

# **Solunum Yolu Problemi Olan Preterm Ve Term Yenidoğanlarda Kistik Fibrozis Mutasyon Sıklığının Belirlenmesi**

**Sema Tanrıverdi<sup>1</sup>, Hüseyin Onay<sup>2</sup>, Esra Özer<sup>1</sup>, Muzaffer Polat<sup>3</sup>**

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**<sup>3</sup>Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, <sup>1</sup>Neonatoloji BD, Manisa**

**<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, İzmir**


# Giriş

- *Kistik Fibrozis (KF)*, akciğerler, pankreas, barsaklarda mukus salgılayan bezler, karaciğer ve ter bezleri olmak üzere epitelyal yüzeyi bulunan tüm organ sistemlerini etkileyen, mortalite ve morbiditesi yüksek, *kistik fibrozis transmembran regülatör (KFTR)* geninin mutasyonu ile ortaya çıkan otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır

# Giriş

- Tekrarlayan akciğer enfeksiyonları
- Pankreas yetmezliği
- Yüksek ter klor seviyeleri
- Hafif veya atipik semptomlarla da kendini gösterebilir
- Bu nedenle klinisyenler, bu özelliklerin sadece birkaçı olsa bile KF olasılığına karşı uyanık olmalıdırlar

# Giriş

- KF tanısı, *KFTR* geninin genetik ve/veya fonksiyonel anormalliklerinin bulunmasına dayanır
  - Hafif klinik semptomlar
  - Normal ya da sınırda ter klorür düzeyi
- 
- Genetik analiz
  - Fonksiyonel kriterler

# Giriş

- KFTR ile ilişkili bozukluk
  - KFTR disfonksiyonu
  - Tam genetik ya da fonksiyonel kriterler yok
  - Tek bir organ sistemine sınırlı klinik hastalık
  - İzole obstrüktif azoospermi, kronik sinüzit, kronik pankreatit
  - Hastalar, yeni hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasını önlemek ve genetik danışmanlık açısından takip edilmelidirler

# Giriş

- KFTR ile ilişkili metabolik sendrom
  - Geçici bir tanıdır ve takip gerektirir
  - Pozitif yenidoğan tarama sonuçları
  - Asemptomatik bebek
  - Bazılarında, pozitif ter testi
  - KF'nin klinik özellikleri (hastalık genellikle hafif olmakla birlikte) gelişmeye devam edebilir
  - İzole erkek infertilitesi de dahil olmak üzere *KFTR* ile ilişkili hastalık belirtileri gelişebilir ya da tamamen asemptomatik kalabilirler

# Giriş

- Klinik semptomların başlangıcı, *KFTR* genotipindeki ve diğer bireysel faktörlerdeki farklılıklara bağlı olarak geniş çapta değişir
- Semptomların yokluğunda bile sıklıkla solunum fonksiyon anormallikleri saptanabilir

# Amaç

- Bu çalışmada, solunum sıkıntısı olan bebeklerde *KF mutasyon sıklığının ve KFTF genindeki yeni mutasyonların saptanması* amaçlanmıştır



# Yöntem

- *Mayıs 2017 ve Ocak 2018* arasında
- Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde solunum sıkıntısı nedeniyle yatan term ve preterm bebekler hasta grubunu olarak çalışmaya alındı, ( $n=20$ )
- Solunum sıkıntısı olmayan term ve preterm bebekler de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı, ( $n=20$ )
- Dışlama kriterleri
  - Konjenital anatomik solunum yolu hastalığı
  - Konjenital kalp hastalığı
  - Perinatal asfiksi
  - Mekonyum aspirasyon sendromu
  - Metabolik ve hematolojik nedenlere bağlı solunum sıkıntısı

# Yöntem

- Bebekten alınan kan örneklerinden, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında DNA izolasyonu yapıldı
  - Termal cycler (*Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600*) kullanılarak DNA amplikasyonu uygulandı
  - Dizi analizi için Sanger sekans (kapiller elektroforez) platformu kullanıldı
  - KFTR geninin tüm ekzonları çoğaltılarak, pürifikasyon işlemleri yapıldı
  - İlgili ürünler kapiller elektroforez cihazında yürütüldü
  - Sequencing Analysis yazılımı programı kullanılarak her örnek analiz edildi
  - Chromas programı kullanılarak, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresine girilip normal dizi ile karşılaştırıldı ve bulunan mutasyonlar isimlendirildi

	<b>Kontrol Grubu (n=20)</b>	<b>Hasta Grubu (n=20)</b>	<b>p</b>
Gestasyonel yaş (hf)	38,20 ± 1,15 8 (37-41)	34,25 ± 4,65 (26-40)	0,062
Doğum ağırlığı (g)	3278 ± 585,622 (1970-4180)	2273 ± 994,63 (610-3850)	0,297
Doğum boyu (cm)	49,95 ± 1,70 (45-53)	44,20 ± 6,37 (33-51)	0,186
Doğum baş çevresi (cm)	34,55 ± 1,15 (31,5-37)	31,50 ± 3,84 (23-37)	0,134
Doğum şekli			<b>0,017</b>
NspD	5 (%25)	0 (%0)	
C/S	15 (%75)	20 (%100)	
Cinsiyet			1
Kız	11 (%55)	11 (%55)	
Erkek	9 (%45)	9 (%45)	
İntrauterin büyüme kısıtlılığı	2 (%10)	4 (%20)	0,091
1. dk apgar skoru	8 (7-9)	7 (5-8)	<b>0,009</b>
5. dk apgar skoru	9 (9-10)	8 (7-9)	<b>0,001</b>
Anne yaşı	25,85 ± 4,47 (19-35)	29,80 ± 5,80 (1-38)	0,780

	<b>Kontrol Grubu</b> <i>(n=20)</i>	<b>Hasta Grubu</b> <i>(n=20)</i>	<b>p</b>
Preeklampsi	1 (%5)	2 (%10)	<i>0,548</i>
Ablasyoplasenta	0 (%0)	1 (%5)	<i>0,311</i>
Plasenta previa	0 (%0)	0(%0)	<i>1</i>
Gestasyoneldiyabet	0 (%0)	3 (%15)	<i>0,072</i>
Diyabetes mellitus	0 (%0)	1 (%5)	<i>0,311</i>
Uteroplasental yetmezlik	0 (%0)	0 (%0)	<i>1</i>
Gebelikte sigara kullanımı	1 (%5)	0 (%0)	<i>0,311</i>
Koryoamnionit	0 (%0)	1(%5)	<i>0,311</i>
Otoimmün Hastalık	0 (%0)	1 (%5)	<i>0,311</i>
İdrar yolu enfeksiyonu	0 (%0)	2 (%10)	<i>0,147</i>
Erken membrane rüptürü	1 (%5)	0 (%0)	<i>0,311</i>
Antibiyotik kullanımı	0 (%0)	1 (%5)	<i>0,311</i>
Antenatal steroid kullanımı	0 (%0)	2 (%10)	<i>0,147</i>
Akrabalık öyküsü	0 (%0)	1 (%5)	<i>0,311</i>

	<b>Hasta Grubu (n=20)</b>
Respiratuar distress sendromu	9 (%45)
Konjenital pnömoni	2 (%10)
Pnömoni	4 (%20)
Yenidoğan Geçiçi Takipnesi	5 (%25)
Surfaktan kullanımı	5 (%25)
Mekanik ventilatör tedavisi	11 (%55)
Mekanik ventilatör (gün)	2,25 ± 4,49 (0-20)
NCPAP uygulaması	13 (%65)
NCPAP (gün)	9,10 ± 15,43 (0-51)
Oksijen tedavisi	17 (%85)
Oksijen desteği (gün)	13,35 ± 20,71 (0-66)
BPD	3 (%15)
Steroid kullanımı	0 (%0)
İnhale steroid kullanımı	5 (%25)
Yatış süresi (gün)	24,65 ± 21,32 (9-71)

<b>Solunum sıkıntısı semptomları</b>	<b>Hasta Grubu (n=20)</b>
Öksürük	4 (%20)
Hırıltılı solunum	5 (%25)
İnlemeli solunum	10 (%50)
Apne	3 (%15)
Takipne	19 (%95)
Retraksiyon	15 (%75)
Ral/Ronküs	12 (%60)
Ekspiryum uzunluğu	1 (%5)
Taşikardi	2 (%10)
O <sub>2</sub> ihtiyacında artış	17 (%85)
Hipotoni	6 (%30)

<b>Laboratuvar bulguları</b>	<b>Hasta Grubu (n=20)</b>
CRP pozitifliği	5 (%25)
Lökositoz	10 (%50)
Trombositopeni	2 (%10)
Metabolik asidoz	5 (%25)

<b>Radyolojik bulgular</b>	<b>Hasta Grubu (n=20)</b>
Akciğer infiltrasyonu	14 (%70)
Buzlu cam görünümü	6 (%30)

<b>KFTR gen analizi</b>	<b>Hasta Grubu (n=20)</b>
KFTR normal	16 (%80)
p.A46D(c.137C>A) heterozigot	1 (%5)
p.D1312G(c.3935 A>G) heterozigot	1 (%5)
p.R117H(c.350 G>A) heterozigot	1 (%5)
p.S1476P(c.4276T>C) heterozigot	1 (%5)

<b>KTFR gen analizi</b>	<b>Kontrol grubu (n=20)</b>
KFTR normal	14 (%70)
p.E1228G (c.3683 A>G) heterozigot	1 (%5)
p.E217G (c.650A>G) heterozigot	1 (%5)
p.E632TfsX9(c.1894_1895del AG) heterozigot	1 (%5)
p.1807M (c.2421A>G) heterozigot	2 (%10)
p.S573F(c.1718C>T) heterozigot	1 (%5)

# Tartışma

- KF, akciğerleri, sindirim sistemini, ter bezlerini ve üreme sistemini etkileyen çok sistemli bir hastalıktır
- Doğumdan aylar sonra, hatta yıllar geçtikçe değişen zaman sürecinde, ilerleyici solunum yetmezliğine yol açabilir

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. N Engl J Med 2005;352:1992  
Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003;361:681  
Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:918.



# Tartışma

- KF, *KFTR* proteinini kodlayan *kromozom 7*deki tek bir geniş gendeki mutasyonlardan kaynaklanır
- Klinik hastalık, *KFTR* geninin her iki kopyasında hastalığa neden olan mutasyonlar gerektirir.
- *KFTR veri tabanı*, hastalığa neden olma potansiyeline sahip *KFTR* geninde 2000'den fazla farklı mutasyonları listelemektedir
- En yaygın mutasyon *F508 del*'dir

Drumm ML, Collins FS. Molecular biology of cystic fibrosis. Mol Genet Med 1993;3:33

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989;245:1059

Bear CE, Li CH, Kartner N, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Cell 1992;68:809

Cell 1992;68:809

Guggino WB, Banks-Schlegel SP. Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:815

# Tartışma

- *KFTR* gen dizilimi, tanıdaki herhangi bir belirsizliği olan kişilerde yapılmalıdır
- Ara ter klorür sonuçları olan hastalar, genotip henüz bilinmediyse, doğrulanmış veya şüphelenilen KF'li hastalara yapılmalıdır
- Bu hastalarda, gen analizi tanıyı doğrular ve spesifik *KFTR* mutasyonunun bilgisi de tedavi ve prognoz için önemli etkilere sahiptir

Farrell PM, White TB, Ren CL, et al. Diagnosis of Cystic\_Fibrosis:Consensus\_Guidelines from\_the\_Cystic\_Fibrosis Foundation. J Pediatr 2017;181S:S4.

Groves T, Robinson P, Wiley V, Fitzgerald DA. Long-term\_outcomes of children\_with intermediate\_sweat\_chloride\_values in infancy. J Pediatr 2015;166:1469.

# Tartışma

- KF'nin, genetik ve fenotipik bilgiler arasındaki bağlantıları uluslararası bir konsorsiyum (KFTR'nin Klinik ve İşlevsel Çevirisi) tarafından toplanır ve sonuçlar konsorsiyumun web sitesinde (*cftr2.org*) yayınlanır
- Yüzlerce *KFTR* mutasyonunun spesifik fenotipik yönleri ile ilgili bilgiler bugüne kadar açıklanmıştır
- *Kistik Fibrozis Mutasyon Veri Tabanı (KFMV)*, hastalığa neden olma potansiyeline sahip *KFTR* geninde 1500'den fazla farklı mutasyonları listelemektedir

[www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)

# Tartışma

- Solunum sıkıntısı olmayan kontrol grubundaki bir bebeğimizde saptanan *c1718C>T heterozigot mutasyonunun* fenotipik olarak yenidoğan döneminde IRT yüksekliğine neden olduğu belirtilmiştir ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/))
- Bizim olgumuzda, IRT tarama testi normal olarak değerlendirilmiştir

# Tartışma

- Solunum sıkıntısı olmayan kontrol grubundaki iki bebeğimizde *c.242 1A>G heterozigot mutasyonu* saptandı
- Fransızlar'da bulunan bir polimorfizm olarak değerlendirilmiştir
- KFMV'da *c.242 1A>G heterozigot mutasyonu*, 8 hastada bildirilmiştir ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/))
  - Asemptomatik compound heterozigot mutasyonu,  $n=1$
  - *KFTR ile ilişkili bozukluk*,  $n=7$ 
    - Konjenital bilateral vas deferens yokluğu,  $n=3$
    - Kronik pankreatit,  $n=3$
    - Değişik klinik bulgular,  $n=1$

# Tartışma

- *KFTR ile ilişkili bozukluğu* olan hastalar periyodik olarak takip edilmelidir
- *KFTR ile ilişkili bozukluğu* olan bireylerin tahmini prevalansı ve hastalık belirtileri ileride değişebilir
- Bu nedenle, yenidoğan döneminde semptomatik olmayan bu iki olgumuz takibe alınmıştır.

De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic\_fibrosis:\_terminology\_and\_diagnostic\_algorithms\_Thorax 2006;61:627.

Farrell\_PM, White TB, Ren CL, et al. Diagnosis of Cystic\_Fibrosis:\_Consensus\_Guidelines\_from\_the\_Cystic\_Fibrosis Foundation. J Pediatr 2017;181S:S4.

Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Bombieri C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. Journal of Cystic Fibrosis. 2011;10:86-102.

# Tartışma

- Solunum sıkıntısı olmayan, kontrol grubundaki bir bebeğimizde *c.3683A>G heterozigot mutasyonu* saptandı
- KFMV'da, bu mutasyonda 2000 yılında 9 yaşındaki Türk bir kız çocuğunda tespit edilmiştir. 1 yaşında tanı alan bu hastanın ter testinde klor <60 mmol/L iken ciddi solunum bulguları ve bronşiektazisinin geliştiği bildirilmiştir ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/))

# Tartışma

- Kontrol grubundaki diğer bir bebekte ise *c.650A>G heterozigot mutasyonu* saptandı
- KFMV'da, bu mutasyonun Portekizli 2 yaşındaki bir erkek hastada tespit edildiği, bu hastada ter testinin 60-80 meQ/L bulunduğu, pankreatik yetmezlik ve orta derecede akciğer hastalığının olduğu bildirilmiştir
- 1999 yılında da Yoshimura ve arkadaşları tarafından bir hastada tespit edilmiş ve bu hastada ise diffüz panbronşiolit bulguları bildirilmiştir



# Tartışma

- Kontrol grubundaki bir bebekte, *c.1894\_1895del AG heterozigot mutasyonu* saptandı
- Literatürde *KFTR gen analizinde* bu mutasyon ile ilgili bildirilmiş bir olguya rastlanmadı
- KFMV'da da bu mutasyonla ilgili bildirilmiş olgu bulunamadı

# Tartışma

- Solunum sıkıntısı olan bir bebekte *c.137C>A heterozigot mutasyonu* saptanmıştı
- Bu mutasyon şimdiye kadar ciddi solunum sistemi bulguları olan ve ter testinde klor yüksekliği olan hastalarda tespit edilmiştir.
- Bu mutasyon iki Yunanlı Kistik Fibrozisli hastada bulunmuştur. Bu hastalardan birinin 18 yaşında olduğu, ter testinin 80 mEq/l, solunum fonksiyon testlerinde FEV1 %58 olduğu ve *Pseudomonas* enfeksiyonları olduğu; diğer hastanın 30 yaşında olduğu, ter testinin 92.5 mEq/l, solunum fonksiyon testlerinden FEV1 %92.5 olduğu, *Pseudomonas* enfeksiyonlarının olduğu ve pankreatik yetmezliğinin olduğu bildirilmiştir

# Tartışma

- Hasta grubunda bir bebekte *c.3935A>G heterozigot mutasyonu* saptanmıştı
- KFMV'da, bu mutasyon 2008 yılında 14 yaşında bir erkek hastada tespit edilmiştir
- Ter testi negatif olan hastada kronik sinüzit, *Pseudomonas* ile enfekte bronşit, boy kısalığı ve büyüme geriliği olduğu bildirilmiştir ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/))

# Tartışma

- Hasta grubundaki bir bebekte *c.4276T>C heterozigot mutasyonu* saptandı
- KFMV'da, bu mutasyon 1999 yılında konjenital bilateral vas deferans yokluğu olan bir hastada bulunmuştur ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/))

# Tartışma

- Hasta grubundaki bir bebekte *c.350G>C heterozigot mutasyonu* saptanmıştır
- Bu mutasyon, KF'de görülen 10 yaygın mutasyondan birisidir (*ΔF508, ΔI507, V520F, G551D, G542X, R553X, R117H, 621 + IG→T, N1303K, A455E*)
- Bu mutasyonun hastalık fenotipi asemptomatikten klasik KF hastalığına kadar değişebilir
- Bu nedenle, bu mutasyona bağlı fenotipik değişikliklerden dolayı genetik danışmalığı da zordur

# Sonuç

- Çalışmamızda, yenidoğan döneminde solunum sıkıntısı olan ve olmayan bebekler arasında, KFTR gen analizi açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı
- Solunum sıkıntısı olan bebeklerin %20'sinde KFTR heterozigot mutasyonluğu saptanırken solunum sıkıntısı olmayan bebeklerin %30'unda KFTR gen heterozigot mutasyonluğu saptandı

# Sonuç

- Bu da bize, yenidoğan döneminde semptomatik olmayan bu bebeklerin KFTR ile ilişkili bozukluk açısından takip edilmesi ve ailelerine genetik danışmanlık yapılması gerektiğini göstermektedir
- Asemptomatik olan bir bebekte tespit edilen KFTR genindeki *p.E632TfsX9 (c.1894\_1895del AG) heterozigot mutasyonu*, literatürde ilk kez bildirilen bir mutasyondur

Teşekkürler...