Çizelge 2.4. Dudak-damak yarığında etkili olan aday genler [14, 63, 64].

LOKUS	GENLER
19q13.2	BCL3
17q21.1	RARA
4p16	MSX1(OFC 5)
2p13	TGFA
14q24	TGFB3
1q32.3-q41	IRF6 (OFC 6)
1p36	MTHFR
11q23.3	PVRL1
1q41	TGFB2
15q11	GABRB3
2q33	SUMO1 (OFC 10)
3q28	TP73L (OFC 8)
6p24-p23	OFC 1
2p13	OFC 2
19q13	OFC 3
1q21-q31	OFC 4
13q33.1-q37	OFC 9
19q13	CLPTM1
1p31.1	LHX8
1q22-q24	SKI
5q34-q35	MSX2
6p24.1	EDN1
9q22	FOXE1
11q13.2	TBX10
13q31.1	SPRY2
14q32	JAG
Xq21.1	TBX22

Çizelge 2.5. Dudak-damak yarıklarını etkilediği düşünülen aday genler [63].

LOKUS	ADAY GENLER
9q22	FOXE1
2q14	GLI2
14q11.2	ISGF3G
14q32	JAG2
5q34-q35	MSX2
8p23.1-21.3	NAT1
8q22.2	OSR2
3q27-q29	P63
14q12-q13	PAX9
2q32-q33	SATB2
1p36.3	SKI
4q28.1	SPRY1
13q22.2	SPRY2
22q11.21	TBX1
11q13.1	TBX10
19q13.2	TGFB1
14q24.3	TGFB3
9q22	TGFBR1

Genetik çalışmalar, sadece aday genlerin salt analizleriyle değil aday genlerin birbirleriyle bağlantılarına da yönelik olmuştur. Aday genler arasında en çok çalışılan $TGF\alpha$ (Transforme edici Büyüme Faktörü alfa), $MSX1$, $TGF\beta$ (Transforme edici Büyüme Faktörü beta), $BCL3$, $IRF6$ gibi genlerdir. Kimi araştırmacılar bu genler ile hastalık arasında pozitif, kimileri de negatif ilişki bulmuştur. Pozitif veya negatif ilişkiyi sadece genler direkt olarak değil, çalışmanın yapıldığı populasyon ve dış faktörler de etkilemektedir. Bu genler farklı kalıtım kalıpları gösterdiklerinden (otozomal dominant, otozomal resesif gibi) oral yarık insidans (görülme sıklığı) aralığı geniştir. Bir genin diğeri üzerine etkisi düşünüldüğünde çok genli kalıtım modeli gösteren ve çevresel şartlardan etkilenen oral yarık oluşumunun ne denli

karmaşık bir sorun olduğu ve genetik temelini anlaşılmada çok sayıda bu yönlü araştırmanın yapılmasına gerek duyulmuştur.

Günümüze kadar yapılan genetik çalışmaların çoğunu Avrupalı ve beyaz Amerikalı popülasyonlar oluşturmaktaydı. Son 2-3 yılda, Çin, Kuveyt, Suriye, Hindistan gibi ülkeleri de kapsayan geniş popülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu bölgelerdeki oral yarık insidansının yüksek çıkması genetik sonuçların daha da anlamlı olmasını sağlamıştır. Halen aday genler ile oral yarıkların arasında net bir bağlantı bulunamamıştır. Hastalığın meydana gelmesinde birden fazla gen, hatta gen gruplarının çevre faktörleri ile etkileşimi düşünülürse, daha fazla popülasyon taramalarının yapılmasına gerek vardır [12, 65, 66].

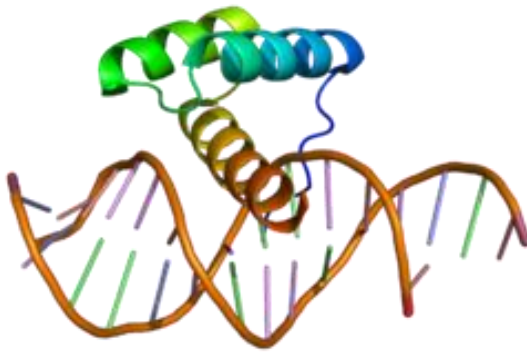
2.9. MSX1 Geni

MSX1 geni, sendromik olmayan dudak ve/veya damak yarığı ile ilişkisi analiz edilen aday genlerin en önemlilerinden biridir [67]. Sıralama ve ilişkilendirme çalışmaları, MSX1'in sendromsuz yarıkların etiyolojisinde rolü olduğunu belirtmektedir [68]. Bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda elde edilen genetik analiz sonuçları (p değerleri), MSX1 geninin dudak damak yarıklarının meydana gelmesindeki etkisini daha net ortaya koymuştur (Çizelge 2. 6).

Çizelge 2.6. Bazı ülkelerde yapılan MSX1 gen değişimi çalışmaları sonuçlarında bulunan P değerleri [9, 69-78].

Bazı ülkelerde yapılan MSX1 gen değişimi çalışmaları	p değerleri
Vietnam	p = 0.22
Thai	p = 0.285
Philippine	p = 0.26
Denmark	p = 0.57
Colombia	p ≤ 0.05
Chilean	p = 0.03
China	p ≤ 0.05
India	p ≤ 0.05
Korean	p = 0.016
Dutch	p < 0.01
Latvian	p = 0.000001
Norway	p = 0.04

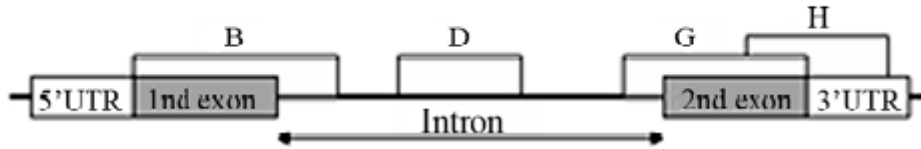
Araştırma sonuçları göstermektedir ki, MSX1 (muscle segment homeobox 1) geni, insanlarda diş gelişimi kronofasiyal iskelet oluşumu ve diş oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır, ayrıca birçok çalışma MSX1 genindeki mutasyonların hem ağızdaki yarıklara hem de diş kayıplarına neden olduğunu desteklemektedir (Resim 2.13) [79, 80].



Resim 2.13. Msh homeobox 1

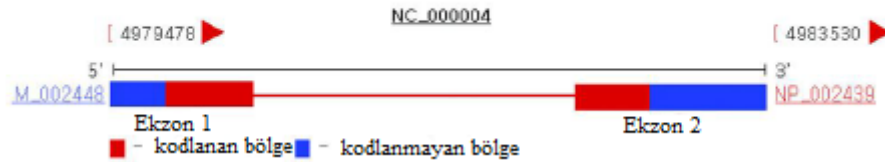
MSX1 geni Homeobox gen ailesinin bir üyesidir, kas segmenti elemanlarını kodlar. Embriyogenez sırasında çekirdek transkripsiyon kompleksleri ve diğer homeoproteinlerin komponentleri etkileşimini baskılayıcı bir transkripsiyon baskılayıcı proteini kodlar. Ayrıca extremitte (bacak ve kol oluşumu), kraniyofasiyal gelişim, özellikle odontogenez ve tümör büyüme inhibitörü olarak da rol aldığı söylenebilir. İlk olarak homeobox 7 olarak bilinen bu gendeki mutasyonun, sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklarıyla ilişkisi olduğu belirlenmiştir.

Omurgalı HOX genlerinden olan MSX1 gen ailesi Drosophila MSX geni ile homolog bir baz üzerinden izole edilmiştir. İnsan MSX1 geni 4p16.1 lokusunda bulunur ve 4.05kb'lık yer kaplar. 2 ekzon ve 1 intron bölgesi içerir (Resim 2.14). MSX1 gen ekspresyonu siklin D1 upregülasyonu ile ilişkilidir, hücresel farklılaşmasını inhibe ederek hücre döngüsünü regüle eder (Resim 2.15) [81]. MSX1 geni 303 aminoasit kodlar, 60 aminoasit özel homeobox alanını oluşturur. Embriyonik dönemde MSX1 gen ifadesi, diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime bağlı olarak, düzenlemede pozitif bir rolü de olabilir, ters fazlı düzenleme de yapabilir.



Resim 2.14. MSX1 geni

Genomik bölge, transkriptler ve ürünler



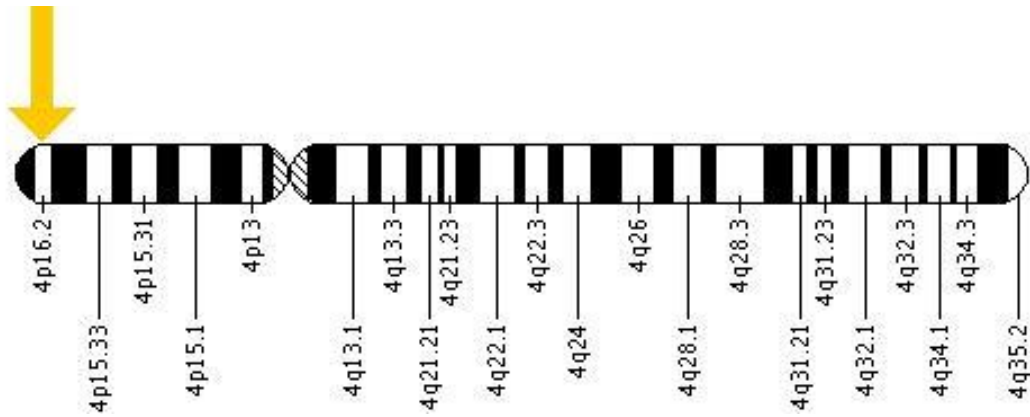
Resim 2.15. MSX1 gen özellikleri

Aslında MSX1, Homeobox 1'in resmi adıdır, genin resmi sembolüdür. Ayrıca MSX1 geni başka isimlerle bilinmektedir. Bunlar; homeobox 7, homeobox protein MSX-1,

HOX7, HYD1, msh homeo box 1, msh homeobox homolog 1, MSH Homeo Box Homolog 1 (Drosophila) Gene, MSX1_HUMAN, OFC5'tir.

Sendromsuz dudak-damak yarığı (NSCLP) karmaşık bir genetik özelliğe sahiptir. Bağlantı ve ilişkilendirme çalışmaları, yarıklılığa sebep olan bölgenin, 4. Kromozomun kısa kolu üzerinde olduğunu belirtmektedir [82].

Kromozom 4 üzerindeki moleküler yeri: 4,861,391 baz çifti ile 4,865,662 baz çifti arasındadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. MSX1 geninin sitogenetik yeri

MSX1 geni; protein oluşumunda diğer genlerin aktivitelerini düzenleyen bir genidir. Büyük bir gen ailesi olan homeobox'ın bir parçası olan MSX1, birçok vücut yapılarını oluşumundaki erken gelişim evrelerinde rol oynar, özellikle normal diş ve dudak yapılarının gelişiminde çok önemlidir. Ayrıca el ve ayak gelişimi için de önemli olabilir.

MSX1 oldukça korunmuş bir homeobox genidir. Kronofasiyal gelişimde, epitelyal ve mezenkimal doku etkileşiminde birkaç kilit rol oynar. Hücrenin büyümesi ve morfogenezin dengesi için hücresel çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümünü düzenler. Bu gen kas segmenti homeobox gen ailesi üyesi olarak kodlanır. Bu gen ve diğer homeoproteinlerden kodlanan proteinler, embriyogenez sırasında çekirdek transkripsiyon kompleks komponentleri ile ilişkiye girerek, transkripsiyonel represör (baskılayıcı) gibi görev yapar. Aynı zamanda bacak model oluşumu, kraniofasiyal

gelişimde özellikle odontogenez, tümör büyümesini engellemede rolleri olabilir. Bu gendeki mutasyonlar, sendromsuz dudak ve damak yarığı, Witkop sendromu, Wolf Hirschorn sendromu ve otozomal dominant hypodontia ile ilişkilidir. Bir transkripsiyonel represör görevi gören bu gen, ekstremité model oluşumunda rol oynayabilir. Tırnak plaka kalınlığı ve bütünlüğü için tırnak yatağı mezenşimin ifadesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Msx proteinleri kraniofasial bacak ve sinir gelişiminde önemli modülatörlerdir. [83, 84, 85] Bu proteinler düzenleyici proteinlerdir, in vitro ve in vivo'da protein-protein ilişkilerinde transkripsiyonel baskılayıcı gibi görev görürken, gen seçiminde ve transkripsiyonun düzenlenmesinde kılavuz görevi görürler [84, 86, 87, 88, 89, 90].

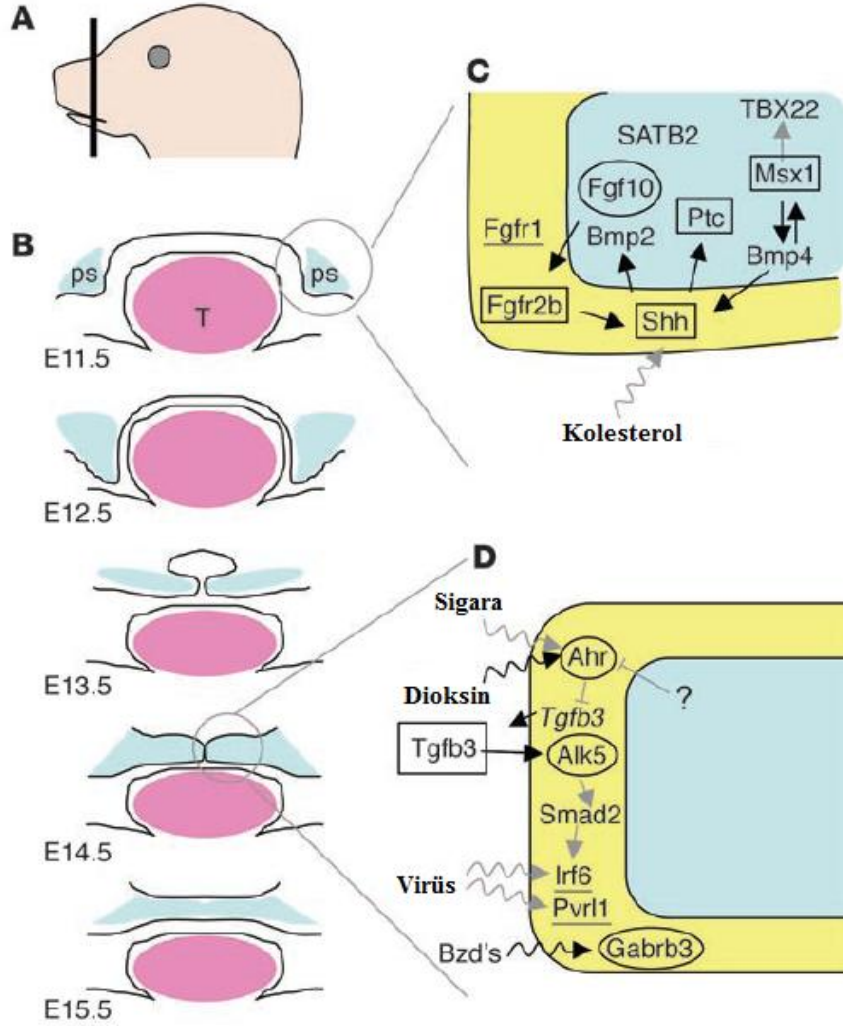
MSX homeodomain transkripsiyonel baskılama için; TATA bağlayıcı protein (TBP) ve transkripsiyon kompleksi bileşeni çekirdek komponentleri ile doğrudan etkileşime girer [89, 90]. MSX proteinleri transkripsiyonu düzenleyen diğer proteinlerle etkileşim halindedir. Heterodimer MSX1 ve diğer homeodomain proteinleri (DLX2, DLX5, LHX2 ve PAX3 gibi) sonuçları in vitro'da karşılıklı fonksiyonel zıtlık oluşturmaktadır.

MSX1 geni ifadesinin bir düzenleyici mekanizma gibi diğer proteinlerin üzerini örtmüş olabileceği düşünülmektedir. Buna rağmen, MSX1 ve MSX2'nin benzer DNA bağlanma yeri göstermekte, bunun yanı sıra transkripsiyonu baskılamak için tek N-terminal etki sayesinde farklı biyokimyasal özellikler göstermektedir. MSX1, DNA için daha büyük bir benzeşme gösterdiği için daha güçlü bir baskılayıcıdır [91].

MSX1 ile beraber çok sayıda genle ilgili, transkripsiyon faktörleri düzenleyen mikrosatellit işaretler ve tek nükleotit polimorfizmleri ile ilişki ve bağlantı çalışmaları rapor edilmiştir. Bu spesifik genlerin transkripsiyon faktörü, büyüme faktörü, hücre sinyali ve detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynadığı belirlenmiştir [92].

Örneğin; Knock-out farelerdeki kapsamlı çalışmalar da, damak gelişimi için gerekli olan MSX1 Bmp sinyalinin Shh ifadesini düzenlediğini göstermiştir, Hollandalı bir ailede MSX1 genindeki mutasyonun diş gelişimini durdurması ve OFC ile ilişkili

olması ile MSX1'in insanlardaki yarıklılık için aday gen olduğu onaylanmıştır (Resim 2.16) [8].



Resim 2.16. Sinyal moleküllerinin damak gelişimindeki rolü

A: Embriyonik damaktan enine kesit, B: Normal damağın (mavi kısım) gebe kaldıktan günler sonraki şematik görünümü. Damak bölümleri maksiler çıkıntılardan oluşur, (E11.5) büyür, dili geçerek düşey olarak genişler (E12.5). Dil (pembe kısım) aşağı inerek damak kısımlarının üste çıkmasına izin verir (E13.5), birbirine yaklaşır (E14.5), birleşir (E15.5). C: Hücre damak gelişimi sırasında özel moleküller sinyaller gönderir. D: Moleküller gelişime katılır. Genler damak gelişimine dahil olur. γ -aminobutyric acid receptor subunit $\beta 3$ (Gabbrb3) de damağın üste çıkmasına neden olur.

Moleküller epitel (sarı kısım) ya da mezenşim (mavi kısım) içinde ifade olur. Hangi moleküllerin damak gelişiminde farelerde önemli olduğu yuvarlak içine alınarak, insanda etkili olanlar altı çizili olarak, ikisinde birden etkili olanlar ise dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir. Siyah oklar bilineni gösterir, gri oklar tahmin edilenleri gösterir, gen-gen ilişkisi olanlar düz, gen-çevre ilişkisi olanlar dalgalı olarak gösterilmiştir. Ahr, aryl-hydrocarbon receptor; Alk5, activin receptor-like kinaz 5; Bmp 4, bone morphogenic protein 4; Bzd's, benzodiazepines; Msx1, msh-like 1 homeobox; Ptc, patched homolog 1; Pvr11, paliovirüs receptor-related1; SATB2, SATB family member 2; TBX22, T-box 22; Tgfb3, transforming growth factor β 3. [93].

2.10. MSX1 Geni (G267C) Bölgesi

Thai populasyonunda yapılan mutasyon analizleri çalışmasına göre; MSX1 gen mutasyonunu, özellikle MSX1 geninin G267C bölgesinin, dudak damak yarıklarında etkili bir bölge olduğu görülmüştür. 100 hasta ile yapılan bu çalışmada, sekiz varyant bölge tespit edilmiştir. Bu varyantların 7'si tek nükleotit değişimidir. Bunlardan 1'i de G267C bölgesidir. (799G>TG267C) Özellikle G267C ve P278S varyantlarının, kendilerini serin ve arjinince zengin proteinlerde, potansiyel exonic splicing enhanser gibi değiştirip, “muhtemel hasar verici” olduğu PolyPhen tarafından tahmin edilmektedir. Bu durum, çalışmadaki 162 kontrol grubunda mevcut değildir. Daha önce MSX1 genindeki yanlış anlamlı mutasyonların (missense mutation) homeodomain proteinin N-terminal ucunda rapor edilmesinin aksine, homeodomain C-terminal ucunda ekzon 2'deki bu potansiyel mutasyonlar bulunmuştur [73].

MSX1 geni Ekzon 2'deki nonsynonymous 799G>T (G267C) ve 832C>T (P278S) varyantları daha önce rapor edilmemiştir. MSX1 geninin ekzon 2 ve ekzon 1 bölgeleri karşılaştırıldığında, ekzon 2'nin çoğunlukla belirgin olarak baz dizisi ile ilgili varyasyonlar olduğu görülmektedir [94].

Bu araştırma sonuçları, MSX1 genin sendromsuz dudak damak yarıklarının ortaya çıkmasına %2 oranında katkı sağladığını ortaya koymaktadır, uyumludur. MSX1 gen mutasyonlarının fenotipik ve penetrans çalışmalarının artırılması gerekmektedir [73].

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, kullanılan olan 70 adet kan örneği Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne başvuran sendromsuz dudak damak yarıklı Türk hastalardan, gönüllü onam formları imzalatılarak elde edilmiştir.

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinden Fenol-kloroform yöntemiyle genomik DNA izolasyonu yapılarak, MSX1 geni üzerinde literatürde belirtilen polimeraz zincir reaksiyonu şartlarına göre metod uygulanmıştır. Elde edilen polimeraz zincir reaksiyon ürünleri; RFLP ile analizleri yapılmıştır, RFLP metoduyla çalışılan örneklerde mutasyonu belirleyecek olan restriksiyon endonükleazlar kullanılarak gen ürünlerinin kesimi yapılmıştır. Bu enzim kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforezleri yapılarak jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Fenol-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu

1.Gün:

1ml EDTA + 9ml Kan

1. Örneğin hacminin 2.5 katı kadar RBC (Red Blood Cell) Lysis solüsyonuna konur.
2. Hazırlanan karışım çalkalandıktan sonra 20 dk. buzda bekletilir.
3. 20 dk. 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
4. Tüpte dipte beyaz çökelti görülmediği takdirde, süpernatantın bir kısmı dökülür, hacim RBC Lysis solüsyonu ilave edilerek dipte lökosit tabakası oluşana kadar işlem tekrarlanır.
5. Lökosit tabakası elde edilince süpernatant dökülür.
6. RBC Lysis solüsyonuyla 1-2 kez yıkama yapılır.

7. Örneğe 1000µl RBC Lysis solüsyonu ilave edilir.
8. Vorteksle homojen halde getirilir.
9. 200µl örnekle işleme devam edilir. Geri kalan stoklanır.
10. +500µl STE+ 30µl SDS (%10'luk) +20µl Proteinaz K ilave edilir.
11. Örnek 56°C su banyosunda 1 gece bekletilir.

2.Gün:

1. Örneğe 1:1 oranında fenol ilave edilir.
2. 10 dk. çalkalandıktan sonra 20 dk. buza gömülür.
3. Örnek 20dk. 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
4. Süpernatant başka bir ependorfa alınır.
5. 1:1 oranında (750µl) kloroform ilave edilir.
6. 10 dk. çalkalandıktan sonra 20 dk. buza gömülür.
7. 20 dk. 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
8. Süpernatant başka bir ependorfa alınır.
9. + Hacim 1/10'u kadar NA asetat+toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik etanol tüpe alınan süpernatanta ilave edilir.
10. DNA iplikçikleri beyaz yumak şeklinde görünür hale gelinceye kadar tüp yavaşça alt-üst edilir.
11. Örnek -20°C'de 1 gece bekletilir.

3.Gün

1. Örnek 20 dk. 4000 rpm 4°C'de santrifüj yapılır.

2. Tüpün dibinde çökmüş DNA yoğunluğuna bakılarak eklenecek olan TE (Tris-EDTA) miktarı belirlenir.
3. Sıvı kısmı dökülür.
4. Örneğe +500µl %70'lik etanol ilave edilir.
5. 20 dk. 4000rpm'de 4°C'de santrifüj edilir.
6. Alkol dikkatlice dökülerek kurumaya bırakılır.
7. Eppendorf tüpüne TE ilave edilir.
8. Tüp 37°C su banyosunda 1 gece bekletilir.

Belli miktarlarda sulandırılan DNA'ların milimetredeki miktarları Nanodrop kullanılarak tayin edilmiştir. İzolasyondan istenilen sonuç elde edilmediği takdirde diğer yöntemler denenmiştir.



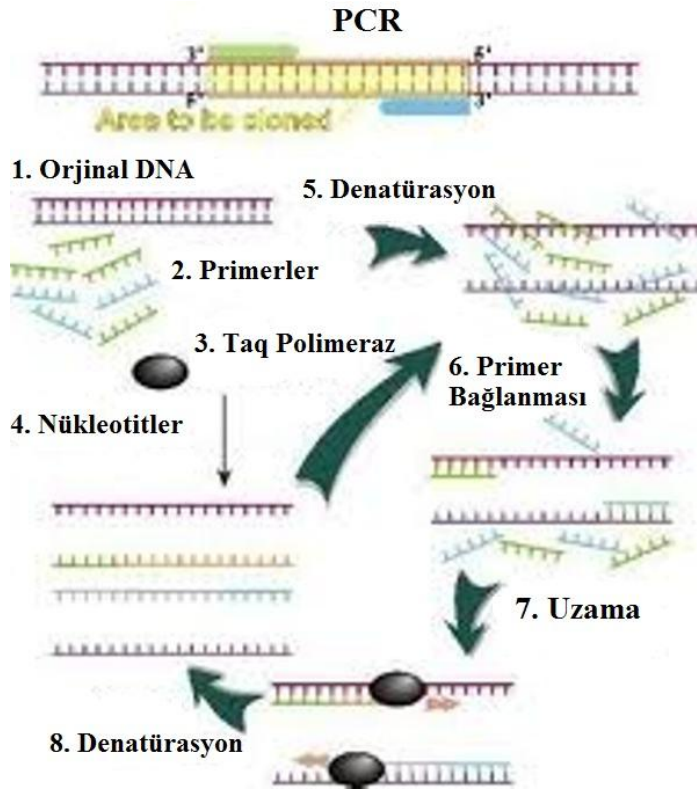
Resim 3.1. İzole edilen DNA

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bir in vitro ve in vivo DNA amplifikasyon metodudur, reaksiyonlar farklı sıcaklıklardaki üç olayın sikluslar halinde tekrarına dayanmaktadır. PCR ile DNA fragmentleri çoğaltılabilir ve çok küçük örneklerden analizler için yeterli miktarlar elde edilebilir.

PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Metod basitçe, tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. DNA örnekleri; analizi yapılacak olan genin belirli bölgesinin

çoğaltılmasını sağlayan in vitro DNA sentezi yöntemi olan şartları ayarlanmış PCR'a uygulanır. Yöntemin esası; yüksek ısı uygulamasıyla çift sarmallı DNA'nın denatüre olması (denatürasyon), spesifik oligonükleotid primerlerin komplementeri oldukları zincire bağlanmaları (annealing) ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi olan Taq DNA polimeraz ile uzamalarından oluşan DNA replikasyon mekanizmasına dayanmaktadır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR ; 94 °C-98 °C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37 °C-65 °C aralığında gerçekleştirilen primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de gerçekleştirilen uzama aşamalarının belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır.



Resim 3.2. PCR süreci

Daha önce genomik DNA protokollere uygun bir şekilde, periferik kandan izole edilmiştir. Primerler kodlanmayan bölgelerde özellikle MSX1 geninin ekzon 2 kodlama bölgesini kapsayan fragmentleri çoğaltmak için kullanılmıştır. (ekzon 2 için primer 2F ve 2R; Çizelge 3.1)

Polimeraz zincir reaksiyonunda izole edilmiş olan 20µl yoğunluk içeren 50 ng genomik DNA, 1 x PCR tamponu, 1,9-2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM primerlerden biri, 0,5 U Taq polimeraz, şu parametrelerle: 40s 94°C’de, 40s bağlanma sıcaklığı ve 40s 72°C’de 34 döngü için kullanılmıştır. (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1 MSX1 mutasyon analizleri için oligonükleotitler ve PCR koşulları

İsim	PCR 5’-3’ için primer dizisi	Ürün boyutu (bp)	Bağlanma sıcaklığı
G267C			
2F	GGCTGATCAT GCTCCAATGC	448	94°C
2R	CACCAGGGCTGGAGGAAT	448	72°C

3.2.3. Restriksiyon endonükleazla kesim

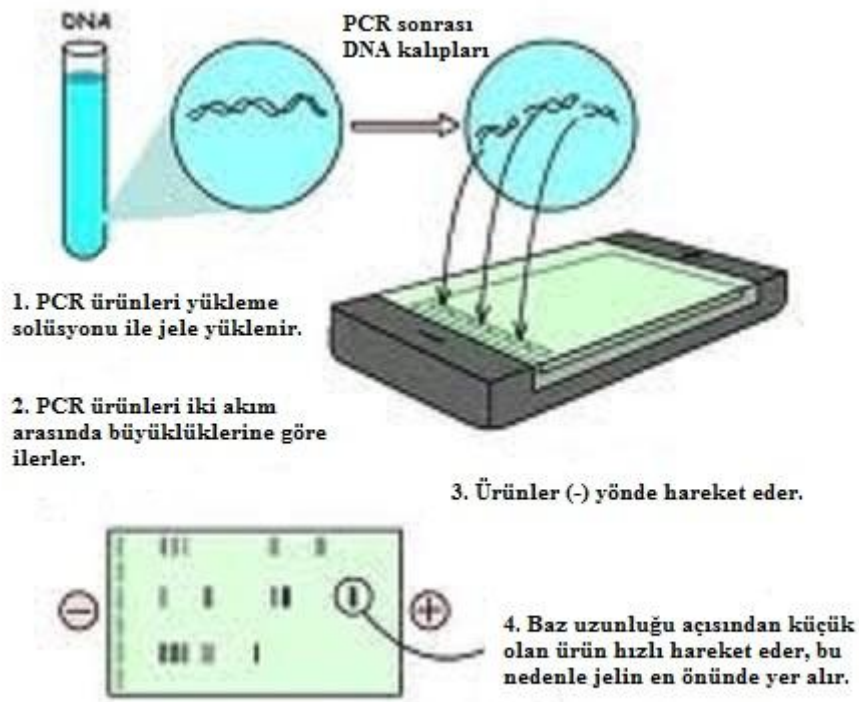
İnsan genomunda tek baz değişiklikleri çok sıktır. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nükleotit değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır. DNA polimorfizmi (gen değişimi), DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi (RE) kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa; kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) “Restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmleri” denilmektedir.

Çalışmamızda PCR’ da gerekli çoğaltmalar yapıldıktan sonra, MSX1 genindeki nükleotidlerin değişimini tanıyan DdeI restriksiyon endonükleazı kullanılarak bu gendeki nokta değişimleri tespit edilmiştir.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez; bir elektriksel alanda elektrik yüklü moleküllerin (nükleik asit, protein gibi) akımdan etkilenecek göç etmeleri olarak ifade edilir. Protein ve nükleik asitlerin belirli bir pH’da bir elektrik alanında ve iyonize ortamda molekül büyüklüğü ve/veya

yük farklarına göre ayrılma prensibine dayanır. İyonize olabilen bileşiklerin katyon (+) ve anyon (-) şeklindeki iyonların çözelti içerisindeki elektriksel alanda değişik şekilde göç etmesi elektroforezin prensibini oluşturur. DNA, elektroforezde anyondan (-), katyona (+)'a doğru hareket eder.



Resim 3.3. Agaroj jel elektroforezi

%2'lik agaroj jelde, elektroforezde yürütülerek DNA parçalarının ayrımı sağlanmıştır. TBE5X tamponu kullanılmıştır. Jel UV transilluminatörde görüntülenerek, sonrasında fotoğrafı çekilmiştir.



Resim 3.4. UV transilluminatör ile jel görüntüleme

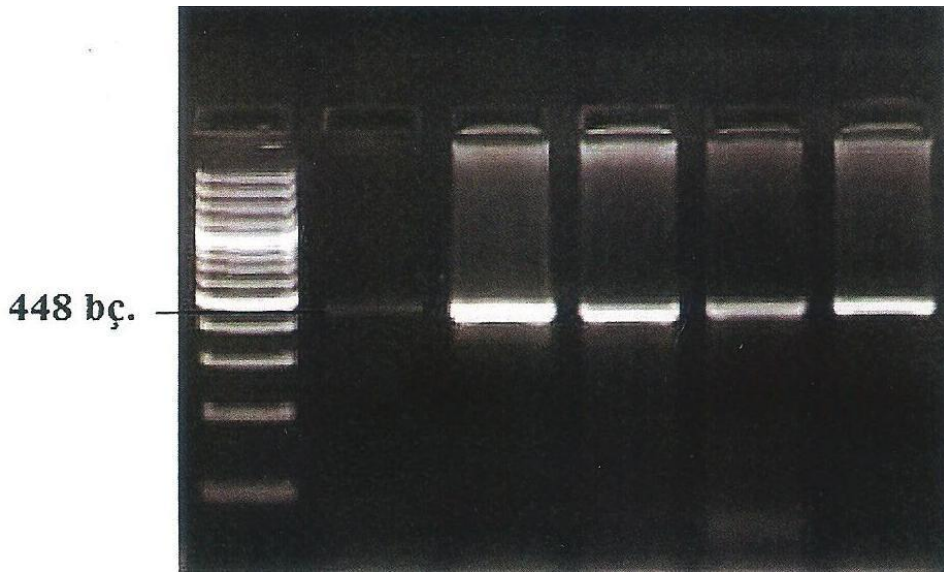
3.2.5. İstatiksel analiz

İstatiksel analiz için; Pearson Ki-Kare testi, Hardy Weinberg equilibrium eşitliği ve Odds ratio testleri uygulanmıştır. Hardy Weinberg'in eşitliği ve Pearson Ki-Kare testi sendromsuz dudak damak yarıklı Türk hastaların genotip ve alel frekanslarının saptanmasında kullanılmıştır. Hardy Weinberg eşitliği ile, beklenen ve gözlenen değerler arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı değerlendirilecek, böylece elimizdeki Türk hasta popülasyonunun genotip yapısının, Hardy-weinberg kuralı ile uyumlu olup olmadığı saptanmış olacaktır. Pearson Kikare testi ile, kontrol grubu ve hastalardaki gen değişimleri incelenerek, aralarında anlamlı bir farklılık olup olmadığına bakılarak, gen değişiminin hastalık üzerine etkisi değerlendirilecektir. Odds ratio testi ise olasılık oranının hesaplanmasında kullanılmıştır.

4. BULGULAR

MSX1 geninin G267C bölgesinin, sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklığı hastalığı ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için, Türk hasta ve kontrollerden alınan örneklerle, kromozom 4p16'da yer alan MSX1 geninin G267C bölgesindeki polimorfizmlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu yüksek lisans tez çalışması ile, 70 hasta birey (20 kadın 50 erkek) ve 89 kontrol grubundan alınan örnekler incelenmiştir. İncelemeler MSX1 geninin ekzon 2 bölgesindeki G267C bölgesinde gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonunun belirtilen fenol kloroform metoduyla gerçekleştirilmesi sonrasında, PCR yöntemi ile gerekli gen bölgesi çoğaltılarak jelde görüntülenmiştir. (Resim 4.1)

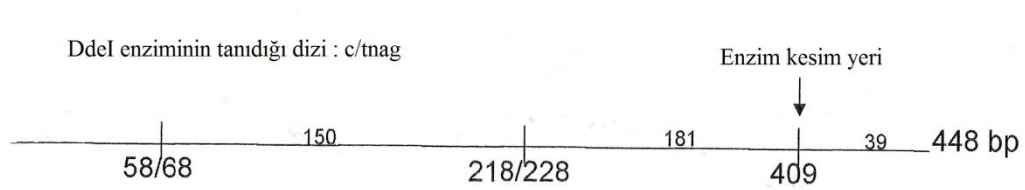


Resim 4.1 DNA izolasyonu sonrası PCR'la çoğaltılan gen ürünlerinin jel görüntüsü

PCR metodu ile gen ürünlerinin görüntülenmesi sonrasında, bu ürünlerin DdeI enzimi ile RFLP metodu gerçekleştirilmiştir. Bu metod için, G267C bölgesinin MSX1 geni içerisindeki lokalitesi, DdeI enziminin, kesim için tanıma bölgesi olan “c/ttag” ve kesim yeri tespit edilmiştir. (Şekil 4.1) (Şekil 4.2)

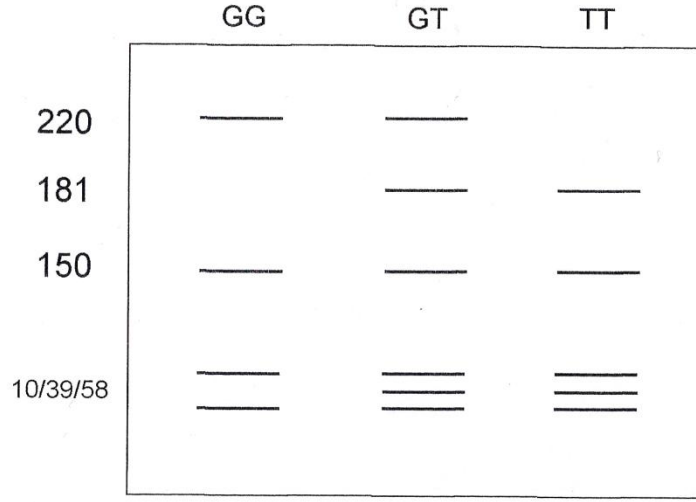


Şekil 4.1. G267C bölgesinin MSX1 geni içerisindeki lokalitesi

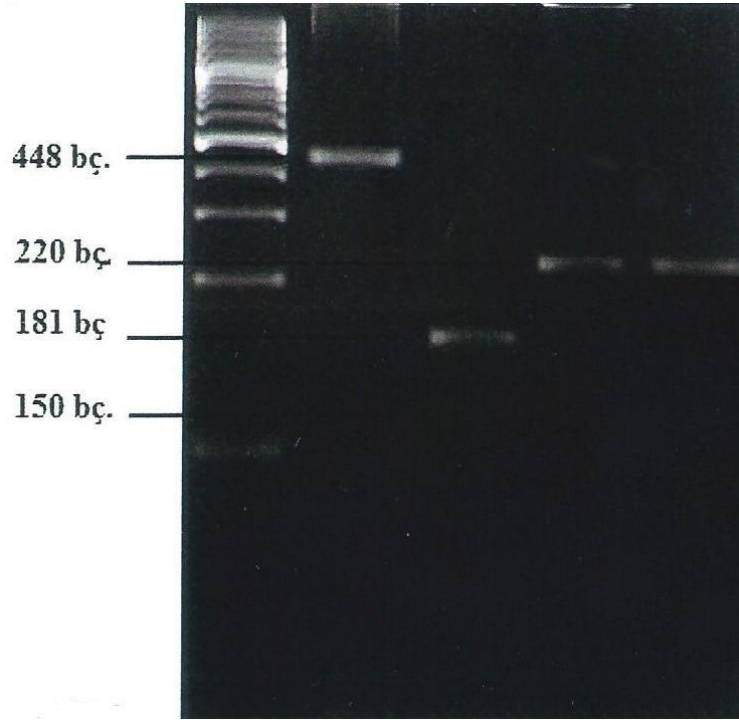


Şekil 4.2. DdeI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri

RFLP metodu için gerekli koşullar sağlandıktan sonra, Dde I restriksiyon enzimi ile kesim gerçekleştirilmiş ve jelde görüntülenmiştir. (Resim 4.2)



Şekil 4.3 Restriksiyon endonükleazla kesim sonrasında beklenen tablo



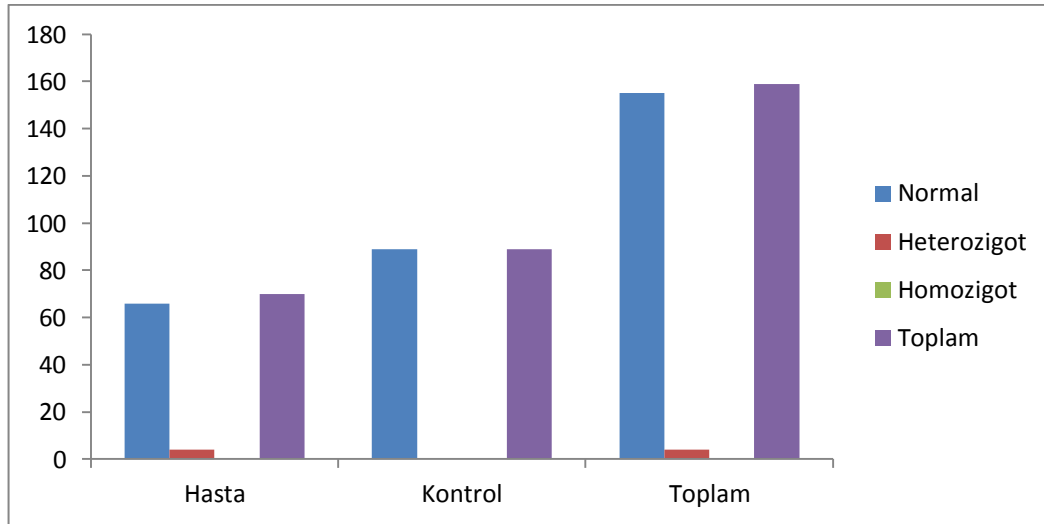
Resim 4.2. Restriksiyon endonükleazlarla kesim sonrasında oluşan ürünlerin jel görüntüsü

5. SONUÇ

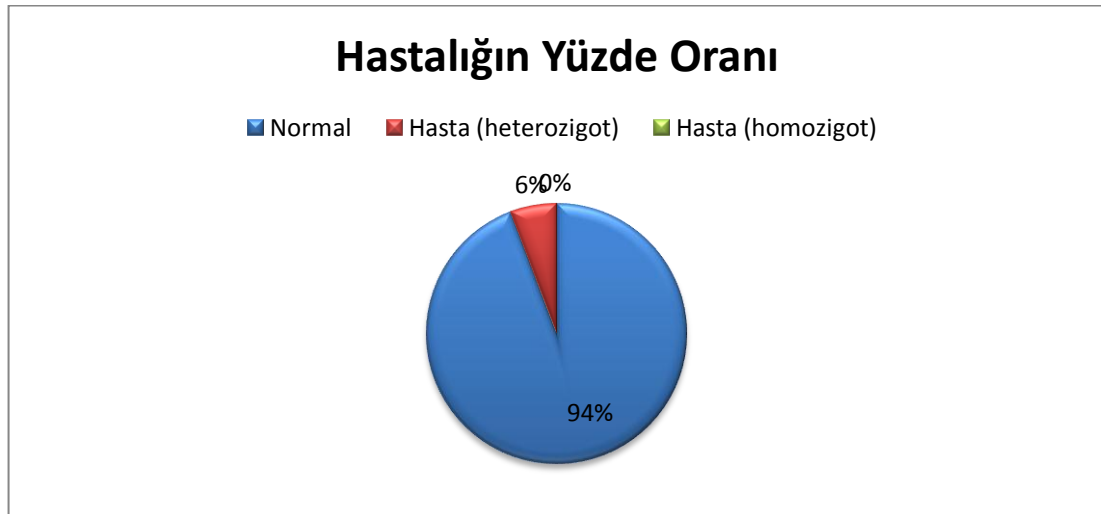
Sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklı Türk hastalarla yapılan polimorfizm çalışmasında, çalışmada kullanılan 70 hasta DNA örneğinin, 4 hastada gen değişimi belirlenmiştir. Bu 4 bölgede de tek nükleotit değişimi (SNP) gerçekleşmiştir, bunların 4'ü de heterozigot (GT) olarak belirlenirken, homozigot (TT) olgu gözlemlenmemiştir. 89 bireyin bulunduğu kontrol grubunda ise, heterozigot ve homozigot (0 heterozigot GT, 0 homozigot TT) olguya rastlanmamıştır (Çizelge 5.1) (Şekil 5.1).

Çizelge 5.1 Hasta ve kontrol gruplarında heterozigot ve homozigot olguların dağılımı

Birey	Normal	Heterozigot	Homozigot	Toplam
Hasta	66	4	0	70
Kontrol	89	0	0	89
Toplam	155	4	0	159



Şekil 5.1 Hasta ve kontrol gruplarında heterozigot ve homozigot olguların grafikte gösterilmesi



Şekil 5.2. Hastalığın yüzde oranı

Çizelge 5.2. Sendromsuz dudak damak yarıklı 70 Türk hastada bulunan MSX1 geni G267C bölgesi gen değişimi

Ekzon intron	Allelik varyant	Aminoasit değişikliğinin olduğu gen	Aminoasit değişikliğinin olduğu gen bölgesi	Heterozigot sıklığı	Homozigot Sıklığı
Ekzon 2	GG→GT	MSX1	G267C	4	0

5.1. İstatiksel Analiz

Yapılan istatiksel değerlendirmelerde, yüzde olarak heterozigot hasta sayısı %5.7 olarak belirlenmiştir. Bu oran ışığında, MSX1 geni G267C bölgesinin sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığı arasında belirgin bir ilişki olduğu ortaya çıkmaktadır. (Çizelge 5.3)

Çizelge 5.3. Hasta ve kontrol gruplarında gözlemlenen heterozigot ve homozigot olguların yüzde oranının istatistiksel tablosu

			grup		Total
			kontrol	hasta	
Sonuç	normal	Count	89	66	155
		% within Sonuç	57.4%	42.6%	100.0%
		% within grup	100.0%	94.3%	97.5%
	heterozigot	Count	0	4	4
		% within Sonuç	.0%	100.0%	100.0%
		% within grup	.0%	5.7%	2.5%
Total	Count		89	70	159
	% within Sonuç		56.0%	44.0%	100.0%
	% within grup		100.0%	100.0%	100.0%

İstatistiksel hesaplamalar sonucunda, Pearson Kikare testine göre, sonuç $p = 0.036$ olarak bulunmuştur. $P < 0.05$ olduğu için sonuç anlamlıdır. (Çizelge 5.4) (Çizelge 5.5) Pearson Kikare testine göre, hasta grubunda heterozigot olma oranı normal bireylere göre daha yüksektir. MSX1 geni G267C bölgesinde meydana gelen polimorfizmler, sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığının oluşmasında önemli derecede etkili bulunmuştur.

Çizelge 5.4. Pearson kikare testi sonuçları

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5.217 ^b	1	.022		
Continuity Correction ^a	3.147	1	.076		
Likelihood Ratio	6.695	1	.010		
Fisher's Exact Test				.036	.036
Linear-by-Linear Association	5.184	1	.023		
N of Valid Cases	159				

Çizelge 5.5. Pearson kikare testi anlamlılık

Pearson Kikare Testi	
P değeri	Anlamlılık
0.036	Anlamlı

İstatiksel analizlerden bir diğeri olan Hardy Weinberg Equilibrium testi (HWE), Hasta ve kontrol gruplarına ayrı ayrı uygulanmıştır. Hasta grubunda, Hardy Weinberg equilibrium Chi-square ($p = 0.831824$) ve G-square ($p = 0.766414$) sonuçları bulunmuş, her iki sonuç $p < 0,05$ olduğu için Hardy Weinberg dengesinden sapma olmadığı saptanmıştır. (Çizelge 5.6) Hardy Weinberg dengesine göre, MSX1 geni G267C bölgesindeki gen değişimleri, sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığı için bir etki teşkil etmemektedir.

Hardy Weinberg Equilibrium için Chi-Square Testi:

Chi-Square: 0.045098

Güven aralığı : 1

Olasılık: 0.831824 ($p = 0.831824$)

Hardy Weinberg Equilibrium için Olabilirlik Denge Oran Testi:

G-Square : 0.088250

Güven aralığı: 1

Olasılık: 0.766414 ($p = 0.766414$)

Çizelge 5.6. Hardy Weinberg testi sonuç

Hardy Weinberg Equilibrium Testi		
Chi-Square Testi	G-Square Testi	Sonuç
$p = 0.831824$	$p = 0.766414$	Hardy Weinberg dengesinden sapma yok

Hardy Weinberg Equilibrium testi, kontrol grubuna uygulandığında, grup içerisinde hiç heterozigot ve homozigot bulunmadığı için, (heterozigot=0, homozigot=0) Hardy Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı hakkında bir değerlendirme yapılamamıştır.

İstatiksel değerlendirmede son olarak Odds ratio testi sonuçları dikkate alınmıştır. Odds Ratio testi beklenen ve gözlenenin birbirine oranı şeklinde hesaplanan bir testtir, Bu nedenle, yaptığımız çalışma değerlendirildiğinde, kontrol grubunda hiç heterozigot ve homozigot bireyin olmaması nedeniyle, Odds ratio testi hesaplamalarında paydanın sıfır bulunması sebebiyle bir belirsizlik ifadesi ortaya çıkardığı için, odds ratio testine göre anlamlı ya da anlamsız bir sonuç elde edilememiştir.

Sonuç olarak; MSX1 geni dudak-damak yarıklarında etkili olan önemli genlerden biridir. Etkisi birçok ülkede yapılan çalışmalarla kanıtlanmış, görölme sıklığı ve oranları belirlenmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışmasının MSX1 geni G267C bölgesinde meydana gelen gen değişimleri analizlerinin ve istatiksel hesaplamalarının gerçekleştirilmesiyle bu gen bölgesinin sendromsuz dudak ve/veya damak yarıklı Türk hastalarda genetik risk faktörü olup olmadığını belirlenmiştir. Yüzde oranın 5.7 gibi önemli bir oran olarak bulunması ve istatistiksel analiz sonuçlarının genellikle anlamlı bulunması, bu gen bölgesinin hastalığın oluşumundaki etkisinin olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Fakat bu konuda daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır. Türkiye’de bu alanda bazı çalışmalar yapılmış olsa da, temelleri moleküler analize dayalı çalışmalar oldukça kısıtlıdır, bu yüzden moleküler analiz temeline dayalı, büyük aile ve populasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bu alanda birçok ülkede çalışma olmasına rağmen Türkiye’de bu çalışmaların sayısının çok az olması ve moleküler analizlerin azlığı yapmış olduğum tezin önemini artırmaktadır. Amacımız, bu tez çalışması ile hem ülkemizdeki hem de uluslararası nitelikte MSX1 geni ile ilgili yapılan çalışmalara ışık tutmaktır. MSX1 geninin sendromik olmayan dudak-damak yarıklı Türk hastalarda ne oranda etki ettiğini belirlemek, Türkiye’de ve Dünyadaki diğer çalışmalarla karşılaştırma fırsatı sunmaktır. Bu tez çalışması ile, gebeliğin ilk aşamalarında bu hastalık belirlendiğinde, bu defekt tam olarak ortadan kaldırılamayacak olsa bile, hasarın boyutlarını daha aza indirgenebilecek, etkileri azaltılabilecek çalışmalara imkan sağlayacak olmasını hedeflenmektedir.

6. TARTIŞMA

Dünya çapında oldukça yaygın, çok genli bir kongenital defekt olan sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığı üzerinde geniş çaplı araştırılmasına rağmen, etiyojisi kompleksliğinden dolayı büyük oranda bilinmemektedir. Birçok genetik ve çevresel faktörlerin sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığının gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir.

Fakat bu genetik ve çevresel faktörlerin niteliğinin tam olarak belirlenmesi için, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışılan aday lokuslar sonucunda elde edilen bilgiler, çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır. Farklı birçok genle farklı sonuçlar bulunması, farklı toplumlarda farklı yatkınlık yapıcı genlerin katkısının belirgin olarak değişken olabileceğini düşündürmektedir.

Sendromsuz dudak damak yarıklığında etkili genlerin en önemlilerinden biri MSX1 genidir. MSX1 geni bir transkripsiyon faktörüdür ve diğer homeobox proteinleri ile etkileşime girerek transkripsiyonun regülasyonunu sağlamaktadır, diğer transkripsiyon kompleks komponentleri ve çekirdek bileşenleri ile birlikte transkripsiyon baskılayıcı rolünü üstlenir. Bu mekanizmada meydana gelen mutasyonlar sonucunda embriyonel gelişim esnasında hasarlar meydana gelir, bunların en önemlilerinden biri sendromsuz dudak ve damak yarığıdır.

MSX1 geni ve dudak damak yarığı ile farklı populasyonlarda yapılan çalışmalar genin hastalık üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Norveç'te 174 CL/P vakasından 18'inde, 88 CPO vakasından 25'inde yarıklılığa neden olan TGFA, TGFB3 ve MSX1 genlerinin etkili olduğu gözlemlenmiş, bu genler arasında MSX1 geni istatistiksel analiz sonuçlarında bulunan değerlerin anlamlı olduğu ve hastalığın oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır [10]. Kore'de 23 erkek ve 13 bayanla yapılan bir başka çalışmada ise, ekzon 1 de 253 baz çifti bölgesindeki "G" nükleotidinin "A" nükleotidinin yerine, 255 baz çifti bölgesine "G" nükleotidinin eklendiği gözlemlenmiş, ekzon 2'de 11 baz çifti bölgesindeki "C" nükleotidi yerine 351 baz çifti bölgesindeki "A, T, G" nükleotidlerin eklenmiş ya da 352 baz çifti bölgesine "T, A" nükleotidleri eklenmiştir. Protein analizlerinde, Thr85ala'da

missense mutasyon olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar MSX1 genindeki spesifik mutasyonların Kore'deki sendromsuz dudak damak yarığının oluşmasında çok önemli bir rolü olduğunu göstermiştir [78]. Danimarka'da yapılan bir çalışmada ise, istatistiksel analiz sonuçları MSX1 geni için bulunan değerler anlamlı olduğu belirlenmiştir [79]. Hindistan Bengal'de yapılan bir çalışmada, genom tarama çalışmaları sonuçlarına göre, çoklu kromozomal bölgelerin dudak damak yarıklığı ile pozitif ilişkide olduğunu belirtmektedir, fakat Bengal popülasyonu ile genetik yatkınlık bakımından örtüşen Türk ve İngiliz popülasyonlarında hastalığın görülme oranının Shanghai Çin'deki sonuçlardan düşük olduğunu vurgulamaktadır [82]. Bir diğer çalışmada Kolombiya'da, 43 erkek ve 50 bayanla gerçekleştirilen incelemeler sonucunda bulgular MSX1 geni ile CL/P arasında pozitif bir ilişki olduğunu doğrulamıştır [84]. Letonya'daki bir çalışmada ise, 107 Letonyalı hasta DNA örneği ile 351 kontrol grubu karşılaştırılmış, sonuç olarak MSX1 geninin hastalığın oluşmasında etkili bir gen olduğu desteklenmiş ve Letonya'nın Avrupa'da hastalığın prevalansının en yüksek olduğunu ülkelerden biri olduğu belirtilmiştir [85].

Dudak-damak yarığının Hindistan Japonya ve Çin'de yüksek oranda görülmesinin rapor edilmesi, Afrika'da ise en düşük oranda görülmesinin sebebinin bu hastalığın orjininin Asya olabileceğini akla getirmektedir. Hastalık oranlarının Asya'da 1000'de 4.04'e kadar yükselip, Afrika'da 1000'de 0.18'e kadar düşmesi bu yorumu desteklemektedir. Kuzey Amerika yerlilerinde ve Asyalılarda oranın yaklaşık olarak 500'de 1 (en yüksek), Kafkas popülasyonunda 1000'de 1, Afrika kökenli popülasyonlarda ise 2500'de 1'dir. Asyalılar arasında en yüksek oranın Japonya'da olduğu sanılmaktadır. Latin Amerikalılarda yaygınlık oranı Kafkas ve yerli Amerikalılardan daha düşüktür ancak yine de yerli Afrikalılardan daha yüksektir [103]. Kuzey Avrupalı, Asyalı, Amerikan yerlileri ve Avusturalyalılarda daha çok yarık dudak ve damak bir arada bulunmaktadır. Aksine Afrikalılarda ise sadece yarık dudak daha sık görülmektedir [3].

MSX1 geninin diğer gen bölgeleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında; Filipin'de 1.098 hasta ile yapılan bir çalışmada, MSX1 geni ekzon 1'de yer alan P147Q bölgesinde missense mutasyonlar belirlenmiş, bu nokta mutasyonların %6 oranında CPI'ye sebep olduğu görülmüş, fenotipte çift taraflı dudak ve damak yarığı

gözlemlenmiştir [86]. Tayland’ da yapılan bir çalışmada, P147Q bölgesindeki patojenik mutasyonların Vietnam (% 2) ve Filipin (% 0.15) populasyonlarında baskın olduğunu, Tayland populasyonunda bu bölgede patojenik mutasyonlara rastlanmadığını belirtmektedir. Aynı çalışmada ekzon 2’de yer alan P278S bölgesinin hastalıkla ilişkili olduğunu gözlemlenmiştir ve böylece MSX1 geninin ekzon 2 bölgesinin ekzon 1 bölgesi karşılaştırıldığında ekzon 2 bölgesinin önemli ölçüde daha az varyasyon göstermesi nedeniyle daha korunmuş olduğu sonucuna varılmıştır. Tayland’daki bu çalışmada, MSX1 geninin G267C bölgesinin prevalansı oldukça yüksek bulunmuş, Pearson kare testine göre sonuç ($p=0.285$) anlamlı, Hardy Weinberg testleri kontrol grubunda ($p=0.93$), hasta grubunda ($p=0.96$) olarak bulunmuş ve Hardy Wienberg dengesinden sapma olmadığı sonucuna varılmıştır [81].

Ayrıca hastalığın siyah ırkta düşük oranda görülmesi, beyaz ırkta ise daha yüksek oranda görülmesi, Türkiye’nin de bir Asya ülkesi olması ve bu tez çalışması ile bulunan sonuçların anlamlı olması sonucu bu durumu desteklemektedir. Bu çalışma, MSX1 genindeki gen değişimlerinin %5.7 oranında hastalık etkeni olduğunu göstermektedir ve Tayland’da yapılan çalışma ile uyumludur.

Sendromsuz dudak ve/veya damak yarığı hastalığı, birçok genin etkilediği ve ayrıca çevresel sebeplerin sebep olduğu, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu faktörler farklı şekillerde, farklı populasyonlarda CL/P hastalığına katkı sağlarlar. Türkiye’de ise, çok az sayıda istatistiksel çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Gazi Üniversitesi hastanesinde 1988 - 2005 yılları arasındaki 17.259 canlı doğumların 5/10.000’inde oral dudak-damak yarığı saptanmıştır. Hacettepe Tıp Fakültesinde yapılan başka araştırmada 1.229 yarık damak- dudak vakasının %19’unu izole dudak, %35,6’sını izole damak, %45’ini hem dudak hem damak yarığı oluşturmuştur. Türk populasyonunda yapılan bu çalışma ile MSX1 geninin bir gen bölgesinin (G267C), hastalığa etkisi açıkça ortaya konulsa da, bu genin diğer gen bölgelerinin ve bu hastalığı etkilediği düşünülen diğer genlerin ayrı ayrı çalışılmasına ihtiyaç vardır. Daha fazla moleküler temelli mutasyon ve populasyon çalışmaları aydınlanmayı beklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Stainner P., Moore GE., "Genetics of cleft lip and palate: Syndromic genes contribute to the incidence of nonsyndromic clefts" **Human Molecular Genetics.**, 13: Review issue 1 (2004).
2. Mossey PA., Little J., "Epidemiology of oral clefts: An international perspective: Wyszynski DF, editor. Cleft lip and palate: From origin to treatment" **Newyork : Oxford University pres.** (2002).
3. Gorlin R.J., Cohen M.M.C, Levin L.S., "Syndromes of the Head and Neck" **Oxford University Press, Oxford** (2001).
4. Fogh-Andersen P., "Inheritance of harelip and cleft palate" **Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck Copenhagen** (1942).
5. Jones MC., "Facial clefting: Etiology and developmental pathogenesis" **Clin Plast. Surg.**, 20:599–606 (1993).
6. Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri N.E., "Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited" **Cleft Palate Craniofac J.**, 33: 406–417 (1996).
7. Burdick AB., Bixler D., Puckett C.L., "Genetic analysis in families with Van de Woude syndrome" **Journal Craniofacial Genetics**, 5: 181-208 (1985).
8. Vander Boogard MJ., Dorland M., Beemer FA., Van Amstel H.K., "MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans" **National Genetics**, 24: 342-348 (2000).
9. Jugessur A., Rolv T. Lie, Allen J. Wilcox, Jeffrey C. Murray, Jack A. Taylor, Ola D. Saugstad, Hallvard A. Vindenes, Frank Abyholm, "Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: A case-parent triad analysis" **Genetic Epidemiology**, 24: 230-239 (2003).
10. Murray J.C. "Face facts: Genes, environment, and clefts" **Am. J. Hum. Genet.**, 57:227–232 (1995).
11. Marie-Jose H., Van den Boogard, Dominique de Costa, Ingrid P. C. Krepels, Fan Liu, Cock Van Duijn, Richard J. Sinke, Dick Lindhout, Regine P. M. Steegers-Theunissen. "The MSX1 allele 4 homozygous child exposed to smoking at periconception is most sensitive in developing nonsyndromic orofacial clefts" **Human Genetics.**, 124: 525-534 (2008).

12. Mary L. Marazita, PH.D L. Leighfield, PH. D. Margaret E. Cooper, MS., M.S.I.S. Rose Tobias, B. SC. Brion S. Maher, MS., PH. D. Suarakit Peanchitlertajorn, D.D.S, Ypu- E Liu, M.D. "Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: Assessment of candidate regions" **Craniofacial Journal.**, 39: 149-156 (2002).
13. Ferguson M.W., "Palate development" **Development**, 103 (Suppl.) 41—60 (1988).
14. Carinci F., Scapoli L., Palmieri A., Zollino I., Pezzetti F. "Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update" **International Journal of pediatric Otorhinolaryngology.**, 71: 1509-1519 (2007).
15. Fraser FC. "The genetics of cleft lip and cleft palate" **Human Genetics.**, 22: 336-52(1970).
16. Christensen K., Fogh Anderson P. "Etiological subgroup in nonsyndromic isolated cleft palate. A genetic, epidemiological study of 52 Danish birth cohorts" **Clinic Genetics.**, 46:329-35 (1994).
17. Moore K. L., Persaut T.V.N "İnsan Embriyolojisi " 6. Baskıdan çeviri, Editor: Yıldırım M. Okar İ., Dalçık H. **Nobel Kitabevleri** (2002).
18. Hoşnüter M., Aktunç E., Kargı E., Ünalacak M., Babuççu O., Demircan N., Işıkdemir A., "Yarık dudak damak aile rehberi" **Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.**, 9 : 9-13 (2002).
19. Coleman J.R., Sykes J.M. "The embryology, classification, epidemiology, and genetics of facial clefting" **Facial Plast. Surg. Clin. North. Am Feb.**, 9(1):1-13 2 (2001).
20. Anastassov G.E, Joos U. "Comprehensive management of cleft lip and palate deformities" **J. Oral Maxillofac. Surg. Sep.**, 59(9):1062-75; discussion 1075-7 3 (2001).
21. Rajesh P., Rajesh R., Narayanan V., Baig M.F., Prabhu V.R., Venkatesan A.A. "Clinical profile to assess the potential risk factors for cleft lip and palate" **J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent. Dec.**, 18(4):147-50 (2000)
22. Georgiade G.S., Georgiade N.G., Riefkohl R., Barwick W.J. "Textbook of plastic, maxillofacial and reconstructive surgery" **Williams and Wilkins**, pp:301-327 (1992).
23. Sözen M.A., Tolarova M.M., Spritz R.A. "BCL3 geni ve non-sendromik dudak/damak hastalığı: Bir ilişkilendirme çalışması" **Tıp Araştırmaları Dergisi** 5: 9-12 (2007).

24. Davis J.S., M.D; Ritchie H.P. M.D. "Classification of congenital clefts of the lip and palate: with a suggestion for recording these cases" *L. Am. Med. Assoc.* 79 (16): 1323-1327 (1922).
25. Kernahan D.A., Stark R.B. M.D. "A New Classification for Cleft Lip and Cleft Palate." *Plastic & Reconstructive Surgery & the Transplantation Bulletin*: November. 22 (5): 435-441 (1958).
26. Kernahan, D.A. "The striped Ya symbolic classification for cleft lip and palate" *Plast. Reconstr. Surg.* 47(5): 469 (1971).
27. Schwartz S., Kapala J.T., Rajchgot H., Roberts G.L. "Accurate and systematic numerical recording system for the identification of various types of lip and maxillary clefts (RPL system)" *Cleft Palate Craniofac. J.* 30(3): 330 (1993).
28. Gaggli A., Schultes G., Karcher H. "Aesthetic and functional outcome of surgical and orthodontic correction of bilateral clefts of lip, palate, and alveolus" *Cleft Palate Craniofac. J.*, 36(5):407-12 (1999).
29. Rohrich R.J., Love E.J., Byrd H.S., Johns D.F. "Optimal timing of cleft palate closure" *Plast. Reconstr. Surg.*, 106(2):413-21; quiz 422; discussion 423-5 (2000).
30. Kokavec R., Hedera J., Fedeles J., Janovic J., Kratka E., Klimova I. "New trends in the complex treatment in the cleft centre in Bratislava" *Bratisl Lek Listy*; 102(6):290-3 (2001).
31. Reinisch J.F., Bresnick S.D. "Bilateral cleft lip deformity" In: Bentz M.L., editors. *Pediatric Plastic Surgery. Stanford-Connecticut: Appleton & Lange*, 50-51 (1998).
32. Croen L.A., Shaw G.M. Wasserman C.R., Tolarova M.M. "Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California" 1983-1992. *Am. J. Med. Genet*; 79:42-7 (1998).
33. Vanderas A.P. "Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review" *Cleft palate J.*, 24:216-25 (1987).
34. Lidral A.C., Murray J.C., Buetow K.H., Basart A.M., Schearer H., Shiang R. "Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines" *Cleft Palate Craniofac J.* ;34:1-6 (1997).
35. Schutte B.C., Murray J.C. "The many faces and factors of orofacial clefts" *Hum. Mol. Genet*, .8:1853-9 (1999).

36. Gorlin R.J. Cohen M.M. Levin L.S. "Sendromes of the head and neck" **Newyork: Oxford University** pres. 693-700 (1990).
37. **Eurocat Special Report**. "Eurocat and Orofacial Clefts: The Epidemiology of Orofacial clefts in 30 European regions" Available at <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/pubdata/Publications.html>. Accessed April (2005).
38. Wong FK., Hogg U. : "An update an the aetiology of orofacial clefts" **Hong Kong Med. J.**, 10: 331-6 (2004).
39. Murray J.C. "Gene/environment causes of cleft lip and/ or palate" **Clinic Genetic**. 61: 28-56 (2002).
40. Borcbakan C. "An analysis of 1000 cases of cleft lip and palate in Turkey" **Cleft Palate J.**, 6: 210 (1969).
41. Kim S., Kim WJ., Oh C., Kim J.C. "Cleft lip and palate incidence among the live births in the republic of Korea" **J. Korean Med. Sci.** 17:49-52 (2002).
42. Lace B., Vasiljeva I., Dundure I., Barkane B., Akota I., Krumina A. "Mutation analysis of the MSX1 gene exons and intron in patients with nonsyndromic cleft lip and palate" **Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal**, 8:21-4 (2006).
43. Viera A.R., Orioli I.M., Castilla E.E., Cooper M.E., Marazita M.L., Murray J.C. "MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America" **Journal of Dental Research**, 82(4): 289-292 (2003).
44. Tunçbilek E. (ed). "Türkiye’de konjenital malformasyon sıklığı, dağılımı, risk faktörleri ve yenidoğanların antropometrik değerlendirilmesi" **Ankara TÜBİTAK Matbaası**, 94 (1996).
45. Tunçbilek G., Özgür F., Balcı S. "1229 Yarık dudak damak hastasında görülen ek malformasyon ve sendromlar" **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi** 47: 172-176 (2004).
46. Wyszynski D.F., Beathy T.H. "Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts" **Teratology**, 53(5): 305-17 (1996).
47. Sadler T.W. "Longman’s Medical Embriology" 6th ed. **Willians & Wilkons, Baltimore** 115-138 (1990).
48. Bender P.L. "Genetics of cleft lip and palate" **J. Pediatr. Nurs.** 15(4): 242-9 (2000).

49. Tolarova M.M., Cervenks J. "Classification and birth prevalence of orofacial clefts" *Am. J. Med. Genet.* 75 (2): 126-37 (1998).
50. Fraser F.C., Warburton D. "No association of emotional stress or vitamin supplement during pregnancy to cleft lip or palate in man" *Plast. Reconstr. Surg.*, 33:395-9 (1964).
51. Walker B.E. "Induction of cleft palate in rabbits by several glucocorticoids" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125:1281-4 (1967).
52. Shaw G.M., Lammer E.J. "Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts" *J. Pediatr.*, 134:298-303 (1999).
53. Walker B.E. "Induction of cleft palate in rats with antiinflammatory drugs" *Teratology*, 4:39-42 (1971).
54. Marazita M.L., Jaskoll T., Melnick M. "Corticosteroid-induced cleft palate in short-ear mice." *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 8:47-51 (1988).
55. Fawcett L.B., Buck S.J., Beckman D.A., Brent R.L. "Is there a no-effect dose for corticosteroid-induced cleft palate? The contribution of endogenous corticosterone to the incidence of cleft palate in mice" *Pediatr Res.*, 39:856-61 (1996).
56. Carmichael S.L., Shaw G.M. "Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies" *Am. J. Med. Genet.*, 86:242-4 (1999).
57. Rodríguez-Pinilla E., Martínez-Frías M.L. "Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: A case-control study" *Teratology*, 58:2-5 (1998).
58. Kirschner R.E., LaRossa D. "Cleft lip and palate" *Otolaryngol Clin. North Am.*, 33(6):1191-215 (2000).
59. Curtis E.J, Fraser F., Warburton D. "Congenital cleft lip and palate" *Am. J. Dis. Child*, 102: 853-57 (1961).
60. Bauer B.S. Vicari F.A. "Cleft palate" Georgiade G.S., Georgiade N.S., Riefkohl R., Barwick W.J., editors. "Textbook of plastic, maxillofacial and reconstructive surgery" *Baltimore: Williams & Wilkins*, 299- 306 (1992).
61. Wyszynski D.F., Zeiger J., Tilli M.T., Bailey-Wilson J.E., Beaty T.H. "Survey of genetic counselors and clinical geneticists regarding recurrence risks for families with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate" *Am. J. Med. Genet. Sep.* 23;79(3):184-90 (1998).
62. Smith H.W. "The atlas of cleft lip and cleft palate surgery" *New York, Grune & Stratton*, 123-130 (1983).

63. Alexandre R. Vieira, Joseph R. Avila, Sandra Daack-Hirsch, Ecaterina Dragan, Temis M. Fe'lix, Fedik Rahimov, Jill Harrington, Rebecca R. Schultz, Yoriko Watanabe, Marla Johnson, Jennifer Fang, Sarah E. O'Brien, Ieda M. Orioli, Eduardo E. Castilla, David R. FitzPatrick, Rulang Jiang, Mary L. Marazita, Jeffrey C. Murray. "Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate" *Plos Genetics*. 651-659 (2005).
64. Jagomagi T., Nikopensius T., Krjutskov K., Tammekivi V., Viltrop T., Saag M., Metspalu. "MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate" *European Journal of oral sciences*, 118: 213-220 (2010).
65. Wyszynski D.F., Albacha-Hejazi H., Aldirani M., Hammod M., Shkair H., Karam A., Alashkar J., Holmes T.N., Pugh E.W., Doheny K.F., McIntosh I., Beaty T.H., Bailey-Wilson J.E. "A genome-wide scan for loci predisposing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two large Syrian families" *Am. J. Med. Genet.*, Dec 1;123(2):140-7 (2003).
66. Field L.L., Ray A.K., Cooper M.E., Goldstein T., Shaw D.F., Marazita M.L. "Genome scan for loci involved in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in families from West Bengal, India" *Am. J. Med. Genet. A.*, Oct 15;130(3):265-71 (2004).
67. Roderick R., MCLNNEs, Jaques Michaud. "Yarık dudak ve/veya damak hastalığının çevresel ve genetik sebepleri" *Clinical genetic* (2002).
68. Lidral A.C., Romitti P.A., Basart A.M., Doetschman T., Leysens N.J., Daack-Hirsch S., Semina E.V, Johnson L.R., Machida J., Burds A., Parnell T.J., Rubenstein J.L.R., and Murray J.C.. "Association of MSX1 and TGFB3 with Nonsyndromic Clefting in Humans" *Am. J. Hum. Genet.*, 63:557–568 (1998).
69. Gezhi H. Lee H. Price S.M., Shen M.M., Abote-shen C. "MSX homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1" *Development*, 128: 2373-84 (2001).
70. Lee H.K. MSD PhD, Kim S.S. PhD, Son W.S. PhD. "Characteristics of MSX1 gene in Korean nonsyndromic cleft lip and palate individuals" *Korean J. Orthod.*, 38 (2): 133-143 (2008).
71. Laura E. Mitchell, Jeffrey C. Murray, Sarah O'Brien, and Kaare Christensen. "Evaluation of Two Putative Susceptibility Loci for Oral Clefts in the Danish Population" *American Journal of Epidemiology*, 153: 1007-1015 (2001).

72. Suzuki Y., Jezewski P.A., Machida J. DDS. PhD., Watanabe Y. MD., PhD., Shi M., MS., Margaret E. Cooper M.S., Viet L.T., Tin N.T.D., Hai H., Natsume N. DDS. PhD., Shimozato K. DDS. PhD., Marazita M.L., PhD. And Murray J.C., MD. "In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate" **Genet. Med.** 6(3): 117-125 (2004).
73. Tongkobpetch S., Siriwan P., Shotelersuk V. "MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population." **J. Hum. Genet.** 51: 671- 676 (2006).
74. Field L.L., Ray A.K., Cooper M.E., Goldstein T., Shaw D.F. and Marazita M.L.. "Genome Scan for Loci Involved in Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Families From West Bengal, India" **American Journal of Medical Genetics.** 130A:265–271 (2004).
75. Wu PA, Li YL, Fan GZ, Wang K. "Association study on microsatellite polymorphisms of MSX1 gene and nonsyndromic cleft lip and palate" **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.**, Jun;24(3):325-7 (2007).
76. Otero L., Gutiérrez S., Cháves M, Vargas C, Bermúdez L. "Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population" **Cleft Palate Craniofac J.**, Nov;44(6):653-6 (2007)
77. Alexandre R. Vieira, Liana Pliss, Inese Pelnena, Astrida Krumina, Viesturs Baumanis, Baiba Lace. "Mitochondrial DNA origins of the Latvian clefting population" **A.R. Vieira et al. / Mitochondrion**, 11: 357–359 (2011).
78. Andrew C. Lidral D.D.S, Jeffrey C. Murray M.D., Kenneth H. Buetow PH.D., Ann M. Basart, Heidi Schearer, Rita Shiang PH.D, Avelina Naval, Eriberto Layda M.D, Kathy Magee R.N, William Magee M.D. "Studies of candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines" **Cleft palate-Craniojournal**, 34 (1997).
79. Blanco R., Chakraborty R., Barton S.A., Carreno H., Paredes M., Jara L., et al. "Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population" **Hum. Biol.**, 73:81-9 (2001).
80. De Muynck S., Schollen E., Matthijs G., Verdonck A., Devriendt K., Carels C. "A novel MSX1 mutation in hypodontia" **Am. J. Med. Genet.**, 128:401-3. (2004).

81. Lace B., Vasiljeva I., Dundure I., Barkane B., Akota I., Krumina A. "Mutation analysis of the MSX1 gene exons and intron in patients with nonsyndromic cleft lip and palate" *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 8:21-4 (2006).
82. Suazo J., Santos J.L., Carreño H., Jara L., and Blanco R. "Linkage Disequilibrium between MSX1 and Non-syndromic Cleft Lip/Palate in the Chilean Population" *J. Dent. Res.*, 83(10):782-785 (2004).
83. Shimeld S.M., McKay I.J., Sharpe P.T. "The murine homeobox gene Msx-3 shows highly restricted expression in the developing neural tube" *Mech. Dev.*, 55:201-10 (1996).
84. Catron K.M., Wang H., Hu G. Shen, M.M., Abate-Shen C. "Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy." *Mech. Dev.*, 55:185-99 (1996).
85. Bendall A.J., Abate-Shen C. "Roles for Msx and Dlx homeo-proteins in vertebrate development" *Gene*, 247:17-31 (2000).
86. Catron K.M., Iler N., Abate C. "Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins" *Mol. Cell Biol.*, 13:2354-65(1993).
87. Catron K.M., Zhang H., Marshall S.C., Inostroza J.A., Wilson J.M., Abate C. "Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites" *Mol. Cell Biol.*, 15:861-71 (1995).
88. Semenza G.L., Wang G.L., Kundu R. "DNA binding and transcriptional properties of wild-type and mutant forms of the homeodomain protein Msx2" *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 209:257-62 (1995).
89. Zhang H., Catron K.M., Abate-Shen C. "A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the Nterminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1764-9 (1996).
90. Newberry E.P., Latifi T., Battaile J.T., Towler D.A. "Structurefunction analysis of Msx2-mediated transcriptional suppression" *Biochemistry*, 36:10451-62 (1997).
91. Zhang H., Hu G., Wang H., et al. "Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism" *Mol. Cell Biol.*, 17:2920-32 (1997).
92. Murthy J. and L. V. K. S. "Bhaskar. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts" *Indian J. Plast Surg.*, Jan-Jun; 42(1): 68-81 (2009).

93. Jeffrey C. Murray and Brian C. Schutte. "Cleft palate: players, pathways, and pursuits" *J. Clin. Invest.*, 113:1676–1678 (2004).
94. P. A. Jezewski, A. R. Vieira, C. Nishimura, B. Ludwig, M. Johnson, S. E. O'Brien, S. Daack-Hirsch, R. E. Schultz, A. Weber, B. Nepomucena, P. A. Romitti, K. Christensen, I. M. Orioli, E. E. Castilla, J. Machida, N. Natsume, J. C. Murray. "Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate" *J. Med. Genet.*, 40: 399–407 (2003).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ESMER Erva
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 24.09.1986 Trabzon
Medeni Hali : Bekar
Telefon : (0312) 4781612
Cep Telefonu : (0505) 8411558
Adres : 2.cad. 1145. Sok no:7/1 Öveçler ANKARA
Email : erva.esmer@hotmail.com
ervaesmer@gazi.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi-Moleküler Biyoloji	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi-Biyoloji	2009
Lise	Trabzon Lisesi (YDA)	2004

Yabancı Dil

İngilizce

İlgi Alanları

Kitap okumak, sinema, tiyatro