

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRAL TÜP DEFEKTİLİ (SPİNA BİFİDALI) HASTALARDA ZIC5
GENİNDEKİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ
Yasemin AŞKIN
08110201

Anabilim Dalı: Genel Biyoloji

Danışman : Prof. Dr. Vahit KONAR
İkinci Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

ARALIK-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRAL TÜP DEFEKTİLİ (SPİNA BİFİDALI) HASTALARDA ZİC5
GENİNDEKİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
Yasemin AŞKIN
(08110201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 07.11.2012

Tezin Savunulduğu Tarih: 10.12.2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Vahit KONAR (Sinop Üniv.)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr. M. Halit ELYAS (Fırat Üniv.)

Prof.Dr. A. Kadri ÇETİN (Fırat Üniv.)

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE (Düzce Üniv.)

Doç. Dr. Vesile YILDIRIM (Fırat Üniv.)

ARALIK-2012

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim sırasında benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, çalışmalarımı yönlendiren çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Vahit KONAR'a, tez konusunun belirlenmesi, hazırlanması ve laboratuvar aşamalarında büyük emeği olan ikinci danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, çalışmalarım sırasında tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. M. Halit ELYAS'a, Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye, Yrd. Doç. Dr. Deniz EROL'a, nöral tüp defektli hastaların kan örneklerinin toplanmasında büyük yardımlarını aldığımız Çocuk Cerrahisi AD. öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ahmet KAZEZ'e, Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARAÇ'a, Beyin ve Sinir Cerrahisi AD. öğretim üyelerinden Doç. Dr. Fatih Serhat EROL'a, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamızı destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne (FÜBAP Proje No: "TF. 11. 58"),

Doktora öğrenimim sırasında maddi anlamda desteğini aldığım TUBİTAK BİDEB kurumuna,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan aileme, her zaman her konuda beni destekleyip, maddi ve manevi olarak varlığını yanımda hissettiğim eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımıza anlam ve değer katan, yaşama sevincimiz biricik oğlumuz.....

YASEMİN AŞKIN
ELAZIĞ - 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nöral Tüpün Kapanması	2
1.2. Nöral Tüpün Kapanmasına Dair Teoriler	3
1.3. Sekonder Nörulasyon.....	4
1.4. Nöral Tüp Kapanma Defektleri	4
1.4.1. Anensefali	5
1.4.2. Ensefalosel ve Kraniyal Meningosel	5
1.4.3. Spina Bifida	5
1.4.3.1. Spina Bifida Aperta	6
1.4.3.2. Spina Bifida Okülta	7
1.5. İnsidans ve Prevalans.....	7
1.6. Patogenez	8
1.7. Tanı	8
1.8. Nöral Tüp Defektlerinin Oluşmasına Neden Olan Faktörler.....	9
1.8.1. Folik asit Eksikliği	9
1.8.2. Annede Yüksek Ateş.....	10
1.8.3. Annede Diabetes Mellitus.....	10
1.8.4. Annede Şişmanlık.....	10
1.8.5. Çevresel Kirleticilerle Teması.....	11
1.9. NTD'nin Genetiği.....	11
1.10. ZIC Gen Ailesi.....	12
1.11. Moleküler Teknikler.....	19
1.11.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	19

1.11.2. DNA Dizi analizi	20
1.12. Mutagenesis.....	21
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1. Hastaların Seçimi.....	23
2.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve Analizlere Hazırlanması	23
2.3. Demirbaş Malzemeler	23
2.4. Sarf Malzemeleri.....	24
2.5. Kandan DNA İzolasyonu	25
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi.....	26
2.6.1. Oligonükleotidler (Primerler)	26
2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	27
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Programı.....	28
2.6.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	28
2.6.4.1. Etidyum Bromür Hazırlanması	28
2.6.4.2. TBE Tamponu (5X)	28
2.6.5. %3'lük Agaroze Jel Hazırlanması	28
2.6.6. PCR Ürünlerinin Agaroze Jele Yüklenmesi	29
2.7. İstatistiksel Analizler	29
3. BULGULAR.....	30
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
5. ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40
EKLER.....	49
ÖZGEÇMİŞ	53

ÖZET

Nöral tüp defektleri (NTD), merkezi sinir sisteminin heterojen ve kompleks konjenital anomalilerindendir. Nöral tüpün beş kapanma bölgesi farklı genler tarafından kontrol edilmektedir. Annenin yetersiz beslenmesi, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi sağlık sorunları, kullandığı bazı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel kirleticiler gibi bazı faktörler de nöral tüpün hatalı kapanmasına neden olmaktadır. ZIC5 geninin nöral tüp kapanmasında rol oynadığı nakafit deney hayvanlarında yapılan analizlerle gösterilmiştir. ZIC5 yetersizliği farelerde nöral tüp defektlerini içeren pek çok anomaliye neden olmaktadır. İnsanda NTD'li hastalarda henüz ZIC5 geni için mutasyon taraması yapılmamıştır. Bu çalışmada spina bifidalı hastalarda ZIC5 genindeki mutasyonların araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada spina bifida teşhisi konmuş 100 hasta ve 100 sağlıklı kontrol bireyinden periferik kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Gendeki 2 ekzon bölgesindeki mutasyonların taranması için DNA dizileme yöntemi kullanıldı. Ekzon spesifik primerler kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinden DNA dizileme yapıldı.

Genin ilk ekzonunun untransle bölgesinin 38. bazında G→A değişimi tespit edildi. 2. ekzon için herhangi mutasyon ya da polimorfizm bulunmadı. G→A değişimi 100 NTD'li hastanın 68'inde (%68) GG genotipi, 18'inde (%18) AG genotipi, 14'ünde de (%14) AA genotipi tespit edildi. Kontrol grubunda ise 100 sağlıklı bireyin 66'sında (%66) GG genotipi, 15'inde (%15) AG genotipi, 19'unda da (%19) AA genotipi belirlendi. Hasta ve kontrol grupları arasında ZIC5 genotipleri veya allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($X^2= 1.06$, $df=2$, $p=0.5$; $X^2= 0.008$, $df=1$, $p=0.93$).

Sonuç olarak NTD etyopatogenezinde içinde genetik faktörlerin de rol oynadığı multifaktöryel nedenler rol oynamaktadır. Yapılan bu çalışmada bölgemizde, NTD gelişiminde ZIC5 allel sıklıklarındaki değişikliklerin etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu allel sıklığının oluşmasında ise çevresel faktörler etkili olmuş olabilir. Bu açıdan nöral tüp defekti etyolojisinin aydınlatılmasında daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Nöral Tüp Defekti, ZIC5 geni, Spina bifida, Konjenital anomali

ABSTRACT

The Investigation of ZIC5 Gene Mutations in Patients with Neural Tube Defects (Spina Bifida)

Neural tube defects (NTD) are a group of heterogenous and complex congenital anomalies of the central nervous system (CNS). Neural tube of five closure sites are controlled by different genes. Mother's malnutrition, high fever, hypertension, diabetes mellitus, obesity, using drugs and environmental pollutants are leading to the closure of the neural tube incorrect. Analysis demonstrate in nacaft experiment animals that ZIC5 gene plays a role in neural tube closure. ZIC5 deficiency causes many anomalies which contain neural tube defects in mice. Mutation screening hasn't been done for ZIC5 gene in patients with NTD in humans. In this study, it has been intended to investigate mutations in ZIC5 gene in patients with spina bifida.

In this study, isolation of DNA were performed from 100 patients who had been diagnosed with spina bifida and 100 healthy individuals's peripheral blood samples. DNA sequencing method was used for the screening of mutations in ZIC5 gene for two exon regions. DNA sequencing was performed from PCR products using the exon-specific primers.

G → A change has been detected in thirty eight basis in untranslated region (UTR) of first exon of the gene. There was no mutation or polymorphism for second exon. G → A change, the rates of GG, AG and AA genotypes 100 NTD disease were calculated as 68 in 100 (%68) GG genotypes, 18 in 100 (%18) AG genotypes, 14 in 100 (%14) AA genotypes, The rates of TT, TA and AA genotypes 100 control groups were calculated as 66 in 100 (%66) GG genotypes, 15 in 100 (%15) AG genotypes, 19 in 100 (%19) AA genotypes. There were no statistically significant differences between the patient and control groups with regard to genotypes and allele frequencies ($\chi^2= 1.06$, $df=2$, $p=0.5$; $\chi^2= 0.008$, $df=1$, $p=0.93$).

In conclusion, multifactoriel prosesess including genetic factors play role in etiopathogenesis of NTD. Results of the present study indicate that alterations in ZIC5 allele frequencies may influence development of NTD and that environmental factors may contribute to these alterations. Further studies are required to enlighten etiology of SB.

Keywords : Neural tube defect, ZIC5 gene, Spina bifida, kongenital anomaly

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. 18 ve 20 Günlük Embriyonun Arkadan Görünüşü.....	1
Şekil 2. Van Allen modeline göre nöral katlantıların birleşme noktaları.....	3
Şekil 3. İnsan embriyosunun nöral katlantılarının birleşimi.....	3
Şekil 4. İnsan embriyosunda nöral katlantıların birleşim alanları.....	4
Şekil 5. Anensefali.....	5
Şekil 6. Ensefalosel.....	5
Şekil 7. Spina bifida oluşumu.....	6
Şekil 8. ZIC genleri ve lokalizasyonu.....	13
Şekil 9. ZIC proteinlerinin domain yapısı.....	14
Şekil 10. Zinc finger'in şematik ve üç boyutlu yapısı.....	14
Şekil 11. İnsan ZIC genlerinin genomik organizasyonu.....	16
Şekil 12. PCR yöntemi.....	20
Şekil 13. ZIC5 Geninin 1. Ekzonu için 431 bp agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 14. ZIC5 Geninin 2. Ekzonu için 600 bp agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 15. ZIC5 genindeki GA genotipi için DNA dizileme görüntüsü.....	33
Şekil 16. ZIC5 genindeki GG genotipi için DNA dizileme görüntüsü.....	33
Şekil 17. ZIC5 genindeki AA genotipi için DNA dizileme görüntüsü.....	33

TABLÖLAR LİSTESİ

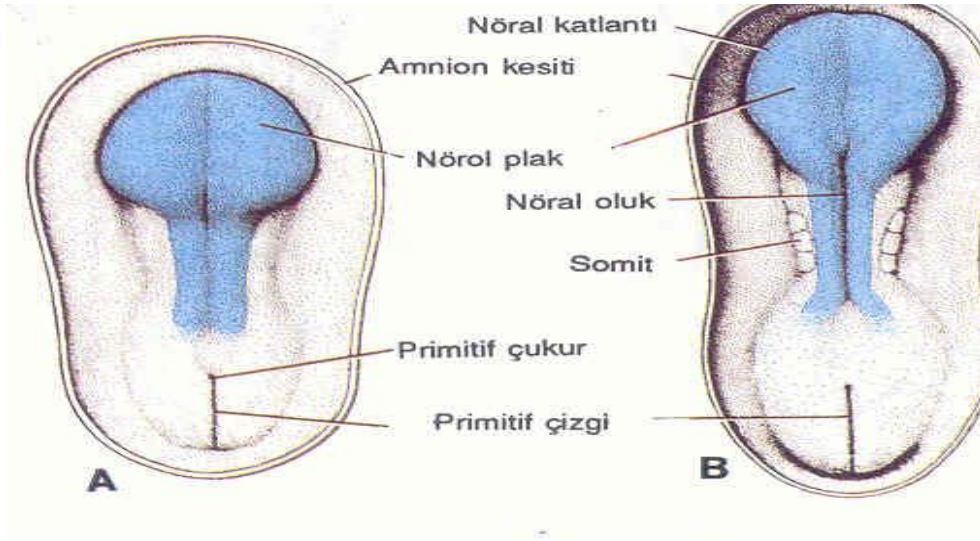
	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. ZIC5 genine ait primer dizileri.....	27
Tablo 2. Hastaların yaş, cinsiyet dağılımları ve anne yaşı.....	30
Tablo 3. Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	31
Tablo 4. ZIC5 Genine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR

SSS	: Santral Sinir Sistemi
NTD	: Nöral Tüp Defekti
HPE	: Holoprosensefali
SB	: Spina bifida
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı RNA
MTHFR	: Metil tetrahidrofolat redüktaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
dNTP	: Deoksinükleotid tri fosfat
DWM	: Dandy-Walker malformasyonu
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BMI	: Vücut Kitle İndeksi
RFC-1	: İnsan folat taşıyıcı gen
UCP2	: Uncoupling protein 2
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
UTR	: Untranslated regions
OPA	: Odd-paired gen
PCP	: Planar hücre polarite sinyali
DLHP	: Dorsolateral hinge points sinyali
BMP	: Kemik morfojenik protein
Shh	: Sonik hedhegog

1. GİRİŞ

Santral sinir sistemi, 3. haftanın başlarında, bir terlik şeklindeki kalınlaşmış ektoderm plağı (nöral plak) halinde belirmeye başlar. Bu plak, primitif çukurun önünde, mid-dorsal bölgede yer alır. Nöral plağın lateral kenarları çok geçmeden yukarıya doğru kabarak nöral katlantıları meydana getirir (Sadler, 1993) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. A. 18 Günlük embriyonun arkadan görünüşü. B. 20. Günde dorsal görünüm (Sadler, 1993)

Gelişimin daha ileri evrelerinde, nöral katlantıların kabarıklığı daha da artar, orta çizgide birbirine yaklaşıp birleşmeye başlar; kaudal ve sefalik yönde düzensiz bir biçimde ilerler ve sonuçta nöral tüpü oluştururlar. Tüpün kranial ve kaudal uçlarında birleşme gecikir. Kranial ve kaudal delikler oluşur. Kranial delik rostral nöropor (anterior nöropor) adını alır ve 25. günde kapanır. Kaudal nöropor (posterior nöropor) ise 2 gün sonra kapanır. Nöroporların kapanması, nöral tüpte kan damar sisteminin kurulmasıyla birlikte tamamlanır. Nöral tüp duvarları kalınlaşarak beyin ve omuriliği yaparlar. Nöral tüp lümeni, beyin ventrikül sistemine, omuriliğinki ise santral kanala dönüşür (Şeftalioğlu, 1998). Nöral oluğun yan kısımlarındaki nöral kristayı yapan bir grup hücre toplu şekilde göç ederek bir takım diğer yapıların yanında periferik sinir sisteminin büyük bir bölümünü oluşturur (Çimen, 2008).

Yeni kapanmış bir nöral tüpün duvarları, nöroepitelyal hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler, duvarın tüm kalınlığı boyunca uzanarak, kalın bir pseudostratifiye epitel oluşturur ve birbirleriyle lümendeki birleşim kompleksleri aracılığıyla bağlantı kurarlar. Nöral oluğun oluşumu sırasında ve tüpün kapanmasından hemen sonra, bu hücreler hızla bölünmeye başlayarak, giderek daha fazla sayıda nöroepitelyal hücre üretirler. Sonuçta bu hücre yığını, nöroepitelyal katman veya nöroepitelyum adı ile anılır (Sadler, 1993).

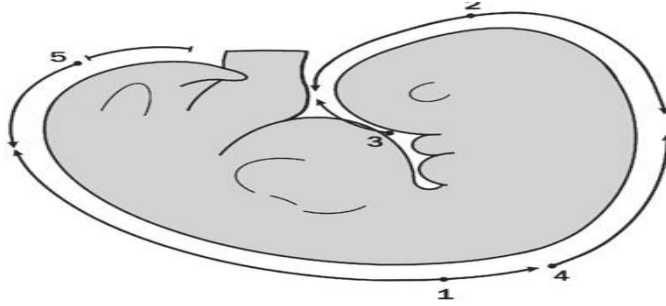
1.1. Nöral Tüpün Kapanması

Nöral tüpün kapanması için önemli olan spesifik sinyal yolları vardır. Bunlar; kapanmanın başlaması için gerekli olan PCP (planar cell polarity) sinyali, DLHP (dorsolateral hinge points) oluşumunu önleme yoluyla sonik hedgehog sinyali, DLHP'lerin önlenmesi için gerekli olan BMP (Bone morfojenik protein) sinyali, nörogenezisin regülasyonu yoluyla notch sinyali, bilinmeyen hücre mekanizması yoluyla retinoid sinyali ve protein kinaz C yoluyla protein fosforilasyonu ile inositol metabolizmasıdır (Copp ve Greene, 2009).

Nöral tüpün kapanması morfolojik olarak, nöral katlantının dorsal kenarlardan karşılıklı olarak birbirine yaklaşarak birleşmesi, temas bölgelerinde apoptozla birlikte epitelyal çökme ve nöroepitelyumun birleşmesini içerir. Shh ve Gli1, Gli2, Gli3'ün bölgeye özgü ekspresyonları hayvan embriyolarında nöral katlantı füzyon sürecini kontrol eden majör etkenlerdir. Gli1, orta hat nöral plak hücreleri tarafından eksprese edilir ve kısa sürede hücreleri birleştirir. Gli2 ve Gli3 tüm orta hat nöral plak hücreleri tarafından eksprese edilir. Gli1, Shh sinyalinde görev alır. Shh Gli2 transkripsiyonunu represe eder. Gli3 ve Shh de diğerlerini engeller. Gli1 ventral önbeynin nöronal farklılaşmasını indükler. Bunun aksine ventral spinal motor nöronlar Gli1 ve Gli2 tarafından indüklenir. Böylece, Gli proteinler hem pozisyonel bilgiyi hem de merkezi sinir sisteminde nöronal tipe özgü farklılaşmayı gerçekleştirirler (Padmanabhan, 2006). Bunun yanı sıra nöral tüpün kapanması için sitoskeletal proteinler, hücre siklusu/nörogenezisle ilişkili proteinler, hücre canlılığı ile ilişkili proteinler, hücre yüzey-extraselüler matriks interaksiyonları gibi kritik biyolojik fonksiyonu olan hücreler vardır (Copp ve Greene, 2009).

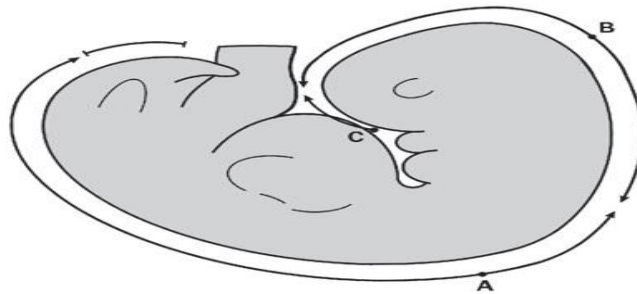
1.2. Nöral Tüpün Kapanmasına Dair Teoriler

İnsan ve fare embriyolarında çalışılan Van Allen modeline göre nöral katlantıların birleşme noktaları 5 bölgeden oluşur ve bu birleşmenin ilerlemesi 1. ve 2. kapanma noktalarından her iki yöne doğru olurken; 3, 4 ve 5. kapanma noktalarından tek yönlü olarak gerçekleşir (Padmanabhan, 2006). Rhombensefalon-spinal kord birleşimi birinci bölge, prosensefalon-mezensefalon birleşimi ikinci bölge, nöral katlantıların rostral uzantıları üçüncü bölge, rhombensefalonun kaudal bitiş kısmı dördüncü bölge ve L2 ve S2 arası kısım beşinci bölge olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.2).



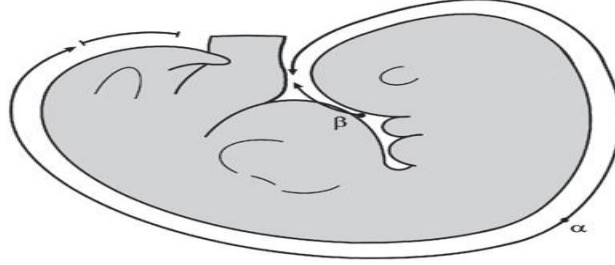
Şekil 1. 2. Van Allen modeline göre nöral katlantıların birleşme noktaları (Padmanabhan, 2006).

Kyoto toplantısında, insan embriyosunun nöral katlantılarının birleşiminin 3 başlangıç bölgesi olduğu belirtilmiştir (Şekil 1.3). Üst servikal bölgeden başlayan A bölgesi, rhombensefalon-mezensefalon birleşimindeki B bölgesi ve nöral oluğun rostral bitiş kısmında C bölgesi yer almaktadır. Birleşmenin ilerlemesi A ve B bölgelerinden itibaren 2 yönlü, C bölgesinden itibaren ise kaudale doğru tek yönlü olarak gerçekleşir (Padmanabhan, 2006).



Şekil 1.3. İnsan embriyosunun nöral katlantılarının birleşimi (Padmanabhan, 2006).

Nöral tüpün kapanmasına dair başka bir teoride ise, α ve β alanları olmak üzere iki ana birleşme başlangıç noktasının olduğu α bölgesinin kaudal rhombensefalik düzeyden; β bölgesinin nöral plağın rostral ekstremiteden başladığı ifade edilmiştir (Padmanabhan, 2006) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. İnsan embriyosunda nöral katlantıların birleşim alanları (Padmanabhan, 2006).

1.3. Sekonder Nörulasyon

Birinci lomber vertebranın distalinde kalan amorf hücre kitlesi, santral sinir sistemi taslağının üst bölümünün füzyonu tamamlandıktan sonra 28-32. günde şekil kazanmaya başlar. Önce bu hücre kitlesinin içinde küçük vakuoller oluşur. Sonradan büyüyen ve bir araya gelen vakuoller santral kanalı oluşturarak, apikal bölümle birleştirirler. Bu kanal oluşumu yedinci haftaya kadar sürer. Sekonder nörulasyon bozuklukları sonucu miyelosistose, diastomiyeli-diplomiyeli, meningosel-lipomeningosel, lipoma ve diğer tümörler, dermal sinüs, dermoid veya epidermoid kist gibi kaudal nöral tüp defektleri oluşmaktadır (Ulukutlu ve Aydın, 1991).

1.4. Nöral Tüp Kapanma Defektleri

Merkezi sinir sisteminin (MSS) anomalilerinin büyük bölümü nöral tüp defektleriyle ilişkilidir. Nöral tüp gebeliğin ilk 3-4. haftalarında kapanmaya başlar. Kapanma gecikirse nöral tüp defekti oluşur. MSS'nin anomalileri morfolojik olarak gelişmenin tamamlanmaması (hipoplazi), normal gelişmenin bozulması (agenezi), aşırı gelişme (hiperplazi), gelişme düzeninin normalden sapması ve sekonder dejenerasyon gibi değişik şekillerde ortaya çıkar. Birden fazla anomali bir arada olabilir. MSS'nin doğumsal anomalilerinin sıklığı, 1000 doğumda (ölü + canlı doğumlar) 12.7 olarak bildirilmektedir.

Bu anomalilerin içinde en sık görülenler başta okült spina bifida olmak üzere meningoel, miyelomeningoel, ensefaloel, anensefali, dermal sinüs, gerilmiş medulla spinalis, sirengomiyeli, diastemomiyeli ve lipomadır (Neyzi ve Ertuğrul, 2002).

1.4.1. Anensefali Nöral tüp anteriorunun üst bölgesindeki kapanma defektidir (Ergül vd., 2004). Anensefali 2. ve 3. trimesterlerde ultrasonografik olarak kafa kaidesi üzerindeki kranial kemiklerin (özellikle supraorbital alanda) ve her iki hemisferin yokluğu, ayrıca protrüde olmuş gözler ile birlikte tipik “kurbağa görüntüsü” ile tanımlanabilir (Şekil 1.5). İkinci trimesterde anensefali tanısı ultrasonografik olarak serebral hemisferlerin ve kalvarium kemiklerinin yokluğu, birinci trimesterde normal gelişim gösteren serebral hemisferlerin etrafında kalsifiye kalvarium yapısının olmaması ile karakterizedir (Yılmaz vd, 2007).

1.4.2. Ensefaloel Beyin dokusunun kraniumdan dışarıya herniasyonudur (Ergül vd., 2004). Ensefaloeller, konjenital bir malformasyon olup glial doku içeren nadir lezyonlardır (Şekil 1.6). Tarif olarak ensefaloel; intrakraniyal ventriküler yapıların ya da subaraknoid boşluktan serbest bağlantılı meninks ile örtülü beyin dokusunun dışarı doğru protrüzyonudur (Binatlı vd., 2007).



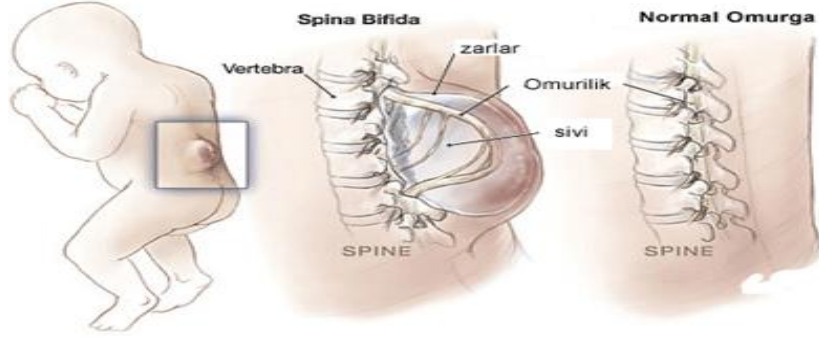
Şekil 1.5. Anensefali (Onrat vd., 2008)



Şekil 1.6. Ensefaloel (<http://www.ahmetyalinkaya.com>)

1.4.3. Spina Bifida Çok çeşitli gelişim anomalilerini kapsayan bir terim olup en önemli özelliği vertebral arkusların orta hat boyunca olan füzyonundaki yetersizliktir. Üstteki yumuşak dokularda da spina bifidaya eşlik edebilen veya etmeyen malformasyonlar

olabileceği gibi spinal kord, meninksler gibi spinal kanal kapsamlarında da anomaliler olabilir ya da olmayabilir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Spina bifida oluşumu (<http://www.sbawi.org/what-is-spina-bifida.html>)

Tüm dünyada tıbbi bakım gerektiren spina bifidalı çocukların sayısında giderek bir artış olmaktadır. Bu durum bir ölçüde büyüyen popülasyondaki artan doğum sayısına bir ölçüde de prenatal, obstetrik ve postnatal bakımın gelişmesine bağlıdır (Gökalp ve Örongun, 1998). Omurgadaki gelişimsel bozukluk anlamına gelen spina bifida, açık ve kapalı olarak iki gruba ayrılır. Kapalı spina bifidada omurga birleşme anomalisi dışarıda gözlenebilen bir kese yoktur, sadece bazen çocuğun cildinde orta hatta izlenen renk değişikliği, nevüs ve kıllanma vardır. Altta yatan birleşme anomalisi çoğunlukla asemptomiktir, bazı vakalarda omurgada gerilmeye yol açarsa nörolojik defisitler gözlenebilir (Göksoy, 2009).

1.4.3.1. Spina Bifida Aperta (Açık Spinal Disrafizm)

Açık spina bifidada omurgadaki birleşme anomalisi nedeniyle meninksler ve bazen de kord dokusu bir kese içinde çocuğun sırtında gözlenir. Sadece omuriliği saran zarlar kese içindeyse meningoel, zarlarla birlikte kord dokusu da kese içindeyse meningomyeloel adını alır. Meningomyeloel, en sık gözlenen ve nörolojik defisitlerin en sık olduğu türüdür (Göksoy, 2009). Spina bifida apterada görülen anormallikler 4 şekilde sınıflanır:

a. Meningosel: Meninks, yarı omur cisimciğinden bir kist gibi dışarı çıkmıştır. Medüller kanaldan dışarı sızıntı yoktur. Kist gibi dışı bakan meninksin duvarı epidermis ve araknoid tabakadan oluşur. Açık spina bifida vakalarının %10'unda meningosel görülür (Neyzi ve Ertuğrul, 2002).

b. Meningomiyelosel: Meningomiyelosel, tanım olarak, omurilik veya kauda ekuina liflerinin strüktürel veya fonksiyonel anomalisi ile beraber, meninkslerin, konjenital defekli vertebral arkuslardan kistik dilatasyonudur. İntrauterin hayatın embriyonik döneminde, nöral tüpün oluştuğu nörolasyon safhasında, hamileliğin 18. ve 27. günleri arasında, belirli bir etyolojiye dayanmadan oluşan bir nöral tüp kapanma defektidir (Erdinçler vd.,1995).

c. Lipomeningomiyelosel: Lipomlar spinal disrafizm ile birlikte ortaya çıkabilir ve tümüyle intraspinal lezyonlardan kemik defektten geçip nöral dokular boyunca uzanım gösterir (Lindsay vd., 2000).

d. Miyeloşizis: Omurilik açıktır. Çünkü dördüncü haftada nöral katlantılar birleşememiştir. Sonuçta omur ilik sözü edilen yerde sinir dokusunun yassılaşımış bir kitlesi şeklinde görülür (Şeftalioğlu, 1998). Bazen nöral dokuda belirgin şekilde aşırı büyüme gözlenirse de fazla büyüyen kısım doğumdan hemen önce veya sonra nekroza uğrar (Sadler, 1993).

1.4.3.2. Spina Bifida Okülta

Posterior nöral arkusların inkomplet veya hatalı bir şekilde kapanmasıyla karakterize olan spina bifida okülta yaklaşık olarak genel popülasyonun %5-10'unda görülür. Bunların en az %80'i lomber seviyede veya daha aşağıdadır ve vakaların çok büyük bir bölümü başka bir nedenle lumbosakral grafi çektilene kadar farkedilmeden kalır (Gökalp ve Örongun, 1998). Anomalili bebekler, omurilik ve spinal kökler altında yerleşik işlevsel önemli bozukluklara sahiptirler. Hatalı kapanmanın olduğu yerde bir demet saç (kıl) vardır (Şeftalioğlu, 1998).

1.5. İnsidans ve Prevalans

Nöral tüp defektinin görülme sıklığı coğrafi bölgeye, konsepsiyonun olduğu mevsime, etkilenmiş fetusların cinsiyetine, etnik yapıya, ailelerin sosyoekonomik durumuna ve anne yaşına bağlı olarak dünyanın birçok bölgesinde farklılıklar gösterir.

NTD'ler kardiovasküler sistem anomalilerinden sonra en sık görülen konjenital anomalilerdir. Düşük ve ölü doğumlardaki NTD vakaları normal popülasyona göre çok daha yüksektir. Son zamanlarda bazı bölgelerde NTD sıklığında azalma eğilimi bildirilirken, dünyanın diğer bölgelerinde insidans sabit kalmaktadır. Bu azalmanın nedeni açık olmamakla birlikte, prenatal tanı, NTD'li gebeliklerin selektif terminasyonu, genetik danışma ve muhtemelen gebelikte besinsel ilavelerin etkisi olabileceği görünmektedir (Padmanabhan, 2006). Tüm dünyada NTD'lerin bütün formlarının insidansı 1000 canlı doğumda 1.4-2 arasındadır. 1995'te Himmetoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Türk popülasyonunda NTD insidansı %0.27 olarak bulunmuştur. Bunlardan en sık spina bifidaya, 2. sıklıkta da anensefaliye rastlanmıştır. Üniversite kliniklerinde yapılan bir çalışmaya göre bu sıklık Kuzey ve Doğu Anadolu'da en yüksek (sırasıyla bin canlı doğumda 4.32 ve 4.54) olup, Batı Anadolu'da (bin canlı doğumda 2.17) en düşüktür (Tunçbilek, 2004).

1.6. Patogenez

Nöral tüp defektlerinin çoğunun embriyonik nöral tüp kapanmasında primer yetmezlik sonucu meydana geldiği bildirilse de; kapalı nöral tüpün tekrar açılma ve NTD ile sonuçlanma ihtimalini destekleyen klinik ve deneysel bulgular bulunmaktadır. NTD yalnız nöral tüpün farklı bölgelerini değil, aynı zamanda pek çok non-nöral organı da etkiler. Aynı zamanda nöral tüp defektiyle diğer anomaliler birlikte görülür. Daha az sıklıkla anensefali ve lumbosakral spina bifida ile birlikteliği olup; sakral spina bifida ile birlikte ise hiç görülmemektedir. İlave anomalilerin nöral tüp ve çevresindeki dokuların mekanik uyarımının bir sonucu olarak ortaya çıktığı savunulmaktadır (Padmanabhan, 2006).

1.7. Tanı

12 haftalık gebelikte açık spina bifida ultrason ile tanınabilir. 16-18 haftada anne karnında alfa fetoprotein düzeylerinin anormal yükselmesi nöral tüp defekti göstergesi olabilir. Amnion sıvısında alfafetoprotein ve asetilkolinesteraz düzeylerinin artışı önemli bir göstergedir. Kapalı spina bifidada belirgin klinik bulgu yoktur. Bazı vakalarda sırt veya

belde orta hatta anormal kıllanma, renk değişikliği, gamze gözlenebilir. Açık spina bifidada kese sırtta görülür. Lezyon seviyesi altında paralizi, duyu kaybı vardır. Açık spina bifidalı bebeklerin %70-90'ı hidrosefali ve Chiari malformasyonu ile doğar (Göksoy, 2009).

1.8. Nöral Tüp Defektlerinin Oluşmasına Neden Olan Faktörler

Nöral tüp defekti heterojen bir etiyolojiye sahiptir. Nöral tüpte yer alan beş kapanma bölgesinden her birindeki kapanmanın değişik genler tarafından kontrol edilebileceği öne sürülmüştür. Ayrıca annenin yetersiz beslenme, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi sağlık sorunları, kullandığı bazı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel kirleticilerin farklı şekillerde etkileyerek nöral tüpün hatalı kapanmasına neden oldukları bildirilmektedir (Tinkle ve Sterling, 1997).

1.8.1. Folik Asit Eksikliği

Nöral tüpün kapanmasında bir amino asit olan metiyonin kullanılmakta ve nöral tüpün kapanmamasından metiyonin eksikliği sorumlu tutulmaktadır. Vücutta normalde metiyonin sentetaz enziminin rol aldığı tepkimeyle homosistein, metiyonine dönüşmekte, bu enzimatik reaksiyon da ayrıca metiltetrahidrofolat ve kofaktör olarak da metil kobalamin gerektirmektedir. Bu aşamada folik asit kullanılmasıyla homosisteinin, metiyonine dönüşümünde metil vericisi olarak görev yapan 5-metiltetrahidrofolat sağlanarak anomalinin oluşması engellenmektedir (Steven vd., 1997)

Folik asit yetersizliğinde; B12 vitamini yetersizliğinde olduğu gibi özellikle gebe kadınlarda kırmızı kan hücrelerinin tam olgunlaşmadığı megaloblastik (makrositik) anemi, ilişkisinin tam olarak açıklanamadığı kolon, mide, uterus kanserleri, yükselmiş serum homosistein düzeyi ile görülen kalp-damar hastalıkları ve anensefali ve sipina bifida gibi NTD oluşmaktadır (Budak, 2002)

Folik asit metabolizmasında görevli olan MTHFR genindeki polimorfizmlerin, maternal obezite, yetersiz multivitamin alımı, akraba evliliği gibi faktörlerin nöral tüp defekti etyolojisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Karaca vd., 2012). İngiltere Tıbbi Araştırmalar Birliği'nin 1991'de yaptığı deneysel araştırmada, daha önce NTD'li bebek

doğuran kadınlara perikonsepsiyonel dönemde günde 4 mg. folik asit verildiğinde yeniden NTD'li gebelik geçirme riskinin %60-72, doğurganlık dönemindeki kadınlara günde 0.4 mg. folik asit verildiğinde ise, ilk kez ortaya çıkacak NTD'li gebelik riskinin %50 azaldığı ortaya çıkmıştır. Eritrosit folat düzeyinin yükselmesi ile NTD riskinde önemli ölçüde azalma olduğu, benzer çalışmalarda %60'ın altına düşmeyen risk azalması olduğu görülmüştür (Akan, 2002). Erken gebelik döneminde multivitamin ve folik asit desteğinin nöral tüp defekti prevalansını azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Milunsky vd.,1989)

1.8.2. Annede Yüksek Ateş

Yüksek ısınn teratojenik olduğu, nörulasyon sürecinde annenin yüksek ısıya maruz kalmasının nöral tüp defekti ile ilişkili olduğu, gebeliğin birinci trimesterinde yüksek ateşin NTD için artan bir risk olduğu ifade edilmiştir (Tinkle ve Sterling, 1997).

1.8.3. Annede Diabetes Mellitus

Annenin diabeti ile konjenital doğum defektleri arasındaki ilişki kesin olarak belgelenmiştir. İnsüline bağımlı diabetli annelerden doğan bebeklerde major malformasyon riskinin 2-3 kez arttığı konusunda araştırmacılar görüş birliğindedirler. Diabetik annelerin diabetik olmayan annelere nazaran 15 kat daha fazla anensefali veya spina bifidalı bebek doğurma riski taşıdıkları ifade edilmektedir. Gebeliğin birinci trimesterinde kan glikoz düzeyi ne kadar iyi kontrol altına alınırsa, doğumsal defektlerin de o kadar azalacağı vurgulanmaktadır (Tinkle ve Sterling, 1997).

1.8.4. Annede Şişmanlık

Araştırmacılar gebe kadının kilosu ile NTD'li bebek sahibi olma riski arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. 50-59 kg. ağırlığındaki kadınlarda nöral tüp defektli bebek sahibi olma riski, 80-89 kg.ağırlığındaki kadınlara oranla iki kat, 110 kg.ın üstündeki kadınlara oranla ise 4 kat arttığı saptanmıştır. 79 kg.dan az olan kadınlara günde 0.4 mg.

folik asit verildiğinde NTD riski %40 azalırken, 79 kg.ın üzerindekiilere bu vitaminin yüklenmesi ile riskin azalmadığı görülmüştür (Tinkle ve Sterling, 1997).

1.8.5. Çevresel Kirleticilerle Temas

Çevresel kirleticilerin konjenital anomalili bebek sahibi olma riskini arttırdığı, kloroform ve bromodiklormetan gibi maddelerin nöral tüp defektinin etyolojisinde spesifik önemli bir kimyasal madde olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Dodds ve King, 2001). Gebelikte kullanılacak ilaçlar fetusu doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilir. Bu etkilerin ortaya çıkışı gebeliğin devresi, ilacın dozu ve plasentadan geçişi ile ilişkilidir. Teratojenik etki bakımından organogenez dönemi olarak adlandırılan 3-8. haftalar arası dönem gebeliğin en kritik dönemidir. Bu dönemi izleyen 2 ve 3. trimesterde fetal doku ve organlar oluşmuş olacağından bu dönemde kullanılan ilaçlar fetusun gelişimi ve fonksiyonları üzerine olumsuz etkiler oluşturacaklardır (Tüzün vd., 2006). Valproik asit gibi antikonvulsant ilaçların gelişmenin dördüncü haftasında nöral katlantıların birleşmesi sırasında, hamilelere verildiğinde bunların %1 ya da %2'sinde nöral tüp defektlerine neden olduğu bildirilmektedir (Şeftalioğlu, 1998)

1.9. NTD'nin Genetiği

Nöral Tüp Defektleri, omurga ya da kafatasının kapanma defektleriyle sonuçlanan bir grup malformasyonları içermektedir. Brown ve arkadaşları insanda NTD'ye neden olabilecek 13q32'de kritik bir bölge tanımlamışlardır. Luo ve arkadaşları, 13q33-q34'teki delesyonunun NTD'ye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Buna rağmen insanda bu genlerde hastalıkla ilişkili bir mutasyon tanımlanmamıştır (Tyshchenko vd., 2008).

13q ve r(13)'ün delesyonunun spina bifida, ensefalosel, enansefali, atelensefali, eksensefali ve aprosensefali ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Schmid ve arkadaşları, 33 haftalık gebelikte amniyosentezle anensefali, limb deformiteleri, konjenital kalp defektleri olan bir fetüste halkasal kromozom 13'ün prenatal tanısını bildirmişlerdir. Rudelli ve arkadaşları, 18 haftalık gebelikte anensefali, ekzensefali, çoklu limb defektleri ve ürogenital defektleri olan fetüslerin 13. kromozomlarında delesyon olduğunu rapor etmişlerdir. Benn ve arkadaşları, 20 haftalık gebelikte anensefali, kapalı anüs, yumru ayak, sindaktili, kalp defektleri ve diğer anomalileri olan bir fetüste halkasal kromozom 13'ün

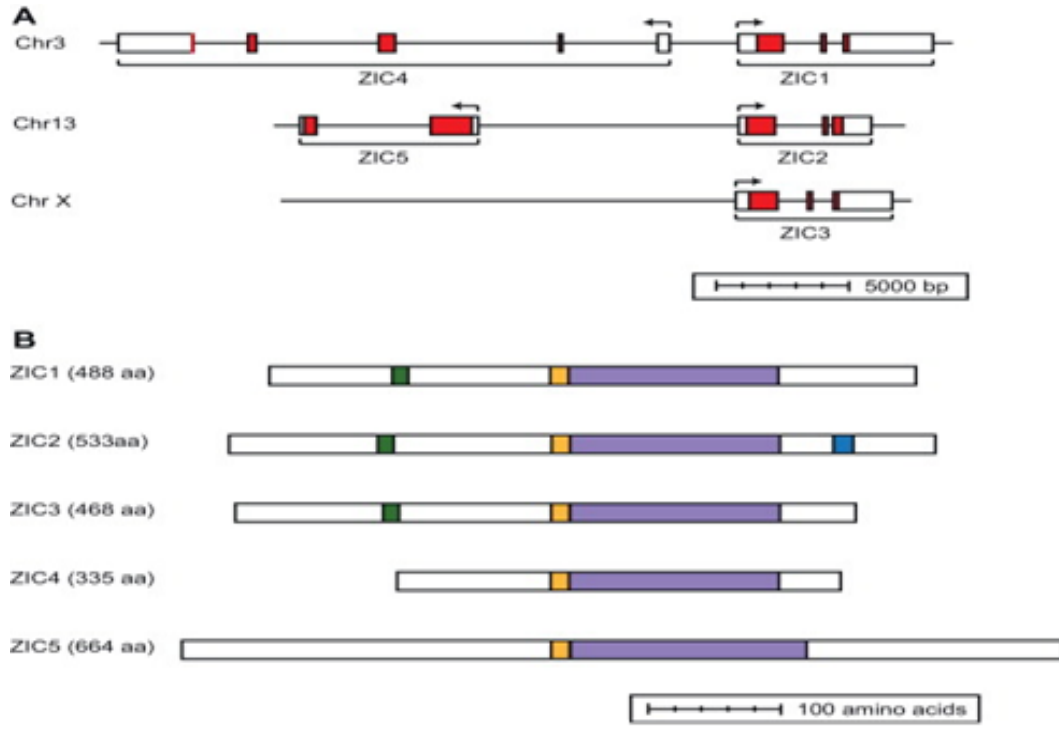
prenatal teşhisini yapmışlardır. Palmer ve arkadaşları 18 haftalık gebelikte amniyosentezle anensefalili fetüste halka kromozom 13 tespit etmişlerdir. Brown ve arkadaşları, 25 haftalık gebelikte, geniş oksipital ensefalosel, iki taraflı başparmak yokluğu, ciddi mikrosefalisi olan bir fetüste 13q kromozom delesyonunun prenatal tanısını rapor etmişlerdir. Chen ve arkadaşları, 20 haftalık gebelikte ciddi intrauterin gelişme geriliği, kardiyomegali, oksipital ensefalosel ve kafatası defektleri olan bir fetüste 13q delesyonunun prenatal tanısını rapor etmişlerdir. Amniyosentezle 23 haftalık gebelikte gelişim geriliği ve anensefalisi olan bir fetüste mozaik halka kromozom 13'ün prenatal tanısı Chen ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Aynı bilim adamları moleküler genetik analizlerin temelinde 13q32 üzerinde ZIC2 geninin NTD ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. ZIC2 geninin insan holoprosensefalisinden sorumlu olduğu iyi bilinmektedir. Son çalışmalarda ZIC 2 ile NTD'nin riskleri arasında bir ilişki için destekleyici bulgulara rastlanmamıştır. 13q32 üzerindeki insan ZIC5 geninin NTD'den sorumlu güçlü olası gen olduğu önerilmiştir. Inoue ve arkadaşları, ZIC5 geninin farelerde nöral tüp dokusunun gelişimi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir (Chen, 2007).

13 q delesyonuna sahip 14 İtalyan hastada yapılan karyotip ve fenotip analizleri sonucunda bu hastaların altısında NTD içeren merkezi sinir sistemi anomalisi gözlenmiştir. Altısında göz anomalileri, üçünde mikrotalmus, koloboma, ve optik sinir hipoplasisi, dokuz hastada fasiyal dismorfizm (daha sıklıkla hipertelorizm) ve diğer minör anomaliler (daha az sıklıkla yüksek ve dar damak, düşük kulak ve epikanthus), sekiz hastada el ve ayak anomalileri bulunmuştur. Beş hastada ise konjenital kalp defektleri, iki hastada gastrointestinal sistem malformasyonları tespit edilmiştir (Ballarati, 2007).

1.10. ZIC Gen Ailesi

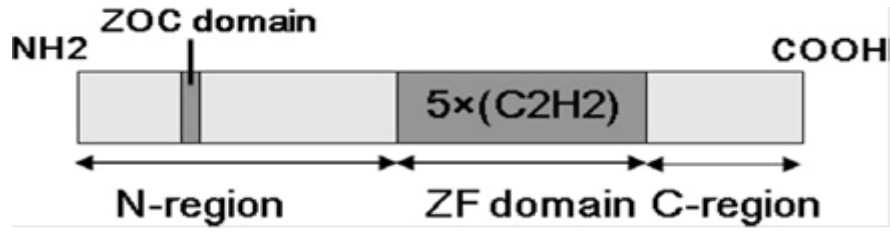
İnsanlarda ve farelerde beş adet ZIC geni vardır (Merzdorf, 2007; Gringberg, 2005). Fare ve insan genomunda ZIC genlerinin genomik organizasyonu önemlidir. ZIC1 ve ZIC4, insanda kromozom 3 üzerinde (farelerde kromozom 9 üzerinde)'dir. ZIC2 ve ZIC5 insanda kromozom 13 üzerinde, ZIC3 ise X kromozomu üzerinde lokalize olmuştur (Gringberg ve Millen, 2005; Ali vd., 2012).

Beş ZIC proteininin büyüklüğü birbirinden farklıdır. ZIC1 488 amino asit (aa) büyüklüğe sahipken ZIC2 533 aa, ZIC3 468 aa, ZIC4 335 aa, ZIC5 ise 664 aa büyüklüğe sahiptir (Şekil 1.8).



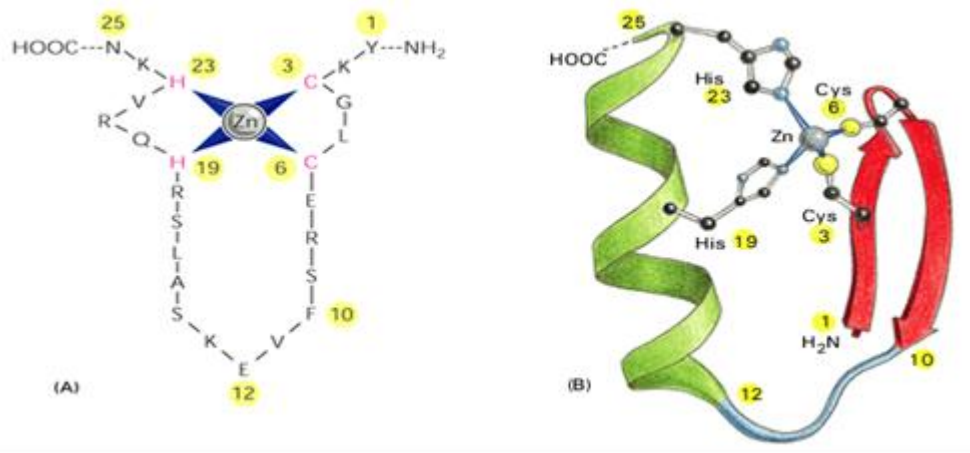
Şekil 1.8. ZIC genleri ve lokalizasyonu (Ali vd., 2012)

ZIC adı serebellumdaki zinc-fingerden gelmektedir (Gringberg ve Millen, 2005; Ali vd., 2012). İnsandaki ZIC gen ailesi zinc-finger transkripsiyon faktörleriyle kodlanan beş üyeyi içerir. ZIC genlerinin her biri beş adet Cys2His2 zinc-finger alanına sahiptir (Gringberg ve Millen, 2005; Layden vd., 2010) . ZIC proteinlerinin zinc finger alanları arka arkaya devam eden beş C2H2-tip zinc finger motifi içerir (Inoue vd., 2004) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. ZIC proteinlerinin domain yapısı (Sakai-Kato vd., 2009)

Her zinc finger motifi, merkezde bir çinko atomu ve buna bağlı alfa helikal bölgede iki tane histidin ve beta tabakalı bölgede iki tane sistein içeren tetrahedral yapıdan meydana gelmektedir (Sakai-Kato vd., 2009) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10.A. Zinc finger'in şematik yapısı. B. Zinc finger'in üç boyutlu yapısı (Alberts vd., 1994)

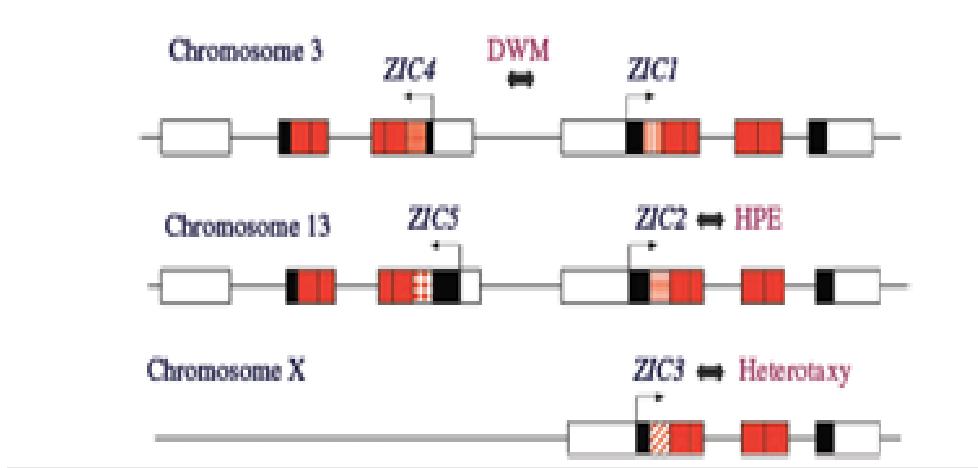
ZIC genlerinin hepsi üç ekzona sahiptir. İlk intron-ekzon sınırı beş genin tümünde de korunmuştur. Oysaki ikinci intron-ekzon sınırı ZIC1, ZIC2 ve ZIC3'te korunmuş fakat ZIC 4 ve ZIC5'te korunmamıştır. ZIC genlerinin zinc-finger alanları, Drozofila OPA (Drozofila odd-paired gen) geni ile en yüksek dizi homolojisine sahiptir. Memeli Gli1 ve Gli3 genleriyle benzer özellikleri paylaşırlar (Mizugishi vd., 2001; Gringberg ve Millen,

2005; Pan vd., 2011). Gastrulasyon aşamasında ZIC gen ekspresyonu, ektoderm ve mezodermde tespit edilebilir (Inoue vd., 2004).

Farelerde ZIC genlerinin nöral gelişim sırasında nöral plağın mediolateral segmentasyonunda, nöral krest indüksiyonunda ve nörogenesis inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Elms vd., 2003). Farelerde ZIC2, ZIC3 nörolasyonda ZIC2 erken beyin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Massuet vd., 2005). Fare embriyolarında ZIC2 ve ZIC3 birlikte nörolasyonun kontrolünü ve paraksiyal mezodermin segmentasyonunu kontrol etmektedir (Inoue vd., 2007). ZIC1 ve ZIC2 genlerinin somit miyogenezinde rolü olduğu gösterilmiştir (Pan vd., 2011). ZIC1 geninin olmadığı farelerde serebellar anomaliler ve spina bifida okültayı içeren aksiyal iskelette çoklu malformasyonlar gözlenmiştir. ZIC2 eksikliği olan farelerde spina bifida okülta, spina bifida aperta, eksensefali ve anensefaliyi içeren geniş spektrumlu nöral tüp defektleri gözlenmiştir (Klootwijk vd., 2004). ZIC2 genindeki mutasyon farelerde nöral krest oluşumunda gecikme ve nöral krest hücre sayısında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Elms vd., 2003). ZIC2 bakımından nakaft olan farelerde nörolasyonda gecikme ve devamında HPE ve spina bifida geliştiği gösterilmiştir (Nagai vd., 2000). Yapılan başka bir çalışmada ZIC1 ve ZIC2'nin serebellar gelişimin regülasyonunda benzer fonksiyonları olduğu gösterilmiştir (Aruga vd., 2002). Organogenez sırasında ZIC1, ZIC2 ve ZIC3 genlerinin nörolasyon süresince önemli fonksiyonları olduğu gösterilmiştir (Nagai vd., 1997).

Farelerdeki ZIC3 geninin yokluğunda ise situs anomalileri ve tail defektleri gibi eksensefali gözlenmiştir (Klootwijk vd., 2004). Yapılan başka bir çalışmada ZIC3 mutant farelerde merkezi sinir sistemi ve aksiyal iskelet defektlerinin bir arada görüldüğü heterotaksi gözlenmiştir (Purandare vd., 2002).

İnsanlarda ZIC genlerindeki mutasyonlar Dandy-Walker malformasyonları, holoprosensefali, NTD ve heterotaksiyi içerisine alan çeşitli konjenital malformasyonlara neden olur (Gringberg ve Millen, 2005) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. İnsan ZIC genlerinin genomik organizasyonu (Grinberg ve Millen, 2005)

ZIC1 ve ZIC4 genlerinin heterozigot delesyonu Dandy-Walker (DWM) malformasyonuna neden olmaktadır (Gringberg ve Millen, 2005). Serebellar bir defekt olan DWM, ZIC1 ve ZIC4 geninin ya tek tek ya da bu iki genin kombine mutasyonu sonucu görülür (Gringberg vd., 2004). DWM, serebellum ve dördüncü ventrikülü içeren konjenital beyin malformasyonudur (Hu vd., 2011). Hastalık dördüncü ventrikül denilen ve beyin omurilik sıvısının dolaştığı boşluklardan birinin doğuştan anormal genişlemesi, beyincikte iki beyincik yarımküresinin arasında yer alan ve vermis denilen bölümün yokluğu veya gelişiminin geri kalması ve bu anormallikler sonucunda kafatasının arka boşluğunda bir kist oluşması ile karakterizedir (Cohen vd., 2011).

ZIC2 geninin fonksiyon kaybı HPE ve NTD'ye neden olmaktadır (Warr vd., 2008; Brown vd., 2003). Holoprosensefali, embriyonal dönemde ön beynin (prosefalon) gelişimsel bir anomalisinden kaynaklanan, 1/16,000 canlı doğumda ve 1/250 gebelikte bir görülen nadir bir beyin malformasyonudur (Tanrıverdi vd., 2007). Tek bir embriyolojik defekt, hem beyin, hem de yüz gelişimini etkilemekte, böylece ağır beyin anomalilerine ağır yüz anomalileri eşlik etmektedir. Holoprosensefali ön beynin ayrılma derecesine göre 3 tiptir. En ağır formu olan alobar formda beyin küçüktür, ventriküler sistemin yerine birbirinden bağımsız lateral ve üçüncü ventriküller ve monoventriküler sistem bulunmaktadır. İki lateral ventrikül tek bir ventrikül halinde görülmekte, talamus füzyonu izlenmektedir. Talamus ve korpus striatum birleşmiştir, korpus kallozum, forniks, falks

serebri, optik traktuslar ve olfaktor çıkıntılar bulunmamaktadır. Orta beyin, beyin sapı ve serebellum ise yapısal olarak normaldir. Semilobar tip ara formdur, ventriküllerin kısmi segmentasyonu ve talamusun kısmi füzyonu söz konusudur. Rudimenter oksipital çıkıntılar ve monoventriküler bir kavite bulunmaktadır. Olfaktör çıkıntılar ve korpus kallozum genellikle yoktur. Bazal ganglionlar ve talamik nükleuslar füzyon halindedir. En hafif formu lobar formdur. Beyin görünümü daha normal olup, hemisferler genellikle iyi ayrılmıştır, fakat rostral kesimde bir füzyon oluşmaktadır. Lateral ventriküller geniş olmakla birlikte bağlantılıdır. Atria, oksipital ve temporal çıkıntılar ayrılmış ve farklılaşmıştır. Korpus kallozum olabilir, olmayabilir veya hipoplastik bulunabilir. Alobar holoprosensefalide kafatası sonografik incelemede su ile dolu gibi görülmektedir (Tanrıverdi vd., 2007).

ZIC3'teki mutasyonlar ölümcül defektlere, konjenital kalp hastalıklarına ve nöral tüp defektlerine neden olmaktadır. ZIC gen ailesinin fenotipik etkileri sadece merkezi sinir sistemi ile sınırlı değildir. İnsanda ZIC3'teki mutasyonlar NTD'ye ilaveten heterotaksiye de neden olmaktadır (Gringberg ve Millen, 2005; Ware vd., 2004). Aynı zamanda X-bağlı situs anomalileriyle sonuçlanmaktadır (Gebbia vd., 1997). Embriyo gelişiminde normal sağ-sol asimetrisini gerçekleştiremediğinde situs ambiguous (heterotaksi sendromları) ortaya çıkar ve 10.000 canlı doğumda 1.44 oranında görülür. Heterotaksi sendromlarında torakoabdominal organ ve damarların anormal simetri ve yanlış yerleşimleri söz konusudur. İki ana grup anomali tanımlanmıştır: Sağ ve sol izomerizm. Sağ izomerizm (Ivemark Syndrome, aspleni, bilateral right sidedness) her iki tarafta sağ akciğer anatomisi (üç loblu akciğer, eparteryal bronş yapısı), dalak yokluğu, simetrik karaciğer, sağ veya sol yerleşimli mide ve safra kesesi, atrioventriküler septal defekt, abdominal aortanın vena kavaya bitişik pozisyonu, konotrunkal kardiyak anomalilerle karakterizedir. Sol izomerizm (polispleni, bilateral left sidedness) her iki tarafta sol akciğer anatomisi (iki loblu akciğer, hiparteryal bronş yapısı), simetrik karaciğer, 2 veya daha fazla dalak varlığı, sağ veya sol yerleşimli mide, barsaklarda malrotasyon, atriyal septal defekt, ventriküler septal defekt, bilateral superior vena kava ile karakterizedir. Ancak torasik ve abdominal organlar değişik derecelerde patolojiye katılabilirler. Sağ izomerizm olgularının %99, sol izomerizm olgularının ise %90'ında kardiyak anomaliler bildirilmektedir. İzomerizm olguları kongenital kalp defektlerinin yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Heterotaksi sendromu

önemli kardiyovasküler patolojilerle ilişkili karmaşık bir anomali gurubudur (Bezircioğlu vd., 2007).

Fare deneylerindeki analizler ZIC3 mutasyonlarının ölümcül defektlere neden olduğunu göstermiştir. ZIC3, embriyoda gastrulasyonun erken aşamasında sağ-sol asimetrisinin oluşumunda önemlidir. ZIC3 fare embriyolarında ölü doğumla sonuçlanan ciddi konjenital kalp defektlerine neden olmaktadır (Gringberg ve Millen, 2005).

ZIC5'in nöral tüp kapanması ve nöral krest ayrımının oluşumunda rol oynadığı nakafit deney hayvanlarında yapılan analizlerle gösterilmiştir. Aynı şekilde ZIC5 geninin *Xenopus* türlerinde nöral krest oluşumunu uyardığı bilinmektedir (Ishiguro vd., 2004). ZIC5 yetersizliği farelerde nöral tüp defektlerini içeren pek çok anomalilere ve hipoplazi gibi kraniyofasiyal anomalilere neden olur. ZIC2 eksikliği sadece HPE ile sonuçlanırken, ZIC2 ile birlikte ZIC5 eksikliği HPE'ye ilaveten DWM ile sonuçlanır (Gringberg ve Millen, 2005). İlgili literatür ışığında ZIC genlerinin özellikle embriyogenez sırasında önemli görevler üstlendikleri, nöral tüp kapanması ve sinir sisteminin gelişiminde rol aldıkları belirlenmiştir. Ayrıca, bazı ZIC gen defektlerinin belirli malformasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Ancak insanda NTD'li hastalarda henüz ZIC5 geni için mutasyon taraması yapılmamıştır. Bu çalışmada çeşitli sendromik durumlarla beraberlik gösteren spina bifidalı hastalarda ZIC5 geninde herhangi bir mutasyon olup olmadığını araştırmayı amaçlıyoruz. Bu alanda yapılacak çalışmalarla ZIC5 genindeki mutasyonların neden olabileceği sendromik durumlar ve NTD'ile ilişkisi ortaya konmaya çalışılacaktır. Çalışma bu açıdan bir ilk olup insandaki NTD genetiğinin aydınlatılmasında aday genlerin tanımlanması için bir ön çalışmadır.

1.11. Moleküler Teknikler

1.11.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

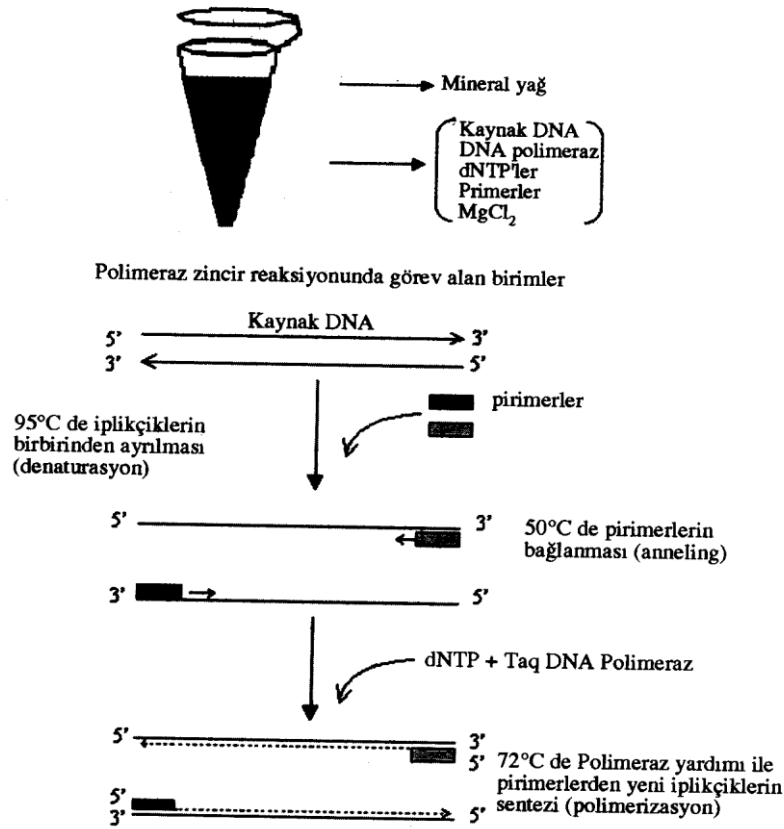
PCR, spesifik bir DNA parçasının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde in vitro bir amplifikasyon yöntemidir. PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan 5 ana madde vardır. DNA örneği (genomik DNA), çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen sentetik primer, deoksi-nükleotit-tri fosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı ($MgCl_2$) kullanılır (Applied Biosystems, 2001; AmpFISTR1 User Manuel).

PCR ile yaklaşık olarak 20,000 baza kadar olan spesifik genlerin birkaç yüz milyon kopyasını amplifikasyon sonucu gerçekleştirir. Bir fosilden ya da bir faili meçhul sanık tespitinde bir kan lekesinden gen klonlaması veya DNA analizi için yeterli miktarda DNA bulunmaz. Az miktardaki doku hatta tek bir hücreden elde edilen DNA miktarını artırabilmek için PCR kullanılmaktadır. Ayrıca virüs tarafından henüz yeni enfekte olmuş olan kan veya lenf içerisindeki etmen PCR ile teşhis edilebilir. PCR, genomik DNA'da dizisi bilinen veya dizisi henüz tespit edilmemiş olarak klonlanan yabancı DNA'nın çoğaltılmasını ve bunun dizi analizini tespit etmeye yarayan önemli bir tekniktir. Günümüzde oldukça önem arz eden insan genom projesi bu teknik sayesinde yapılmaktadır. PCR tekniği özetle şu aşamalardan oluşmaktadır:

Denaturasyon: Çift iplikli kaynak DNA'nın (çoğaltılacak DNA) yüksek sıcaklık derecesinde tekli iplikçiklere ayrılması

Hibridizasyon (annealing): Primerlerin uygun sıcaklıkta kaynak DNA'ya bağlanması

Amplifikasyon (extension): DNA polimeraz ile primerlerden itibaren zincirin uzaması (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Polimeraz zincir reaksiyonu (Dilsiz, 2004)

PCR ile çoğaltılan DNA segmenti restriksiyon enzimi ile kesilir; oluşan DNA parçaları agaroz veya akrilamid jel elektroforezinde ayrılır; etidyum bromidle boyanarak direkt olarak ultraviyole ışık altında incelenir. DNA bantları, DNA'nın etidyum bromidle oluşturduğu floresans özelliğine bağlı olarak siyah zemin üzerinde beyaz bantlar halinde görünür. Görünen bantların fotoğrafı polaroid bir kamera ile alınır.

Bu teknik aynı zamanda RNA amplifikasyonunda da kullanılmaktadır. Bunun için RNA önce reverz transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA'ya dönüşür ve daha sonra DNA'nın tabi olduğu reaksiyonlara girer (Dilsiz, 2004).

1.11.2. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi; genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ve gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların sayısı, yeri ve çeşidi ile ilgili bilgiler verir. DNA dizi analizi ayrıca, prokaryot ve ökaryot genlerde yer alan kontrol bölgelerin

organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin amino asit dizilerinin ortaya çıkarılmasında da kullanılır.

DNA dizi analizinde en çok kullanılan yöntem, tek zincirli DNA kalıbının tamamlayıcı zincirinin DNA polimeraz enzimiyle 5'den 3'ne doğru sentezlenmesi işlemine dayanır. DNA dizi analizi reaksiyonlarında normal nükleotidlerin yanı sıra dideoksinükleotid adı verilen özgül baz analogları kullanılır. DNA parçasındaki nükleotid dizisinin tayni için, her biri ayrı tüplerde olmak üzere dört reaksiyon seti hazırlanır. Her tüpte, tek zincirli bir DNA kalıbı (dizisi belirlenecek olan DNA parçası), uygun bir primer, DNA polimeraz, dört nükleotid ve oransal olarak daha az miktarda dört tip dideoksinükleotidlerden sadece biri bulunur. DNA sentezi olurken, DNA polimeraz, arada sırada, uzayan DNA zincirinin yapısına nükleotidlerin yanı sıra dideoksinükleotidleri de sokar. Bu nükleotid analogu 3'hidroksil grubu içermediği için bir sonraki nükleotid ile 3'bağı oluşturamaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır. Her bir tüpte uzunlukları birbirlerinden birer nükleotid farklı olan, değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Her bir reaksiyon tüpündeki örnekler jel elektroforezine yan yana yüklenerek, tüplerdeki DNA parçaları birbirlerinden ayrılır. Parçaların jel üzerindeki görünüşleri sağlandığında, merdivene benzer bantlar serisi ortaya çıkar. Dizi aşağıdan yukarıya doğru okunarak, baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5' den 3'ne doğru nükleotid dizisi belirlenmiş olur.

Genom dizi analizi için (geniş ölçekli DNA dizi analizi için), otomatik DNA dizi analizi aletleri ve radyoaktif izotop yerine floresan boyalar kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Kulg ve Cummings, 2003).

1.12. Mutagenesis

Canlı organizmanın kalıtım materyali olan nükleik asitlerde meydana gelen değişimlere mutasyon denir. Mutasyona uğramış bireye de mutant adı verilir. Mutant hale gelen birey, ana bireyden genotip olarak farklılık arz eder. Genotipte ortaya çıkan farklılık bireyde görünür olarak fenotipte değişimlere de yol açabilir. Yapılan çalışmalar sonucu farklı insan genomlarında yaklaşık her 200 nükleotidde bir nükleotid farklıdır. Bu farklılığa polimorfizm denir. Fenotipte oluşacak değişim bazen gözle görünür olmayabilir (Dilsiz, 2004). Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki

elementlerdir. Genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır (Nussbaum vd., 2005).

DNA'yı oluşturan bazlarda oluşacak mutasyonlar faydalı ya da zararlı değişimlere yol açabilir. Mutasyonlar tabii ya da yapay olarak ortaya çıkabilmektedir. Tabii mutasyon, örneğin DNA replikasyonunda karşılıklı gelmesi gereken eş bazlar yerine oluşan hatalı eşleşmeler sonucu meydana gelebilmektedir. Bu tür tabii bir hata milyarda bir oranında ortaya çıkmaktadır. Hücreler, oluşan yanlış baz eşleşmelerini genelde tamir edebilmekte ancak mitokondriyal genomda ortaya çıkan hataları düzeltecek enzimler mitokondride bulunmadığından hata tamir edilememektedir. DNA'da kalıcı olarak meydana gelen mutasyonlar, DNA replikasyonu, mayotik rekombinasyon, fiziksel ya da kimyasal etmenlerle ortaya çıkmaktadır (Dilsiz, 2004).

Hücrede kromozom sayılarını etkileyen mutasyonlar (genom mutasyonları), tek tek kromozomların yapılarını değiştiren mutasyonlar (kromozom mutasyonları) ve her bir genin değişimine neden olan mutasyonlar (gen mutasyonları) olmak üzere üç şekilde sınıflandırılır. Genom mutasyonları, tüm kromozom sayılarının değişimidir. Mayoz ve mitoz bölünme sırasında kromozomların ayrılma hatalarından dolayı ortaya çıkar. Kromozom mutasyonları, kromozomların sadece bir kısımlarını içeren duplikasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlardır. Kromozom bölünme mutasyonları, ya kendiliğinden ya da mayoz sırasında translokasyona uğrayan kromozomların anormal ayrımı nedeniyle de olabilmektedir. Gen mutasyonları, DNA dizilerindeki değişikliklerdir. Tek bir nükleotidi ya da binlerce baz çiftini etkileyecek değişikliklerdir (Nussbaum vd., 2005).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca 02.06.2011 tarihli 158/9 sayılı kararı ile onaylanan çalışmada, Haziran 2011 ile Eylül 2012 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Beyin Cerrahisi polikliniğinde nöral tüp defekti tanısıyla takip ve tedavileri yapılan ve bunun yanı sıra geriye dönük olarak ulaştığımız hastalardan, kendilerinin, birinci derece yakınlarının, hastane otoriteleri ve hekimlerinin rızası ile kan örnekleri alındı. Kontrol grubu ise, nöral tüp defekti başta olmak üzere herhangi bir kronik hastalığı olmayan, gönüllü sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubunun benzer coğrafi bölgelerden olmasına dikkat edildi. Çalışmamız 100 sağlıklı kontrol grubundan, 100 nöral tüp defekli hastadan oluşmaktadır.

2.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve Analizlere Hazırlanması

Kanlar, hastaların antekübital veninden daha önceden hazırlanmış 0.3 ml' lik, etilen diammin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere 2 cc olacak şekilde alındı. Kanlar, kan alınma işlemleri bittikten sonra DNA saflaştırması yapıncaya kadar -20 C°'de bekletildi. Kanlar birkaç defa alt-üst edilerek homojen hale getirilip 24'erli gruplar oluşturularak çalışıldı.

2.3. Demirbaş Malzemeler

- 1- PCR cihazı (Biometra USA)
- 2- Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany)
- 3- Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan)
- 4- Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium)
- 5- Electrophoresis box (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium),
- 6- UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France)

- 7- Hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands)
- 8- Etüv (Weiss Gallenkamp, UK)
- 9- Otoklav (Nüve, Germany)
- 10- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- 11- Laminar air flow
- 12- Su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany)
- 13- Otomatik Pipetler (Eppendorf Research, Germany)
- 14- Derin Dondurucu (Liebherr, Germany)
- 15- Buzdolabı (Arçelik)

2.4. Sarf Malzemeleri

- 1- Kandan DNA izolasyon kiti (PROMEGA, MADİSON, WI).
- 2- Eppendorf Tüpler (0.2, 0.5, 1.5, 2'lik)
- 3- Primerler (REF GEN BİYOTEKNOLOJİ)
- 4- Amonyum asetat
- 5- Amonyum klorür
- 6- Sodyum dodesil sülfat (SDS)
- 7- Potasyum hidrojen karbonat
- 8- Etanol (%70'lik)
- 9- İzopropil alkol
- 10- EDTA
- 11- Borik asit
- 12- Agaroz
- 13- Ethidium bromide
- 14- Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) mix (INTRON)
- 15- Taq DNA polimeraz (INTRON),
- 16- 6X Yükleme Tamponu (SIGMA)
- 17- 100 bp DNA ve 50 bp DNA step marker'leri (FERMENTAS).
- 18- TRIS baz
- 19- MgCl₂ (FERMENTAS)
- 20- Distile Su
- 21- Tüplük ve cam malzemeler

2.5. Kandan DNA İzolasyonu

DNA saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari “Wizard Genomic DNA Purification Kit”i ile gerçekleştirildi (Kat. No.: A1125, Madison, WI, USA). Bu kit 300 µL kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Çalışma esnasında kitin genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapıldı. Gerçekleştirilen deney aşamaları aşağıda sıralandığı gibidir:

- 1.5 ml’lik tüplere 900 µL “cell lysis” (hücre parçalama) solüsyonu konuldu.
- Alt-üst edilmiş kandan 300 µL alınarak hücre parçalama solüsyonunun üzerine ilave edildi, 5-6 defa alt-üst edildi, 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- 15.000 x g de 20 saniye oda ısısında santrifüjlendi.
- Alttaki beyaz kısma zarar vermeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı. Altta hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 µL sıvı bırakıldı.
- Hücre parçalama solüsyonundan 300 µL alınarak çok hafifçe vortekslenmiş hücre çöküntüsünün üzerine eklendi ve 5-6 kez alt-üst edildi. 2-4. basamaklar tekrar edildi. Beyaz hücrelerin arasında hala bazı kırmızı hücreler görülüyorsa bu durumda tekrar hücre parçalama solüsyonu eklenerek yukarıdaki deneyler tekrarlandı.
- Beyaz hücreler şiddetle vortekslenerek iyice karışması sağlandı (10-15 saniye).
- Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 350 µL “Nuclei lysis” (çekirdek parçalama) solüsyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solüsyon 5-6 kez pastör pipeti ile pipetlendi ve bırakıldı. Solüsyon viskoz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37°C’de inkübe edildi.
- Oda ısısına getirilmiş Nükleer lizatın üzerine 120 µL “protein presipitasyon” (protein çöktürme) solüsyonu eklendi. 10-20 saniye şiddetle vortekslendikten sonra küçük, değişik kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solüsyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.
- Oda sıcaklığında 15.000 x g’de 3 dakika santrifüjlendi. Eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.

- Süpernatant 300 µL izopropanol içeren 1.5 ml'lik sentrifüj tüpüne transfer edildi.
- Sürekli alt-üst edilerek ve ters çevrilerek karıştırıldı. Beyaz iplik görünümündeki DNA, görülebilen bir kitle oluncaya kadar bu çevirme işlemine devam edildi. Bazı numunelerde görülebilen kümeler oluşurken diğer bazılarında çok küçük miktarda iplikçik görüldü.
- 1 dakika oda sıcaklığında 15.000 x g'de santrifüjlendi. DNA, örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü olarak görüldü.
- Süpernatant dökülerek dipte kalan DNA'nın üzerine 300 µL oda sıcaklığındaki %70'lik etanol eklendi. Alt-üst yapılarak DNA pelleti ve tüpün kenarları yıkandı. Yukarıdaki santrifüjleme işlemi tekrarlandı.
- Etanol dikkatlice aspire edildi. Bu aşamada DNA çok gevşektir. Yanlışlıkla pipetlenebileceğinden dikkatli olmak gerekir. Tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi, böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.
- Kurumuş tüpe 100 µL DNA rehidratasyon solusyonu eklendi. DNA'yı rehidre etmek için 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüp ara ara çalkalandı.
- DNA 0.5 mL'lik eppendorf tüplere aktararak 2-8°C'de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için şu işlem gerçekleştirildi: UV/visible spektrometre 260 ve 280 nm'de çift dalga boyu aralığında okuma yapacak şekilde ayarlandı. DNA örneğinden 4 µL alınarak mikro küvette bulunan 746 µL saf suyun üzerine konuldu ve alt-üst yapıldı. Okuma gerçekleştirildi. Daha sonra $\text{ng}/\mu\text{L DNA} = A_{260} \times \text{dilasyon faktörü} \times 50$ formülünden hareketle örneklerdeki DNA'nın yaklaşık miktarı hesaplandı.

2.6. PCR Yöntemi

2.6.1. Oligonükleotidler (Primerler)

ZIC5 genindeki polimorfizmlerin ya da mutasyonların değerlendirilmesi için www.ensembl.org web adresi kullanılarak genlerin tam dizilerine ulaşıldı ve primerleri

dizayn edildi. Primerler http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi programı kullanılarak dizayn edildi. ZIC5 genindeki polimorfizmlerin ya da mutasyonların doğrulanması için DNA dizileme yapıldı. Laboratuvarlarımızda DNA dizileme cihazı bulunmadığından örnekler “Ref Gen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji” laboratuvarına gönderildi.

PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA’sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerin nükleotidlerin sekansı ve orijini Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. ZIC5 genine ait primer dizileri

Primer 1:	ZIC5 Forward 5’-CAG GCC AGG CTC AAA CTT CTG CA-3’
	ZIC5 Revers 5’- GGG GCT CCA TCA GAA CTA CAC AAT CA-3’
Primer 2:	ZIC5 Forward 5’-CAA CCT TGG TTC TGC TTC AA-3’
	ZIC5 Revers 5’- CGG CAT TGT CTC AGG TTA GG-3’

2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

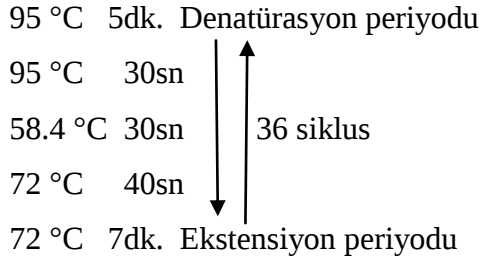
Bu çalışmada hasta ve kontrollerden elde edilen DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı. PCR koşulları Zhang ve arkadaşlarınca tariflenen protokole göre belirlendi (Zhang vd., 2008). PCR optimizasyonundan sonra protokol laboratuvar şartlarımıza göre yeniden oluşturuldu.

PCR İçeriği:

10X PCR Buffer	5µl
MgCl (25mM)	5µl
dNTP (2.5mM)	5µl
Primer R (20pmol)	2µl
Primer F (20pmol)	2µl
DNA	8µl
Taq DNA Polimeraz	0.5µl

Toplam volüm 50 µl ye distile su ile tamamlandı.

2.6.3. ZIC5 PCR Programı



PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra %3'lük agaroz jelde PCR ürünleri koşturuldu. ZIC5 geninin 1. ekzonu için ise 431 bp ürün 2.ekzonu için 600 bp ürün elde edildi. Üzerinde çalıştığımız ZIC5 geninde polimorfizm ya da mutasyon olup olmadığının tespiti için PCR ürünleri DNA dizilemeye gönderildi.

2.6.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

2.6.4.1. Etidyum Bromür Hazırlanması:

0.2 gr etidyum bromür tartılarak distile su ile 20 ml ye tamamlanır.

2.6.4.2. TBE Tamponu (5X)

54 gr Tris

27.5 gr Borik Asit

20 mL 0.5 M EDTA tartılarak (pH 8) 1 L distile ve deiyonize suda çözüldü.

2.6.4.3. %3'lük Agaroz Jel Hazırlanması

3 gr agaroz tartılır, TBE ile 100 ml'ye tamamlanır. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilir, soğutulur, jel kalıbına dökmeden içine 7 µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

2.6.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

PCR ürünlerinin yüklenecek miktarlarının %10'u kadar içerisine 6X yükleme tamponu eklenir ve kuyucuklara mikropipetle yükleme yapılır. DNA'lar jele yüklenirken, beklenen bantların boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jelin ilk ve son kuyucuğuna Fermentas firmasından alınan 100 bp'lik 7 µl DNA boyut marker'ı de yüklendi. Jel, oda sıcaklığında 60 V ve 25 mA sabit akımda yürütüldü. 1 saatlik yürütmeden sonra jeller UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

2.7. İstatistiksel Analizler

Bütün istatistiksel testler “SPSS® for Windows computing program, Version 16” (SPSS Inc. Chicago IL USA) ile gerçekleştirildi. Genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesine uyumu Ki Kare (X^2) testi ile analiz edildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları X^2 testi ile değerlendirildi. Kontrol ve hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's exact test ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada 100 nöral tüp defektli hasta ve 100 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubundan kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapıldı. Hastaların cinsiyet dağılımı 53 (%53) kadın, 47 (%47) erkek, kontrol grubunun cinsiyet dağılımı 46 (%46) kadın, 54 (%54) erkek olarak belirlendi. Hastaların yaş ortalamaları 2.42 ± 3.26 yıl (1 ay ile 17 yaş arası), kızların yaş ortalaması 2.54 ± 3.68 yıl (1 ay ile 17 yaş arası), erkeklerin yaş ortalaması 2.38 ± 3.14 yıl (1 ay ile 13 yaş arası) dır. Annelerin yaş ortalamaları 26.35 ± 4.61 yıl (19 ile 45 yaş arası) idi (Tablo 3.2).

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kanların izolasyonu sonrası DNA'ları elde edildi. DNA'sı elde edilen hasta ve kontrol gruplarının PCR'ları kurularak çoğaltma yapıldı. Sonra ürünler %3 lük agaroz jelde koşturularak değerlendirildi. PCR ürünleri DNA dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları DNA baser programında kıyaslanarak polimorfizm ya da mutasyon olup olmadığı tespit edilmeye çalışıldı.

Tablo 3.2. Hastaların yaş, cinsiyet dağılımları ve anne yaşı

Cinsiyet (n)	Yaş Ortalama $\pm$ SD (yıl)	Minimum (yıl)	Maksimum (yıl)
Kız (53)	2.54 ± 3.68	0.1	17
Erkek (47)	2.38 ± 3.14	0.1	13
Toplam (100)	2.42 ± 3.26	0.1	17
Anne yaşı	26.35 ± 4.61	19	45

Her hastanın demografik özelliklerini ve klinik öykülerini içeren anamnez formu dolduruldu. Hastalardaki defektin tipi kayıtlara geçirildi ve ailede benzer olgu, akraba evliliği olup olmadığı ve anne yaşı soruldu. Doğum anamnezleri yanında olası teratojen nedenleri ortaya çıkarmak için annelerin perikonsepsiyonel dönemde ilaç kullanımı, B12 vitamini, folik asit kullanıp kullanmadıkları, gebeliğin 3-4. haftalarında ateşli hastalık geçirip geçirmediikleri soruldu. Ayrıca hastaların geldiği il kaydedildi. Anne yaşı ve olguların yaşları soruldu. Hastaların detaylı muayeneleri sonrasında sipina bifidaya eşlik

eden başka bir sinir sistemi anomalisi ya da diğer sistem anomalilerinin varlığı kaydedildi.

Defekt tipi 94 hastada meningomiyelosel, 6 hastada meningoel idi. Hastaların %65'i Elazığ, %35'i çevre illerden gelmişti. Hastaların annelerinin 33 tanesinde (%33) abortus öyküsü, 38 annede (%38) akrabalık öyküsü bulunduğu tespit edildi. Hastaların 31 (%31) tanesinin ailesinde başka konjenital anomalili yakını varken, konjenital anomalilerin 25 (%25) tanesinde NTD mevcuttu. NTD olan bebeklerin annelerinin gebelikte ilaç kullanımı 18 (%18) hastada varken, 82 (%82) hastada yoktu. Hasta grubunun demografik özellikleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Hastaların demografik ve klinik özellikleri.

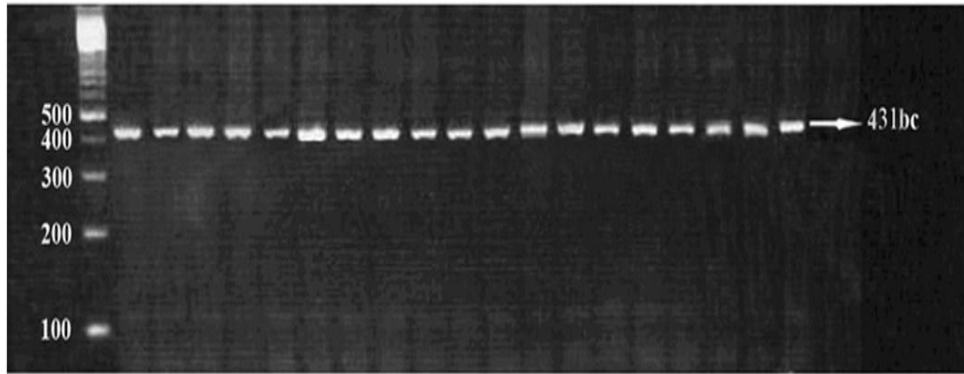
Demografik Özellikler	var (%)	yok (%)
NTD olan annelerde düşük	33	67
Akrabalık	38	62
Ailede başka konjenital anomalili bebek	31	69
Ailede başka NTD'li bebek	25	75
Gebelikte ilaç kullanımı	18	82

Genin ilk ekzonunun untransle bölgesinin 38. bazında G→A değişimi tespit edildi. 2. ekzon için herhangi mutasyon ya da polimorfizm bulunmadı. G→A değişimi 100 NTD'li hastanın 68'inde (%68) GG genotipi, 18'inde (%18) AG genotipi, 14'ünde de (%14) AA genotipi tespit edildi. Kontrol grubunda ise 100 sağlıklı bireyin 66'sında (%66) GG genotipi, 15'inde (%15) AG genotipi, 19'unda da (%19) AA genotipi belirlendi. (Tablo 3.4). Kontrol grubunun genotip dağılımı Hardy Weinberg dengesi içindedir ($P < 0.05$), hastaların genotip dağılımlarının Hardy Weinberg dengesi içinde olduğu belirlenmiştir ($P > 0.05$). Şekil 3.13'de ZIC5 geninin birinci ekzonunda 431 bp büyüklüğünde, Şekil 3.14'de ZIC5 geninin ikinci ekzonuna ait 600 bp büyüklüğünde agaroz jel elektroforezi görüntüsü gösterilmektedir.

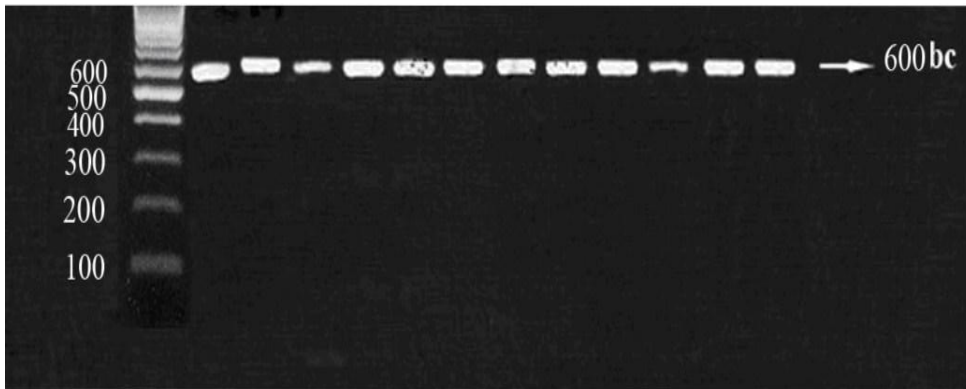
Tablo 3.4. ZIC5 Genine ait hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları

Gruplar		AA (%)	AG (%)	GG (%)
Kontrol (n=100)		%19	%15	%66
Toplam	NTD'li	%14	%18	%68
Hasta (n=100)				

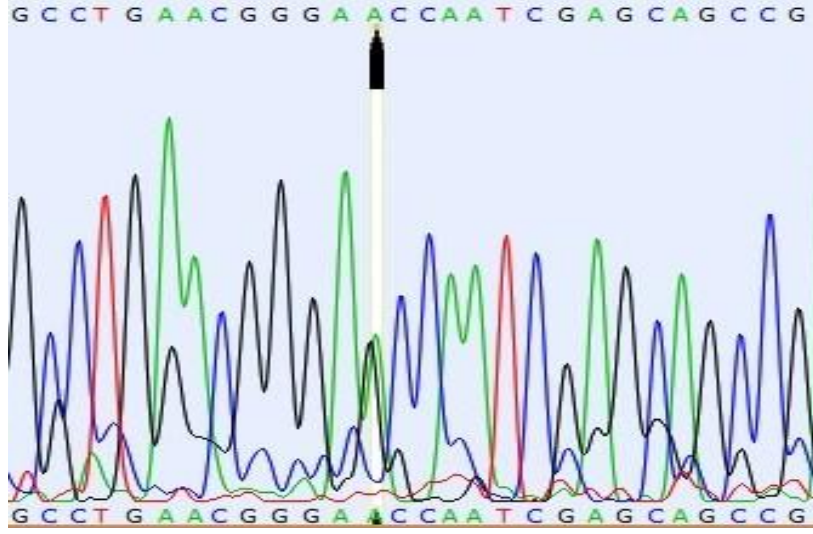
Hasta ve kontrol grupları arasında ZIC5 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($X^2= 1.06$, $df=2$, $p=0.5$). ZIC5 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu karşılaştırıldığında allel sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($X^2= 0.008$, $df=1$, $p=0.93$). Şekil 3.15’de ZIC5 geninin birinci ekzonuna ait GA genotipi için, Şekil 3.16’da GG genotipi için, Şekil 3.17.’de AA genotipi için DNA dizileme görüntüleri verilmiştir.



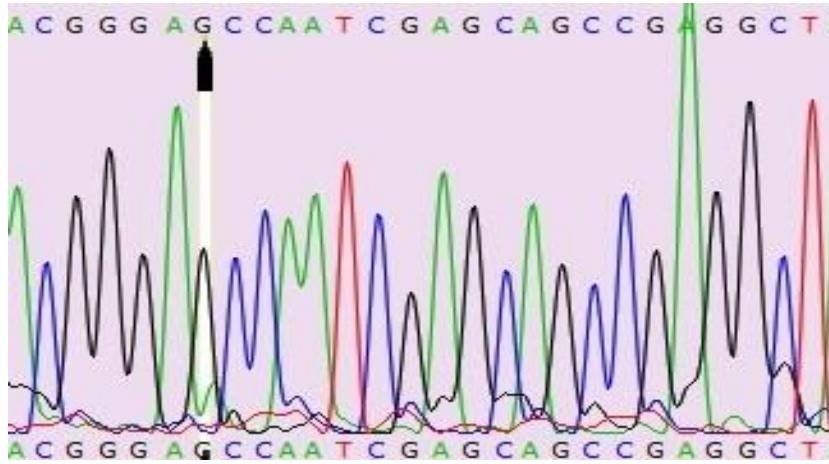
Şekil 3.13. ZIC5 geninin 1. ekzonu için 431 bp agaroz jel elektroforezi görüntüsü



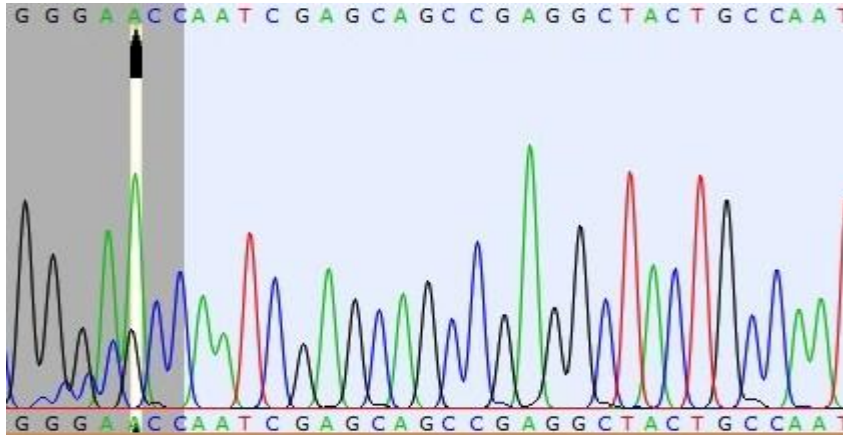
Şekil 3.14. ZIC5 geninin 2. ekzonu için 600 bp agaroz jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.15. ZIC5 genindeki GA genotipi için DNA dizileme görüntüsü



Şekil 3.16. ZIC5 genindeki GG genotipi için DNA dizileme görüntüsü



Şekil 3.17. ZIC5 genindeki AA genotipi için DNA dizileme görüntüsü

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Türkiye'de nöral tüp defektleri (NTD) konjenital anomalilerinin en ağırlarından olup epidemiyolojik bulgular prevalansın bölgesel ve demografik özelliklere göre değiştiğini göstermektedir. Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de NTD sıklığı ve dağılımındaki farklılıklar; etiyolojik faktörler olarak beslenme, kültürel veya genetik nedenler gibi bazı özgün veya özgün olmayan nedenlerin incelenmesi gerektiğini göstermektedir (Örs vd., 2012; Tunçbilek, 2004). Nöral tüp defektleri dünyada % 0.1-0.4 ülkemizde ise % 0.3 oranında görülmektedir. Türkiye’de nöral tüp defektlerinin (NTD) sıklığını araştıran çeşitli çalışmalar, bu sıklığın bin canlı doğumda üç civarında olduğunu göstermektedir (Tunçbilek vd., 1999). Bu değer NTD’nin ülkemizde sık görüldüğüne işaret etmektedir.

Üniversite kliniklerinde yapılan bir çalışmaya göre; Türkiye’nin doğusunda nöral tüp defektli hasta oranları 1985 yılı verilerine göre bin canlı doğumda 2.3 iken 1988 verilerine göre binde 12.4, 1989 yılında binde 10.0 olarak tespit edilmiştir (Güvenç vd., 1993). Bursa’da 1983-1986 yılları istatistiklerine göre spina bifida aperta ve anensefalili bebeklerin oranı bin canlı doğumda 5.8 olarak ifade edilmiştir (Akar vd., 1988). İzmir’de yapılan araştırmalara göre spina bifida insidansı binde 1.9 olarak bulunmuştur (Çağlayan vd., 1989). Ankara’da 1987’de yapılan araştırmada nöral tüp defekti oranı bin canlı doğumda 3.83 olarak tespit edilmiştir (Mocan vd., 1992). Doğu Karadeniz bölgesindeki verilere göre ise NTD insidansı 1981-1986 yılları arasında 2.12 iken 1986’dan sonra 4.39’a bir artış göstermiştir (Mocan vd., 1990). Araştırmacılar bu büyük artışın Çernobil felaketinden sonra yaşandığına dikkat çekmişlerdir. Afyonkarahisar’da yapılan başka bir çalışmada 2003-2004 yılları arasındaki verilere göre nöral tüp defekti insidansı 3.58 olarak bulunmuştur (Onrat vd., 2009). Çalışma örneklerimizin alındığı Elazığ ilinde yapılan bir çalışmada 2004 yılına ait veriler dikkate alındığında sipina bifida insidansı 2.6 / 1000 olarak saptanmıştır (Saraç vd., 2007).

Nöral tüp defekti çevresel ve genetik faktörleri de içeren multifaktöriyel konjenital bir hastalıktır (De Marco vd., 2011; Greene vd., 2011; Pulikkunnel ve Thomas, 2005; Cabrera vd., 2004). Annenin yetersiz beslenmesi, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi sağlık sorunları, gebelikte kullandığı bazı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel kirleticilerin farklı şekillerde etki göstererek nöral tüpün hatalı kapanmasına neden oldukları bildirilmektedir (Tinkle ve Sterling, 1997; Akan, 2002).

Yüksek ısıнын teratojenik olduğu ve embriyonun sinir dokusunun gelişmeye başladığı günlerde annenin yüksek ısıya maruz kalmasının nöral tüp defektinin gelişiminde etkili olduğu öne sürülmüştür (Tinkle ve Sterling, 1997).

Annenin diabeti ile konjenital doğum defektleri arasında ilişki olduğu, diabetik annelerin diabetik olmayan annelere kıyasla 15 kat daha fazla anensefali veya spina bifidalı bebek doğurma riski taşıdıkları vurgulanmaktadır (Tinkle ve Sterling, 1997). Bu yüzden gebelik planlayan kadınlarda özellikle gebelik döneminde kan glikoz düzeyi ne kadar iyi kontrol altına alınırsa, doğumsal defektlerin de o kadar azalacağı vurgulanmaktadır (Levine, 1998).

Gebe kadının kilosu ile NTD'li bebek sahibi olma riski arasında bir ilişki olduğu, şişmanlığa yol açan fizyolojik nedenler ve şişman annelerin bazı besin maddelerini eksik alma durumlarının, nöral tüp gelişiminde rol oynayan metabolik süreçleri etkileyerek nöral tüp defektlerinin oluşma riskini arttırdığı ifade edilmektedir (Tinkle ve Sterling, 1997).

Çevresel kirleticilerin konjenital anomalili bebek sahibi olma riskini arttırdığı, kloroform ve bromodiklormetan gibi maddelerin nöral tüp defektinin etyolojisinde spesifik önemli bir kimyasal madde olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Dodds ve King, 2001). Gebelikte kullanılacak ilaçlar fetusu doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilir. Bu etkilerin ortaya çıkışı gebeliğin devresi, ilacın dozu ve plasentadan geçişi ile ilişkilidir. Teratojenik etki bakımından organogenez dönemi olarak adlandırılan 3-8. haftalar arası dönem gebeliğin en kritik dönemidir. Bu dönemi izleyen 2 ve 3. trimesterde fetal doku ve organlar oluşmuş olacağından bu dönemde kullanılan ilaçlar fetusun gelişimi ve fonksiyonları üzerine olumsuz etkiler oluşturacaklardır (Tüzün vd., 2006). Valproik asit gibi antikonvulsant ilaçların gelişmenin dördüncü haftasında nöral katlantıların birleşmesi sırasında, hamilelere verildiğinde bunların %1 ya da %2'sinde nöral tüp defektlerine neden oluşu bildirilmektedir (Şeftalioğlu, 1998)

Nöral tüpün kapanmasında bir amino asit olan metiyonin kullanılmakta ve nöral tüpün kapanmamasından metiyonin eksikliği sorumlu tutulmaktadır. Vücutta normalde metiyonin sentetaz enziminin rol aldığı tepkimeyle homosistein, metiyonine dönüşmekte, bu enzimatik reaksiyon da ayrıca metiltetrahidrofolat ve kofaktör olarak da metil kobalamin gerektirmektedir. Bu aşamada folik asit kullanılmasıyla homosisteinin, metiyonine dönüşümünde metil vericisi olarak görev yapan 5-metiltetrahidrofolat sağlanarak anomalinin oluşması engellenmektedir (Budak, 2002). Yapılan bir araştırmada, daha önce NTD gebelik öyküsü olan kadınlara gebelik öncesi ve gebeliğin ilk üç ayında

folik asit verilmesi sonucu NTD'nin tekrarlamadığı görülmüş, bununla beraber kontrol grubunda %4.04 oranında NTD'i tekrarı olmuştur (Aydınlı vd., 1999). Düzenli olarak günlük 200 mikrogram folik asit desteğinin nöral tüp defekti oluşum riskini azalttığı bildirilmiştir (Daly vd., 1997). Gebeliğin erken dönemlerinde folik asit/multivitamin desteğinin NTD prevalansını azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Milunsky vd., 1989).

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genindeki 677C-->T mutasyonunun spina bifida için bir risk faktörü olduğu, bu mutasyonun düşük çalışma aktivitesine sahip MTHFR enziminin sentezlenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Van der Put vd., 1995). MTHFR, folat ve homosistein metabolizmasında görevli bir enzim olup bu genin nükleotid diziliminde 677. pozisyonundaki sitozin bazının yerine timinin gelmesi yani C677T polimorfizminin nöral tüp defektinde genetik bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Yan vd., 2012; Harisha, 2012; Yaliwal, 2012) Yapılan başka bir çalışmada MTHFR genindeki 1298 (A-->C) polimorfizminin de düşük aktiviteye sahip MTHFR enziminin sentezine yol açtığı ve NTD için bir risk taşıdığı bildirilmiştir (Van der Put vd., 1998)

Lu ve ark. (Lu vd., 2007) spina bifidalı hastalarda yaptıkları çalışmada PAX3 rs16863657 polimorfizmi ile NTD arasında ilişki bulduklarını belirtmişlerdir.

İnsan folat taşıyıcı genindeki (RFC-1) 80 (A-->G) polimorfizminin nöral tüp defekti oluşumunda etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (de Marco vd., 2003). MTHFRs ve RFC-1 (insan folat taşıyıcı gen) genlerindeki polimorfizmlerin korelasyonunun araştırıldığı başka bir çalışmada RFC-1 genindeki 80 (A-->G) polimorfizmiyle MTHFR genindeki polimorfizmin kombine heterozigotluk durumunda NTD riskini arttırdığı gösterilmiştir (de Marco vd., 2001; Shang vd., 2008).

İnsanda 11q13 kromozomu üzerinde lokalize olan Uncoupling protein 2 (UCP2) geninin 8.ekzonundaki 45-bp 3'-untranslated region (UTR) insersion/delesyon (I/D) polimorfizminin nöral tüp defekti için potansiyel bir risk oluşturabileceği öne sürülmüştür (Wang vd., 2011).

Nöral tüp defektinin oluşumunun temelinde genetik ve çevresel nedenler birlikte rol oynamaktadır. Moleküler genetikte kullanılan yöntemlerin gelişmesine paralel olarak nöral tüp defektine neden olan olası gen polimorfizm ve mutasyonlarının bir kısmı tespit edilmiş olup hala spina bifida etiyolojisini tam olarak açıklayabilmek için çalışmaların devam ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada nöral tüp defekti oluşumunda etkili olabileceğini düşündüğümüz ve henüz literatür kayıtlarında herhangi bir bulguya rastlamadığımız ZIC5

genindeki olası mutasyonların hastalığın gelişimi üzerine etkili olabileceği ve NTD gelişiminde aday genlerin tespiti için ön çalışma niteliğinde olabilecek bir araştırma yapılmıştır.

ZIC genleri nöral gelişimde önemli rol oynamaktadır (Aruga, 2004; Inoue vd., 2008). İnsanlarda ve farelerde beş adet ZIC geni vardır (Merzdorf, 2007; Gringberg ve Millen, 2005). ZIC1 ve ZIC4 insanda kromozom 3 üzerinde, ZIC2 ve ZIC5 insanda kromozom 13 üzerinde, ZIC3 ise X kromozomu üzerinde lokalize olmuştur (Gringberg ve Millen, 2005; Ali vd., 2012)

İnsanlarda ZIC genlerindeki mutasyonlar Dandy-Walker malformasyonları, holoprosensefali, nöral tüp defekti ve heterotaksiyi içerisine alan çeşitli konjenital malformasyonlara neden olmaktadır (Gringberg ve Millen, 2005).

ZIC1 ve ZIC4 genlerinin heterozigot delesyonu sonucu Dandy-Walker (DWM) malformasyonu görülmektedir (Gringberg ve Millen, 2005; Gringberg vd., 2004). ZIC2 geninin fonksiyon kaybı Holoprosensefali ve nöral tüp defektine neden olmaktadır (Warr vd., 2008; Brown vd., 2003; Costa-Lima vd., 2008).

ZIC3'teki mutasyonlar ölümcül defektlere, konjenital kalp hastalıklarına ve nöral tüp defektlerine neden olmaktadır. ZIC gen ailesinin fenotipik etkileri sadece merkezi sinir sistemi ile sınırlı değildir. İnsanda ZIC3'teki mutasyonlar nöral tüp defektine ilaveten heterotaksiye de neden olmaktadır (Gringberg ve Millen, 2005; Ware vd., 2004). Aynı zamanda X-bağılı situs anomalileriyle sonuçlanmaktadır (Gebbia vd., 1997). Ancak insanda nöral tüp defektli hastalarda henüz ZIC5 geni için herhangi bir mutasyon taraması yapılmamıştır. Buna rağmen ZIC5 geninin nöral tüp kapanması ve nöral krest ayrımının oluşumunda rol oynadığı nakafit deney hayvanlarında yapılan analizlerle gösterilmiştir (Inoue vd., 2004). Aynı şekilde ZIC5 geninin *Xenopus* türlerinde nöral krest oluşumunu uyardığı bilinmektedir (Nakata vd., 2000). ZIC5 yetersizliği farelerde nöral tüp defektlerini içeren pek çok anomalilere ve hipoplazi gibi kraniofasial anomalilere neden olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Inoue vd., 2004). ZIC5 geni de diğer dört ZIC genleri gibi nörolasyon sürecinde görev almaktadır.

Çalışmamızda nöral tüp defektli hastalarda ZIC5 geninin nöral tüp defektiyle ilişkisi araştırılmıştır. ZIC5 geninin NTD'de araştırıldığı ilk çalışma olduğu için karşılaştıracığımız herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Hasta ve kontrol grupları arasında ZIC5 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($X^2= 1.06$, $df=2$, $p=0.5$). ZIC5 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu karşılaştırıldığında allel sıklıkları

açısından da hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($X^2=0.008$, $df=1$, $p=0.93$). ZIC5 geninin de diğer ZIC genleri gibi nöral tüp defekti etyopatogenezinde önemli rolleri olabileceği düşünülmektedir. Bu gendeki polimorfizmlerin hastalığa yatkınlık sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi için hem Türk popülasyonunda hem de diğer popülasyonlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bulgularımız eşiğinde sonuç olarak; nöral tüp defekti etyolojisinde genetik ve çevresel faktörlerin bir arada bulunduğu multifaktöryel olayların rol oynadığı, yaptığımız bu çalışma ile bölgemizde, nöral tüp defekti gelişiminde ZIC5 allel sıklıklarındaki değişikliklerin etkili olabileceği, bu allel sıklığının oluşmasında ise annenin beslenmesi, yaşı, obezite gibi sağlık sorunları, akrabalık düzeyi, annenin gebelikte kullandığı ilaçlar gibi çevresel faktörlerin etkili olabileceği söylenebilir. Her ne kadar istatistiksel olarak hasta ve kontrol gruplarında anlamlı bir ilişki bulunmasa da ZIC5 geninin birinci ekzonunun 38. baz noktasındaki AG polimorfizmi yeni bir bulgu olup ileride yapılacak çalışmalar için de referans oluşturacağını düşünmekteyiz. Spina bifida gibi doğumsal anomalili hastaların sayısını en aza indirebilmek, sağlıklı bir toplum oluşturabilmek için aileler genetik danışma konusunda bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Bu açıdan nöral tüp defektinin nedenlerinin tam olarak aydınlatılabilmesi için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

5. ÖNERİLER

Konjenital malformasyonlar tedavi ve rehabilitasyonları zor ve masraflı olan, aile ve topluma çok büyük maddi ve manevi yükler getiren sağlık sorunlarıdır (Akan, 2002). Nöral tüp defektleri (NTD), konjenital malformasyonlar içinde sık rastlanılan ve ağır seyreden malformasyonlardan biridir.

Herhangi bir doğum defektinin primer önlenmesi, ailenin sağlığını yükseltmek ve iyi oluşluk halini sürdürmek için çok önemlidir. Primer önleme uygulamaları ile ailenin NTD olan bir fetusun prenatal tanısı ile ilişkili potansiyel travmaya maruz kalması önlenmiş olacaktır. Buna ilaveten NTD ile etkilenmiş gebeliği sonlandırma hakkında karar verme ve eğer yapılacaksa gebeliği sonlandırma işlemlerinin fiziksel stresine maruz kalması ve NTD'li doğan çocuk ve ailesinin karmaşık sağlık ve psikososyal sorunlarla yüz yüze kalması önlenilebilecektir (Yıldız ve Akbayrak, 2008). Bütün bunları önlemek ya da NTD'li hasta sayısını toplumumuzda en aza indirebilmek için nöral tüp defektine neden olan genetik ve çevresel şartlar detaylı olarak gözden geçirilip daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. ZIC5 geninde birinci ekzonunun 38. baz noktasındaki AG polimorfizmi hasta ve kontrol gruplarında benzer sıklıkta bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Ancak bu genin nöral tüp defekti etyolojisinde önemli rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Spina bifidalı hastalarda ZIC5 genindeki mutasyonların araştırıldığı bu çalışma NTD'de aday genlerin tanımlanması için önemli olup, bundan sonraki süreçte yapılacak diğer çalışmalara referans olacağını düşünmekteyiz. Çalışmada elde edilen verilerin doğrulanabilmesi için farklı toplumlarda aynı genin nöral tüp defektli hastalarda çalışılarak verilerimizin daha fazla çalışmayla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD.,** 1994. Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing, New York, USA
- Akan, N.,** 2002. Nöral Tüp Defektli Bebek Doğurma Riski Azaltılabilir, C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 6 (1)
- Akar, N., Çavdar, AO., Arcasoy, A.,** 1988. High incidence of neural tube defects in Bursa, Turkey, Paediatr perinat Epidemiol.,2(1):89-92
- Aksu, H., Sevil, Ü., Yurtsev, E., Güvendiren, G.,** 2010. Nöral Tüp Defektlere ve Folik Asit, Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim ve Sanatı Dergisi, Cilt:2, Sayı:3.
- Ali, RG., Bellchambers, HM., Arkell, RM.,** 2012. Zinc fingers of the cerebellum (Zic): Transcription factors and co-factors, Int J Biochem Cell Biol, 44(11):2065-8.
- Applied Biosystems,** 2001. AmpFISTR identifiler PCR Amplification Kit User's Manual, Foster City, CA, P/N 4322288.
- Aruga, J.,** 2004. The role of Zic genes in neural development, Mol. Cell. Neurosci., 26, 205–221
- Aruga, J., Inoue, T., Hoshino, J., Mikoshiba, K.,** 2002. Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1, J Neurosci., 1;22(1):218-25.
- Aydınlı, K., Çağdaş, A., Kayserili, H., Kuseyri, F., Tükel, T., Eriş, H., Apak, MY.,** 1999. Prekonsepsiyonel folik asit ve multivitamin tedavisinin nonsendromik nöral tüp defektlerinin yineleme riski üzerine etkisi, Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst, 9: 183-189.
- Ballarati, L., Rossi, E., Bonati, MT., Gimelli, S., Maraschio, P., Finelli, P., Giglio, S., Lapi, E., Bedeschi, MF., Gueneri, S., Arrigo, G., Patricelli, MG., Mattina, T., Guzzardi, O., Pecile, V., Police, A., Scarano, G., Larizza, L., Zuffardi, O., Giardino, D.,** 2007. 13q Deletion and Central Nervous System Anomalies : Further Insights from Karyotype-Phenotype Analyses of 14 patients, J. Med. Genet., 44:60
- Bezircioğlu, İ., Tunakan, M., Baloğlu, A., Çetinkaya, B., Biçer, M.,** 2007. Hidrops Fetalis'li Bir Sol isomerizm Olgusu, Perinatoloji Dergisi, Cilt: 15, Sayı: 1

- Binatlı, AÖ., Başkan, F., Başarır, M., Demirhan, MF., Özdamar, N.,** 2007. Nazofrontal Ensefalosel: Bir Vaka Sunumu, Türk Nöroşirürji Dergisi, Cilt: 17, Sayı: 2, 91-93
- Brown, L.Y., Kottmann, A.H., Brown, S.,** 2003. Immunolocalization of ZIC2 expression in the developing Mouse forebrain, Gene Expression Patterns 3, 361-367
- Budak, N.,** 2002. Folik Asidin kadın ve Çocuk Sağlığında Önemi, Erciyes Tıp Dergisi 24 (4): 209-214,
- Cabrera, RM., Hill, DS., Etheredge, AJ., Finnell, RH.,** 2004. Investigations into the etiology of neural tube defects, Birth Defects Res C Embryo Today, 72(4):330-44.
- Chen, C.,** 2007. Chrosomal Abnormalities Associated With Neural Tube Defects (II): Partial Aneuploidy, Taiwan J Obstet Gynecol., 46 (4): 336-351
- Cohen, MC., Karaman, I., Squier, W., Farrel, T., Whitby, EH.,** 2012. Recurrent Pseudo-Torch Appearences Of The Brain Presenting As "Dandy-Walker" Malformation, Pediatr Dev Pathol., 15(1):45-9.
- Copp, AJ. and Greene, ND.,** 2009. Genetics and development of neural tube defects, Journal of Pathology, 220:217-230
- Costa-Lima, MA., Meneses, HN., El-Jaick, KB., Amorim, MR., Castilla, EE., Orioli, IM.,** 2008. No association of the polyhistidine tract polymorphism of the ZIC2 gene with neural tube defects in a South American (ECLAMC) population, Molecular Medicine Reports, 1: 443-446
- Çağlayan, S., Kayhan, B., Menteşoğlu, S., Aksit, S.,** 1989. Changing incidence of neural tube defects in Aegean Turkey. Paediatr Perinat Epidemiol, 3: 62-65.
- Çimen, V.,** 2008. Fizyoloji Histoloji & Embriyoloji, Tusem Eğitim Sağlık LTD. Şti, Ankara, s. 341
- Daly, S., Mills, JL., Molloy, AM., Conley, M., Lee, YJ., Kirke, PN., Weir, DG., Scott, JM.,** 1997. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects, Lancet, 6;350(9092):1666-9.

De Marco, P., Calevo, MG., Moroni, A., Arata, L., Merello, E., Cama, A., Finnell, RH., Andreussi, L., Capra, V., 2001. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs, *Eur J Pediatr Surg*, 11 Suppl 1:S14-7.

De Marco, P., Calevo, MG., Moroni, A., Merello, E., Raso, A., Finnell, RH., Zhu, H., Andreussi, L., Cama, A., Capra, V., 2003. Reduced folate carrier polymorphism (80A-->G) and neural tube defects, *Eur J Hum Genet.*, 11(3):245-52.

De Marco, P., Merello, E., Cama, A., Kibar, Z., Capra, V., 2011. Human neural tube defects: genetic causes and prevention, *Biofactors*, 37(4):261-8

Dilsiz, N., 2004. Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara, s:220

Dodds, L and King, WD., 2001. Relation between trihalomethane compounds and birth defects, *Occup Environ Med.*, 58: 443-446

Elms, P., Siggers, P., Napper, D., Greenfield, A., Arkell, R., 2003. Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development, *Developmental Biology*, 264, pp. 391–406

Ensefalsol, http://www.ahmetyalinkaya.com/wp/?page_id=569, 02 Aralık 2012

Ergül, Y., Şahiner, ÜM., Velibeyoğlu, F., 2004. Pediatri, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, s.333

Erdinçler, P., Kaynar, MY., Canbaz, B., Madazlı, R., Çıplak, N., Kудay, C., 1995. Meningomiyelosel'li Çocuklarda Prenatal Tanı Konma Şansı (52 olgunun analizi), *Perinatoloji Dergisi*, Cilt 3, Sayı: 3-4/Ağustos-Eylül, 31-34

Gebbia, M., Ferrero, GB., Pilia, G., Bassi, MT., Aylsworth, A., Penman-Splitt, M., Bird, LM., Bamforth, JS., Burn, J., Schlessinger, D., Nelson, DL., Casey, B., 1997. X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3, *Nat Genet.*, 17(3):305-8.

Gökalp, HZ., Erongun, U., 1988. Nöroşirürji Ders Kitabı, s.295

Göksoy, T., 2009. Nörolojik Rehabilitasyon Sinir Sistemi Hastalıklarında Tanı-Tedavi ve Rehabilitasyon, Nobel Tıp Kitabevleri, s:496

Greene, ND., Stanier, P., Moore, GE., 2011. The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects, *Epigenetics*, 6(7):875-83

Grinberg, I., Northrup, H., Ardinger, H., Prasad, C., Dobyns, W.B., Millen, K.J., 2004. Heterozygous deletion of the linked genes ZIC1 and ZIC4 is involved in Dandy–Walker malformation, *Nature Genetics*, 36, pp. 1053–1055

Gringberg, J., Millen, KJ., 2005. The ZIC Gene Family in Development and Disease, *Clin. Genet.*, 67:290-296

Güvenc, H., Uslu, MA., Güvenc, M., Özekici, U., Kocabay, K., Bektaş, S., 1993. Changing trend of neural tube defects in Eastern Turkey. *Epidemiol Community Health*, 47: 40-41.

Harisha, PN., Devi, BI., Christopher, R., Kruthika-Vinod, TP., 2010. Impact of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects, *J Neurosurg Pediatr*, 6(4):364-7.

Himmetoglu, O., Tiras, MB., Gursoy, R., Karabacak, O., Sahin, I., Onan, A., 1996, The incidence of congenital malformations in a Turkish population. *Int J Gynaecol Obstet*. 55(2):117-21.

Hu, CF., Fan, HC., Chang, CF., Wang, CC., Chen, SJ., 2011. Successful treatment of Dandy-Walker syndrome by endoscopic third ventriculostomy in a 6-month-old girl with progressive hydrocephalus: a case report and literature review, *Pediatr Neonatol.*, 52(1):42-5

Inoue, T., Hatayama, M., Tohmonda, T., Itohara, S., Aruga, J., Mikoshiba, K., 2004. Mouse ZIC 5 Deficiency Results in Neural Tube Defects and Hypoplasia of Cephalic Neural Crest Derivatives, *Developmental Biology*, 270:146-162

Inoue, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Aruga, J., 2008. Zic Deficiency in the Cortical Marginal Zone and Meninges Results in Cortical Lamination Defects Resembling Those in Type II Lissencephaly, *The Journal of Neuroscience*, 28(18):4712– 4725

Inoue, T., Ota, M., Mikoshiba, K., Aruga, J., 2007. Zic2 and Zic3 synergistically control neurulation and segmentation of paraxial mesoderm in mouse embryo, *Dev Biol.*, 15;306(2):669-84.

Ishiguro, A., Inoue, T., Mikoshiba, K., Aruga, J., 2004. Molecular Properties of Zic4 and Zic5 Proteins: Functional Diversity Within Zic Family, Biochemical and Biophysical Research Communications 324:302-307

Karaca, NE., Karaca, E., Onay, H., Gündüz, C., Egemen, A., Özkinay, F., 2012, Nöral tüp defektlerinde annelerde MTHFR gen polimorfizmleri ve diğer risk faktörlerinin değerlendirilmesi, Ege Tıp Dergisi, 51(1): 37-42

Klootwijk, R., Groenen, P., Schijvenaars, M., Hol, F., Hamel, B., Straatman, H., Steegers, R., Mariman, E., Franke, B., 2004. Genetic variants in ZIC1, ZIC2 and ZIC3 are not major risk factors for neural tube defects in humans, American Journal of medical genetics, 124A:40-47

Klug, WS., Cummings, MR., 2003. Genetik Kavramlar, Çeviri Editörü Cihan Öner, Palme yayıncılık, Ankara, 521-525

Koyabu, Y., Nakata, K., Mizugishi, K., Aruga, J., Mikoshiba, K., 2001. Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins, J Biol Chem., 276(10):6889-92.

Layden, MJ., Meyer, NP., Pang, K., Seaver, EC., Martindale, MQ., 2010. Expression and phylogenetic analysis of the zic gene family in the evolution and development of metazoans, Evodevo., 5;1(1):12.

Levine, AB., 1998. Reproductive health in diabetic women. A report of two cases demonstrating the importance of preconception care, J Reprod Med, 43: 691-692.

Lindsay, KW., Bone, I., Callander, R., 2000, Resimli açıklamaları ile nöroloji ve nöroşirürji, Çev.Ed. Mustafa Bozbuğa, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, s:410

Massuet, CG., Henderson, DJ., Greene, N., Copp, AJ., 2005. ZIC4, a zinc-finger transcription factor, is expressed in the developing Mouse nervous system, developmental Dynamics, 233:1110-1115

Merzdorf, C.S., 2007. Emerging roles for zic genes in early development, Developmental Dynamics, 236, pp. 922–940

Milunsky, A., Jick, H., Jick, SS., Bruell, CL MacLaughlin, DS., Rothman, KJ., Willett, W., 1989. Multivitamin/Folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects, *JAMA*, 262:2847-2852

Mizugishi, K., Aruga, J., Nakata, K., Mikoshiba, K., 2001. Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins, *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 2180–2188

Mocan, H., Bozkaya, H., Mocan, MZ., Furtun, EM., 1990. Changing incidence of anencephaly in the eastern Black Sea region of Turkey and Chernobly, *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 4(3):264-268

Mocan, H., Aydemir, V., Bozkaya, H., Mocan, MZ., Özbay, G., 1992. Incidence of neural tube defects (NTD) in Ankara, Turkey, prior to and after the Chernobyl disaster, *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 6(1):111-114

Nagai, T., Aruga, J., Minowa, O., Sugimoto, T., Ohno, Y., Noda, T., Mikoshiba, K., 2000. ZIC2 regulates the kinetics of neurulation, *National Academy of Sciences*, 97(4):1618-23.

Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Gunther, T., Sporle, R., Schughart, K., Mikoshiba, K., 1997. The Expression of the Mouse Zic1, Zic2, and Zic3 Gene Suggests an Essential Role for Zic Genes in Body Pattern Formation, *Developmental Biology*, 182, 299–313

Nakata, K., Koyabu, Y., Aruga, J., Mikoshiba, K., 2000. A novel member of the Xenopus Zic family, Zic5, mediates neural crest development, *Mech Dev.*, 99(1-2):83-91.

Neyzi, O., Ertuğrul, T., 2002. *Pediatric 2, Nobel Tıp Kitabevleri*, 3. Baskı, s.1338-1341

Nussbaum, RL., McInnes, RR., Willard, HF., 2005. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik*, Güneş Kitabevi, Ankara, 6.Baskı, s.445

Onrat, S.T., Seyman, H., Konuk, M., 2009. Incidence of neural tube defects in Afyonkarahisar, Western Turkey, *Genetics and Molecular Research* 8 (1): 154-161

Örs, OP., Güngör, AÇ., Gencer, M., Yücesoy, K., Hacıvelioğlu, S., Kızıldağ, B., Sılan, F., 2012. Nöral tüp defekti gebeliği olan olguda terminasyon kararı, *Smyrna Tıp Dergisi*, pp:27-30

Pan, H., Gustafsson, MK., Aruga, J., Tiedken, JJ., Chen, JC., Emerson, CP., 2011. A role for Zic1 and Zic2 in Myf5 regulation and somite myogenesis, *Dev Biol.*, 1;351(1):120-7.

Pulikkunnel, ST., Thomas, SV., 2005. Neural tube defects: pathogenesis and folate metabolism, *J Assoc Physicians India*, 53:127-35.

Purandare, SM., Ware, SM., Kwan, KM., Gebbia, M., Bassi, MT., Deng, JM., Vogel, H., Behringer, RR., Belmont, JW., Casey, B., 2002. A complex syndrome of left-right axis, central nervous system and axial skeleton defects in Zic3 mutant mice *Development*, 129, pp. 2293–2302

Sadler, TW., 1993. *Langman's Medikal Embriyoloji*, çeviri editörü: Can Başaklar, Palme Yayıncılık, Ankara, 6.Baskı, s:386

Sakai-Kato, K., Umezawa, Y., Mikoshiba, K., Aruga, J., Utsunomiya-Tate, N., 2009. Stability of folding structure of Zic zinc finger proteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384: 362–365

Saraç, M., 2009. Spina Bifidalı Hastalarda Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (Mthfr), Paired-Box3 (Pax3) ve Transkripsiyon Faktör2 (Tead2) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması, *Uzmanlık Tezi*, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Fırat Üniv. Tıp Fak., Elazığ

Saraç, M., Özel, ŞK., Kaplan, M., Kazez, A., 2007. Spina Bifida: Doğu Anadolu'daki durum. XXV. *Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi*, 22-27 Ekim, Çeşme, İzmir

Şeftalioğlu, A., 1998. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi, Tıp & Teknik Yayıncılık, Ankara, 3. Baskı, s:620

Shang, Y., Zhao, H., Niu, B., Li, W., Zhou, R., Zhang, T., Xie J., 2008. Correlation of polymorphism of MTHFRs and RFC-1 genes with neural tube defects in China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 82(1):3-7.

Spina Bifida, <http://www.sbawi.org/what-is-spina-bifida.html>, 01 Aralık 2012

Steven E, Evrovski J, Cole D., 1997. Clinic chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem*, 30:189-201

Tanrıverdi, HA., Çınar, E., Akbulut, V., Barut, A., 2007. Birinci Trimesterde Sonografi ile Saptanan Holoprozensefali, Perinatoloji Dergisi, 15(2):82 – 86

Tinkle, MB. and Sterling, BS., 1997. Neural tube defects: A primary prevention role for nurses, J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 26: 503-523.

Tunçbilek, E., Boduroğlu, K., Alikışifoğlu, M., 1999. Neural tube defects in Turkey: Prevalence, distribution and risk factors, Turk J Pediatr, 41: 299-305.

Tunçbilek, E., 2004. Türkiye'deki yüksek nöral tüp defekti sıklığı ve önlemek için yapılabilecekler, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 47: 79-84

Tüzün, Y., Küçüktaş, M., Keskin, S., 2006. Gebelerde dermatolojik tedavi, Dermatose, 5(2): 124-130

Tyshchenko, N., Lurie, I., Schinzel, A., 2008. Chromosomal Map of Human Brain Malformations, Hum Genet., 124:73-80

Ulukutlu, L. ve Aydın, A., 1991. Pediatri Ders Notları 2. Cilt, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, s: 900-901

Van der Put, NMJ., Gabreels, F., Stevens, EMB., Smeitink, JAM., Trijbels, FJM., Eskes, TKAB., van den Heuvel, LP., Blom, HJ., 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? Am J Hum Genet., 62: 1044-1051.

Van der Put, NMJ., Steegers-Theunissen, RPM., Frosst, P., Trijbels, FJM., Eskes, TKAB., Van den Heuvel, LP., Mariman, EC., den Heyer, M., Rozen, R., Blom, HJ., 1995. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet, 346: 1070.

Wang, J., Liu, C., Zhao, H., Wang, F., Guo, J., Xie, H., Lu, X., Bao, Y., Pei, L., Niu, B., Zhong, R., Zheng, X., Zhang, T., 2011. Association between a 45-bp 3'untranslated insertion/deletion polymorphism in exon 8 of UCP2 gene and neural tube defects in a high-risk area of China, Reprod Sci., 18(6):556-60.

Ware, S.M., Peng, J., Zhu, L., Fernbach, S., Colicos, S., Casey B., Towbin, J., Belmont, JW., 2004. Identification and functional analysis of ZIC3 mutations in

heterotaxy and related congenital heart defects, American Journal of Human Genetics, 74, pp. 93–105

Warr, N., Powles-Glover, N., Chappell, A., Robson, J., Norris, D., Arkell, R.M., 2008. ZIC2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation, Human molecular genetics, 17(19): 2986-2996

Yaliwal, LV. and Desai, RM., 2012. Methylenetetrahydrofolate reductase mutations, a genetic cause for familial recurrent neural tube defects, 18(1):122-4.

Yan, L., Zhao, L., Long, Y., Zou, P., Ji, G., Gu, A., Zhao, P., 2012. Association of the Maternal MTHFR C677T Polymorphism with Susceptibility to Neural Tube Defects in Offsprings: Evidence from 25 Case-Control Studies, PLoS One, 7(10):e41689.

Yazıcıoğlu, Ç., 2008. Fetal Hidrosefali Ve Nöral Tüp Defekti Olan Gebelerde Total Oksidan Seviye total Antioksidan Kapasite-Oksidatif Stres İndeksinin Değerlendirilmesi: Prospektif Kontrollü Klinik Çalışma, *Uzmanlık Tezi*, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gaziantep Üniv.Tıp Fak., Gaziantep

Yıldız, D. ve Akbayrak, N., 2008. Nöral tüp defektleri ve önlemede hemşirelik yaklaşımları, Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 11 (2): 102-111.

Yılmaz, E., Efetürk, T., Nas, T., 2007. Birinci Trimesterde Prenatal Anensafali Tanısı: Olgu Sunumu, Perinatoloji Dergisi, 15(2):73 – 76

Zhang, Z.H., Chen, F., Zhang, X.L., Jin, Y., Bai, J., Fu, S.B., 2008. PTPN22 allelepymorphisms in 15 chinese populations, Int J Immunogenet, 35(6), 433-440.

EK-1: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın Gönüllü,

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda ZIC5 adı verilen bir gendeki değişimlerin nöral tüp defekti (NTD; spina bifida) hastalığındaki etkisi ile ilgili olarak çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada spina bifidalı hastalardan alınan kan örneklerinden ZIC5 genindeki değişimlerin taraması yapılarak hastalıkla ilişkisi ortaya konulmaya çalışılacaktır.

Araştırmanın ismi: Nöral Tüp Defekli (Spina Bifidalı) Hastalarda ZIC5 Genindeki Mutasyonların Araştırılması

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni çocuğunuzda Nöral Tüp Defekti tanısının bulunmasıdır. F.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Beyin Cerrahisi BD ve Tıbbi Biyoloji AD'nın ortak katılımı ile hastalığın tedavisi ve rutin kontrolleri yapılacaktır. Spina bifida ölüm ve sakatlık oranı yüksek doğumsal bir hastalıktır. Çoğunlukla folik asit eksikliği ile birlikte genetik faktörler veya gebelikte kullanılan bazı ilaçlardan kaynaklanan, ayakların sağlıklı bir şekilde kullanılamaması, mesane ve bağırsak problemleri gibi yaşam boyu kalıcı sakatlıklara yol açan bir bozukluktur. Ailelerin ve sağlık kurumlarının bu çocukların tedavisi için gösterdiği çabalar tam tedavi edici sonuç verememekte, bu bireyler ömür boyu tıbbi bakıma ihtiyaç duymaktadır. Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de Nöral Tüp Defekti sıklığı ve dağılımındaki farklılıklar, etyolojik faktörler olarak beslenme, kültürel veya genetik nedenler gibi bazı özgün veya özgün olmayan nedenlerin incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Sizin çocuğunuz için etkin olacak tedavi şekli doktorunuz tarafından belirlenecektir. Çocuğunuzla birlikte çalışmaya katılmanız da tanıyı koymak için tüm hastalarda yapılan kan tetkikleri yapıp, tedavileri diğer hastalar gibi yapılacaktır. Rutin tanı için 1 ml periferik kan örneği alınacaktır ve ZIC5 gen değişimleri çalışılacaktır. Bu çalışmalar sırasında çocuğunuzdan fazladan kan alınmayacak kendi sağlığı açısından gerekli rutin kontrolü sırasında alınan kanlardan gen değişimi çalışılacaktır. Biyokimyasal parametreler hastanın rutin kontrol dosyasından elde edilecektir.

Sizin de bu araştırmaya hasta grubunu ()/ sağlıklı kontrol grubunu () temsilen katılmanızı öneriyoruz. Hasta grubu gönüllüleri için araştırmanın sonucunda eğer spina bifida hastalığı grubunda kontrol grubuna göre fark tespit edilirse tanı ve tedavi amaçlı araştırmalarda faydalı olacağını düşünüyöruz.

Sağlıklı gönüllüler kendisi ve birinci derece akrabalarında spina bifidası olmayan sağlıklı bireyleri içerecektir. Sağlıklı gönüllüler için kısa vadede bir fayda sağlanmayacak, ancak hayatınızın ileri aşamalarında araştırılan bu hastalıkla ilişkili bir risk faktörü taşıyıp taşımadığınız konusundaki muhtemel bilimsel kazanımlardan faydalanılacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:

- 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.
- 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Bu alışma sonucunda spina bifidalı hastalardan alınan kan örnekleri ve anemnezler sonucunda ayrıntılı bir genetik danışmanlık hizmeti verilecektir. Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz tarafından çocuğunuzun spina bifida hastalığına yönelik tedavisi yapılacak ve kayıt tutulacaktır. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Araştırmaya bağlı göreceğiniz olası bir zararda sorumluluğu üstleneceğimizi ve zararın giderilmesi için her türlü müdahalenin yapılacağını ve bu durumla ilgili tüm harcamaları üstleneceğimi bilmenizi isteriz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN sorumluluğunda ilgili doktor tarafından F.Ü. Tıp Fakóltesi Hastanesi ocuk Cerrahisi BD ve F.Ü. Tıp Fakóltesi Beyin Cerrahisi BD tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılaçağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, F.Ü Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Beyin Cerrahisi BD'nı 0 424 2333555/ 2660-2909 arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Hastanın Ebeveyninin

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

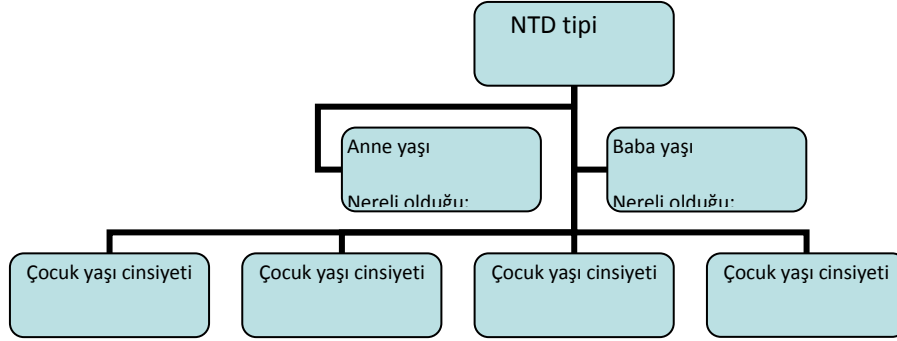
İmza

EK-2 : SPİNA BİFİDA ANAMNEZ FORMU

Dosya No:

Tarih:

1. Ailenin Değerlendirilmesi (Pedigri)



1. Akraba evliliği Yok () Var () Derecesi:

2. Maternal faktörlerin değerlendirilmesi

- | | | | |
|--|---------|---------|-------|
| 1. Annede sigara kullanımı | Yok () | Var () | |
| 2. Annede BMI (vücut kitle indeksi) | | | |
| 3. Annede diyabet | Yok () | Var () | Tipi: |
| 4. Gebelikte vitamin B12 kullanımı | Yok () | Var () | |
| 5. Gebelikte folik asit kullanımı | Yok () | Var () | |
| 6. Annede epilepsi | Yok () | Var () | |
| 7. Gebeliğin 3-4 haftalarında geçirilen ateşli hastalıklar | Yok () | Var () | |

Hangi hastalık:

3. Hastanın değerlendirilmesi:

Cinsiyet:

Yaş:

1. Disrafizmin tipi (meningosel, meningomyelosel, myeloşizis vs):
2. Eşlik eden santral sinir sistemi anomalisi (corpus callosum disgenезisi gibi):
3. Eşlik eden diğer sistem anomalileri:

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı : Yasemin AŞKIN

Doğum Yeri ve Tarihi : DİYARBAKIR / 06.01.1983

EĞİTİM BİLGİLERİ

1988-1996 Namık Kemal İlkokulu / MALATYA

1996-2000 Hacı Ahmet Akıncı Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) / MALATYA

AKADEMİK BİLGİLER

2000-2005 Lisans- İnönü Ünv. Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğrt. Bölümü /MALATYA

2005-2008 Yüksek Lisans- Fırat Ünv. Fen Edebiyat Fak. Genel Biyoloji AD / ELAZIĞ

2008- Doktora- Fırat Ünv. Fen Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD / ELAZIĞ

İŞ DENEYİMİ

2007-2008 Siverek Kız Meslek Lisesi Biyoloji öğretmeni /ŞANLIURFA

2007-2008 Harran Ünv. Siverek Mes. Yük. Okulu Gıda Tek. Böl. Öğrt. Görevlisi /Ş.URFA

2008-2010 Ticaret Meslek Lisesi Biyoloji öğretmeni / TOKAT

2010- Gazi Lisesi Biyoloji öğretmeni / ELAZIĞ

ALDIĞI ÖDÜLLER

2000-2005 İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölüm İkinciliği

2008-2012 Tübitak BİDEB Doktora Bursu