

## Kistik Fibrozis ve Moleküler-Genetik Yaklaşımlar

Esra Tuğ<sup>1</sup>, Tuncer Tuğ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Elazığ

<sup>2</sup> Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD, Elazığ

### ÖZET

Kistik fibrozis, yaklaşık 1/25 taşıyıcı sıklığı ve 1/2000-3500 canlı doğum insidansı ile, beyaz ırkta otozomal resesif geçiş gösteren en yaygın ölümcül hastalıktır. Tüm sistemlerdeki egzokrin glandları etkiler. Temel bozukluk ter, tükürük, trakeobronşiyal ağaç, kalın barsak ve pankreas egzokrin glandlarından anormal sekresyonların oluşumudur. Önde gelen klinik belirtiler, kronik obstrüktif akciğer hastalığına ve pankreas yetersizliğine ait bulgulardır. Kistik fibrozis hastaları için ortalama yaşam süresi 30-33 yıldır ve bazı hastalar seyrek olarak 40 ve 50 yıl yaşar. Ancak az sayıda hasta 50 yaşından fazla yaşayabilmiştir. Tekrarlayan pulmoner infeksiyonlar ölümün en sık sebebidir. Uzun süredir bilimsel çevrelerde, kistik fibrozis gibi somatik ve kalıtılmış hastalıklara genlerdeki nokta mutasyonların neden olduğu kabul edilmektedir. Kistik fibroziste, etkilenmiş dokulardan cDNA araştırması ve çapraz tür hibridizasyon tekniği ile kistik fibrozis geni (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-CFTR-Gene) izole edilmiştir. Kistik fibrozisli hastaların akciğer ve pankreas gibi dokularından bağlantı analizi ile elde edilen DNA daraltılarak, bu segmentteki genlerin ekspresyonuna bakılabilir. CFTR geninde 1000'in üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar, gen kodonunun yanlış okunmasına yol açan delesyon ve inversiyonlar kadar, missens ve nonsens nokta mutasyonlarını da kapsar. Bu mutasyonlar nadir olup, moleküler seviyede dikkati çeken heterojenite toplum araştırma programlarının planlanmasında önemli bir anlama sahiptir. Moleküler-genetik alanındaki umut verici araştırmalarla, hastalığın özgül tedavisine yönelik gen terapisi yöntemlerinin geliştirilmesine çalışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: kistik fibrozis, moleküler-genetik yaklaşımlar, tanı, mutasyonlar

*Toraks Dergisi, 2003;4(2):198-204*

### ABSTRACT

#### Cystic Fibrosis and Molecular-Genetic Approaches

Cystic fibrosis is a multisystem disorder of exocrine glands. It is represented as the most common autosomal recessive lethal disorder of white race with an incidence of 1/2000-3500 in live births and a heterozygosity prevalence of 1/25 among whites. The characteristic feature of the disease is the production of abnormal secretions in sweat, salivary, tracheobronchial, colon and pancreatic exocrine glands. Signs of chronic obstructive pulmonary disease and pancreatic insufficiency constitute the presenting signs of cystic fibrosis. Mean survival is 30-33 years but some patients may reach to fourth and fifth decades for homozygotes; however, few patients have been reported to live more than 50 years. Recurrent pulmonary infections are the most common cause of death in cystic fibrosis patients. Cystic fibrosis gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-CFTR-Gene) has been isolated from affected tissues by cross species hybridization technique. Expression of the CFTR gene in DNA segments isolated by linkage analysis from the affected tissues (i.e. lung, pancreas) might be searched for the diagnosis. More than 1000 mutations has been described in the cystic fibrosis gene. These include missreading of codons occurred as a result of deletions and inversions, and missense and nonsensese point mutations. The heterogenicity of these mutations, put forward the necessity of surveillance programs. Specific gene treatment methods are still endeavored to be developed for cystic fibrosis.

Key words: cystic fibrosis, molecular-genetic approaches, diagnosis, mutations

Yazışma adresi: Yrd. Doç. Dr. Tuncer Tuğ  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Göğüs Hastalıkları AD, 23119 Elazığ  
Tel: 0424 233 35 55/2485  
GSM: 0532 605 65 67  
Faks: 0424 237 91 38  
e-posta: tugtuncer@hotmail.com

## GİRİŞ

Kistik fibrozis, tüm sistemlerdeki egzokrin glandları etkileyen, beyaz ırktaki en yaygın ölümcül kalıtsal hastalıktır. Otozomal resesif olarak kalıtılır. Temel bozukluk, ter ve tükürük bezleri, trakeobronşiyal ağaç, kalın barsak ve pankreasa ait egzokrin glandlardan anormal sekresyonların oluşumudur [1].

Mortalite oranının yüksekliğine ve yaşam kalitesini kötüleştirici özelliğine rağmen, son yıllarda yeni ve etkin tedavi olanakları ile, kistik fibrozisli hastaların yaşam süresi ve kalitesinde belirgin iyileşmeler oluşmuştur. Gerek tipik gerekse hafif veya atipik klinik şekillerde yaşam süresinin uzaması ile kistik fibrozisli vakalarda tanının gecikebilmesi, prognoz ve tedavi etkinliğinde sorunlar oluşturabilmektedir [2].

Kistik fibrozis gen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator -CFTR- gene) lokusunun 7 numaralı kromozom üzerinde bulunduğu bilinmektedir. Spesifik DNA problemleri ile hastalığın antenatal tanı yöntemi de geliştirilmiştir [1,3,4]. Moleküler-genetik alanındaki umut verici araştırmalarla, hastalığın moleküler tanı, mutasyonlarının saptanması ve özgül gen terapisine yönelik yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır [5-7].

## Sıklık

Yaklaşık 1/25 taşıyıcı sıklığı ve 1/2000-3500 canlı doğum insidansı ile beyaz ırktaki en yaygın letal otozomal resesif geçiş gösteren bozukluktur. Cinsiyet baskınlığı yoktur. Beyaz ırk dışında sık değildir [1-3]. Ayrıca hastalık Amish'de (Ohio) yaklaşık 1/500, Kuzey Amerika yerlileri ve Hawaiiilerde 1/90 000 oranında görülmektedir. Siyah ırktan Amerikalılarda daha az sıklıkta (1/17 000) ve siyah Afrikalılarda ise hemen hiç görülmez. Vakaların, %80'ine 5 yaşından önce tanı konulmakta; %10'una ergenlik çağına kadar tanı konulamamaktadır. Az sayıdaki ve/veya hafif hastalıklı bazı olgulara 40-50 yaşına kadar tanı konulmamış olabilir [1,8].

## Klinik Bulgular

Önde gelen klinik belirtiler kronik obstrüktif akciğer hastalığına ait bulgular (hemen bütün vakalarda değişik derecelerde bulunur) ve pankreatik yetersizliktir (hastaların %80-90'ında mevcuttur) [1]. Ölümün en yaygın sebebi, tekrarlayan pulmoner infeksiyonlardır [8-10]. Hastaların balgamından izole edilen ve kistik fibrozis için klinik önem taşıyan mikroorganizmaların bulunması (*Pseudomonas aeruginosa*'nın mukoid formu gibi) ya da obstrüktif pulmoner hastalık varlığı ile birlikte infertil erkek, erişkin dönemde öncelikle tanı konulmamış kistik fibrozisi düşündürmelidir [8].

İnfeksiyon yaşamın 6. haftası kadar erken dönemde başlayabilir veya klinik tanısı akciğer hasarı oluncaya (erişkin yaşlarda) kadar gecikebilir [11].

Son yıllarda, kistik fibrozis ile uyumlu tipik klinik semptomları olmayan ve ter testi normal olan, ergenlik çağına kadar tanısı gecikebilen ve bronkodilatatörlere iyi yanıt veremeyen düşük FEV<sub>1</sub> değerine sahip astım semptomları gösteren ve astım tanısı alan, daha sonra bilateral nazal polip ve bronşektazi gelişen kistik fibrozis olguları bildirilmiştir [12]. Kistik fibrozis hastaları arasında atopi ve astım sıklığı genel nüfusa göre daha yüksektir. Birçok hasta, çeşitli alerjenlere karşı Tip I ve Tip III aşırı duyarlılık reaksiyonları gösterir. Kan IgE ve IgG düzeyleri, periferik eozinofil düzeyleri, bronş aşırı duyarlılığı ve çeşitli alerjenlere karşı deri testi yanıtlarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı yükseklik olduğu gösterilmiştir. Bu tür bulgulara sahip hafif derecede kistik fibrozisli hastalarda, tanı gecikmesi ve karışıklığı olabilir [1].

Kistik fibrozisli kişilerin %85'inde, pankreatik fonksiyon yetersizliği sonucu steatoreye sebep olan yağ ve protein malabsorpsiyonu oluşur [9,10]. Bu durum yağda çözünen vitamin yetersizlikleri, kalori açığı, büyüme ve gelişme geriliği ve rektal prolapsus gibi belirtilere yol açar [1,8].

Sağlam ya da kısmi egzokrin fonksiyonu olan hastalarda tekrarlayıcı akut pankreatitis olabilir. Eksojen insülin gerektiren diabetes mellitus %2-5 oranında gelişir. Diabetes mellitus gelişme insidansı yaş ile artar, orta derecededir, kolay kontrol edilebilir, ketoz, retinopati ve nöropati görülmez [8]. Kistik fibrozisli hastaların %10'unda siroza yol açabilen karaciğer hasarı gelişir [3]. Mekonyum ileusu, volvulus, perforasyon ve mekonyum peritonitine yol açabilir. "Clubbing" hemen tüm hastalarda görülür [3,8,9].

Ciddi kistik fibrozisli erişkin hastalarda, spesifik sol ventrikül anormallikleri bulunmadan sağ ventrikülün önemli sistolik ve diyastolik fonksiyon kaybı oluşabilmektedir [13].

## Patogenez ve Prognoz

Kistik fibrozis epitelyal bir hastalıktır. Hastalığın özelliği egzokrin salgılarda viskozite artmasıdır. Viskozitesi artmış sekresyonların birikmesi ile kanallarda tıkanma ve yapısal bozukluklar ortaya çıkar [1]. Kistik fibrozisli kişilerde, sık olarak etkilenen organlar akciğer ve pankreasır. Solunum sisteminin tüm düzeyleri etkilenebilir. Nazal polip, sinüzit ve alt solunum yolları hastalıkları yaygındır. Tekrarlayan infeksiyonlar nedeniyle hemen hemen tüm hastalarda solunum sisteminin kronik ilerleyici obstrüktif hastalığı gelişir. Mekonyum ileusundan ölen infantlarda yapılan otopsi çalışmalarında kistik fibrozisli yenidoğan akciğerinin normal olduğu görülmüştür [8-10].

Kistik fibrozis hastaları için ortalama yaşam süresi 30-33 yıldır (ABD'de 31.3, Kanada'da 31 ve İngiltere'de 31 yıl) ve bazı hastalar nadiren 40-50 yıl yaşar. Ancak az sayıda veya hafif hastalıklı bazı hastalar 50 yaşından fazla yaşayabilir [2,14].

Kistik fibroziste kronik hava yolu enfeksiyonları ve nötrofillerin baskın olduğu kronik hava yolu inflamasyonu, ilerleyici akciğer hastalığına yol açar. Kistik fibrozisli hastaların kanında inflamatuvar markerların (IL-1B, IL-8, ECP, nötrofil elastaz) konsantrasyonlarında anlamlı yükseklikler olduğu belirlenmiştir. Morbidite ve mortalitenin ana sebebi, ilerleyici bronşektaziye ve sonuçta solunum yetmezliğine neden olan kronik bronkopulmoner enfeksiyon ve inflamasyonlardır [15]. Bakteriyel ve inflamatuvar hücrelerden elastaz ve oksidanlar (serbest oksijen radikalleri) gibi inflamatuvar, proteolitik ve toksik ajanların serbestleşmesi de tabloda önemli rol oynar. Kistik fibrozisli hastalarda, solunum epitelinin oksidanlara karşı en önemli savunma mekanizması olan glutasyon düzeyleri ile obstrüktif göstergeler ( $FEV_1$ ) arasında ters bir korelasyon bulunmuştur [16,17].

En erken pulmoner değişiklikler küçük hava yolları obstrüksiyonudur. Bronşiyal glandların hipertrofisini izleyerek mukoz tıkaçlar oluşur. İnflamasyon süreci, bronşiyolit ve endobronşiyal hastalığın sentripedal ilerlemesi sonucu kronik bronşit, bronşektazi ve peribronşiyal inflamasyonla sonuçlanır [1,8].

Kistik fibrozisli hastalarda surfaktan bileşimi ve fonksiyonları önemli ölçüde değişebilir [18]. Üç majör bakteriyel organizma kistik fibrozisli hastanın hava yolunu infekte eder ya da kronik olarak kolonize olur. “*Staphylococcus aureus*” ve “*Haemophilus influenzae*”, hastaların az bir kısmında balgamdan elde edilir ve “*Pseudomonas aeruginosa*” (özellikle mukoid formları), kistik fibrozisli hastaların %90’ından fazlasında saptanır [8,19]. Hastalık ilerledikçe ve yaygın antibiyotik kullanımına bağlı olarak özellikle “*P. aeruginosa*” etken olmaya başlar ve kistik fibrozis hastaları *P. aeruginosa* enfeksiyonundan ciddi olarak etkilenir [3,20]. Diğer bakteriler (“*E. coli*” nin mukoid formu, “*Legionella*” vs.) ve diğer mikroorganizmalar, virüsler, *mycoplasma* ve funguslar kistik fibrozisli hastaların balgamında mevcut olabilir. Kistik fibrozisli hastaların aile üyeleri bu organizmalarla kolonize olmaz [8].

Akut ve kronik hava yolu ve akciğer parankimindeki inflamatuvar ve yapısal değişiklikler, hava yolu obstrüksiyonu, aşırı havalanma, yaygın fibrozis, doku kaybı ve ventilasyon perfüzyon bozukluğuna yol açar. İlerlemiş respiratuvar hastalıklı olgularda pulmoner ve bronşiyal vaskülaritede sekonder değişiklikler hemoptiziye yol açar. Ciddi hava yolu obstrüksiyonu ve hipoksemisi olan kistik fibrozis hastalarında sıklıkla pulmoner hipertansiyon gelişerek, ilerleyici sağ ventrikül yetmezliği ile sonuçlanır. Düşük  $PaO_2$  düzeyi miyokardın kontraksiyonlarını da etkileyerek geç dönemde sol ventrikül fonksiyonlarını da bozabilir [1,8].

Kistik fibrozisli kişilerde, pankreatik duktusun blokajına bağlı azalmış enzim sekresyonuyla pankreatik fonksiyon yetersizliği sonucu [10], yağ ve protein malabsorpsiyonu, yağda

çözünen vitaminlerin yetersizliği, kalori açığı, büyüme ve gelişme geriliği olur [8,9].

Kistik fibrozisli hastaların %10’u mekonyum ileusu ile doğar. Barsak obstrüksiyonu distal ileumdaki mekonyum tıkaçına bağlıdır. Tıkaçın embriyonal yaşamın son dönemlerinde oluşması aşağı barsak bölümlerinde atreziye yol açabilir. [3,8,9].

Erkek kistik fibrozis hastalarında epididim, vas deferens ve seminal kanallarda bilateral atrofi vardır [9]. Kadınlarda ise servikal mukusun viskozitesindeki bozukluk nedeniyle fertilitate azalmıştır [3]. Kadınlarda seksüel gelişme, menstrüel siklus ve fertilitate daha az etkilenir. Kistik fibrozisli kadın gebe kalabilir ve sağlıklı bebek doğurabilir [8,21].

## Tanısal Yaklaşım

Kistik fibrozisli hastaların çoğuna bebeklik ya da çocukluk çağında tanı konulabilir, ancak bazılarının tanısı erişkin döneme kadar gözden kaçabilir. Kistik fibrozisli erkeklerin %98’inden fazlası infertildir ve hastalıklı kadınlarda da fertilitate azalır. Ciddi oligo ve azospermili infertil erkeklerde saptanan genetik anormallikler içerisinde CFTR gen mutasyonlarının da olduğu bildirilmiştir [1,14,22].

Laboratuvar testleri, olası bir kistik fibrozis tanısını dışlamaz [4].

### a. Klasik Tanı Yöntemleri:

Ekrin ter bezi fonksiyonundaki Na ve Cl iyon emilim anormallığı, kistik fibrozis için yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlarına rağmen, halen tanımlayıcı bir test (ter testi) olarak kabul edilmektedir [4,8]. Kistik fibrozis hastalarının terinde Cl konsantrasyonu 70-80 mEq/L ve Na konsantrasyonu ise 45-65 mEq/L’yi geçer (normal değerler Cl için 40 mEq/L ve Na için 50 mEq/L’dir) [23]. Terde elektrolit değerleri sürrenal yetersizlik, glikojen depo hastalıkları, nefrojen diabetes insipitus, glikojen 6 fosfat dehidrojenaz eksikliği gibi durumlarda da yüksek bulunabilir. Klinik bulguları ile kistik fibrozisten ayırıcı tanıları yapılabilir. Terde elektrolit içeriğindeki artışa rağmen, ter kanalından elektrolitlerin yetersiz reabsorpsiyonu söz konusudur. Elektrolit kaybı özellikle küçük çocuklarda önemli tuz kaybına yol açabilir [3,8] Ter elektrolitleri en güvenilir şekilde pilokarpın iyontoforezi yöntemiyle ölçülür [12].

Geçen birkaç yıl içerisinde, kistik fibrozisin klinik spektrumu, düşük ter klorür konsantrasyonlu atipik klinik formları kapsayacak şekilde büyük ölçüde genişlemiştir. Uzun süredir, yenidoğanda kistik fibrozis tarama testi olarak kandaki immünoreaktif tripsinojen (IRT) düzeyi baz olarak alınmaktadır. Kandaki IRT düzeyi artışının, pankreas duktusunun blokajı sonucu oluştuğuna inanılmaktadır. Kistik fibrozisli yenidoğanlarda doğumda artmış IRT düzeyi, karakteristik

bulgu olarak kabul edilmekle birlikte sağlıklı yenidoğanlarda da yüksek bulunabilir. Bununla birlikte kistik fibrozisli yenidoğanlarda IRT düzeyi birkaç ay süreyle yüksek kalma eğilimindedir. Oysa, yanlış pozitiflik durumunda, IRT genellikle yaşamın ilk haftaları içerisinde normale döner. CFTR'nin keşfinden önce, 1980'lerde, yenidoğan bir aylık olduğunda IRT testi tekrarlanarak tarama özgüllüğü artırılmaktaydı. O zamanlar, ter testi bu kuşkuyu gideren yegane kesin tanı amaçlı yöntemdi. Normal ter testine sahip yenidoğanların kistik fibrozisli olmadığı kabul edilmekteydi. Oysa, son yıllarda kistik fibrozis ile uyumlu tipik klinik semptomları bulunmayan ve ter elektrolit konsantrasyonu ve pankreatik stimülasyon testleri normal olan kistik fibrozis olguları bildirilmiştir. Normal ter testine rağmen bazı infantlarda uzamış hipertripsinojenemi, atipik kistik fibrozis varlığı için uyarıcı olmalıdır. Bu vakaların çoğunda kesin kanıt, nazal potansiyel fark ölçümleri (NPD) ve kistik fibrozis mutasyonlarının saptanması ile sağlanabilir. R553X ve D1152H, bu tür vakalarda saptanmış iki kistik fibrozis mutasyonudur [9, 12].

Kistik fibrozisli hastalarda barsakta bulunan alkalen fosfataz gibi mikrovillus enzimlerin düşük olmasından yola çıkarak 16-18. gebelik haftalarında alınan amniyon sıvısında bu enzimlerin düzeyleri ölçülerek de tanı konulabilir [24,25].

Kistik fibrozis öyküsü olan ailelerde kullanılan yöntemlerden biri de 15. gebelik haftasından itibaren ultrasonografi ile fetusta artmış mekonyum dansitesinin gösterilmesi, genişlemiş barsak luplarının ve mekonyum peritonitinin saptanmasıdır [25,26].

## b. Moleküler-Genetik Tanı Yöntemleri:

1989'da CFTR geninin keşfinden beri moleküler genetik laboratuvarlarında, kistik fibrozisli kromozomların popülasyonlarındaki mevcut mutasyonları tanımlamak için hibridizasyon deneyleri ya da restriksiyon enzim analizi gibi moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır [7,27].

Kistik fibroziste etkilenmiş dokulardan cDNA araştırması ve çapraz hibridizasyon yöntemi ile kistik fibrozis geni izole edilmiştir. Bu gen yaklaşık 250 000 bp ve 27 ekzon içeren bir genomik bölgeden oluşur. Özgül olarak kistik fibrozis geni içeren akciğer ve pankreas gibi dokulardan elde edilen DNA, 500 kb'a kadar daraltılarak bu segmentteki genlerin ekspresyonuna bakılabilir [9,28].

Şüpheli bir kistik fibrozis vakasında yaygın bulunan mutasyonların kanıtlanamaması durumu, halen potansiyel bir sorun olarak kalmaya devam etmektedir ve bu durum tanıyı dışlamaz. Farklı moleküler-genetik tanı yöntemlerinin kullanımıyla, bu tür vakalarda moleküler tanı duyarlılığının artırılacağı bildirilmektedir. İki mutasyon belirlenen kistik fibrozisli hastaların kardeş vakaları hariç, klinisyenlerin bu testleri kesin tanı yöntemi olarak kullanma konusunda fazla

cesur olmamaları gerektiği vurgulanmaktadır. Ancak, yenidoğanın klinik olarak anlamlı kistik fibrozis şüphesi taşıması durumunda, sık bulunan kistik fibrozis mutasyonlarını araştırmanın daha uygun olacağı belirtilmektedir. Tek mutasyon belirlenmesi kistik fibrozise yönelik bir bulgu olabilmesine rağmen, kesin tanı desteği sağlayamaz. Bu nedenle, daha fazla kanıt sağlanabilmesi için nadir rastlanan mutasyonların da daha ileri analizleri önerilmektedir [4,5].

Kistik fibroziste genetik analizler PCR'yi temel alarak yapıldığı için, olguların büyük bir çoğunluğunda DNA'nın küçük bir miktarı yeterli olmaktadır. Geniş analizler planlanmadıkça, ağız yıkama suyu örneği (veya –bebeklerde– yanak mukoza örneği) yeterli olmaktadır. Ağız yıkama suyu örneği, araştırılacak kişinin kendisi tarafından alınabilir (10 ml %4 sukroz solüsyonu kullanılarak) ve posta ile gönderilebilir [4,5].

Multiplex DNA amplifikasyonu PCR ile eşzamanlı olarak farklı DNA sekansını amplifiye eder. Her bir PCR farklı büyüklükte bir fragment üretir ve multiplex amplifikasyon referakter mutasyon sistemi (ARMS) tekniği ile birlikte kullanıldığında, küçük delesyonların ya da nokta mutasyonların tanımlanmasına olanak verir [28,29]. Mutasyonların doğrudan saptanması için diğer teknik ise, restriksiyon enzim kesimidir. Bir nokta mutasyonu, önceden var olmayan bir restriksiyon enzim yeri oluşturabilir. Bu nokta kistik fibrozisin 11. ekzonundaki 3 ayrı mutasyonun saptanmasında gösterilir. Bu ekzondaki 425 bp'lik bir sekans, Dde1 (CTGAG) ve Hinc2 enzimi (GTCAAC) için tanıma sekansı içerir. G1778-A mutasyonu, serini (S) asparagine (A) dönüştürdüğü için S549N olarak bilinir, Dde1 sekansını tanımaz ve kesmez. Böylece bu kesim ürünü, normal genden üretilen 174bp+251bp ürününden daha uzun olup 425bp'dir. Hem C1789-T ve hem de G1784-A mutasyonları, Hinc2 ile tanınmaz ve 11. ekzonun bu bölgesinin kesimi normal genden üretilen 186bp+239bp ürününden daha çok tek bir 425bp ürün verir. Bununla birlikte, G1784-A mutasyonunda Mbol enzimi ile kesim sonucu diğer iki mutasyonda gösterilenden farklı olarak ve normal genden üretilmeyen 182bp+243bp ürünü oluşur [28].

Kistik fibrozisin prenatal tanısı genellikle, gebeliğin ilk trimesterinde koryonik villuslardan alınan örneklerle konulur. Moleküler analizler için, amniyosentez örnekleri veya bunların 10-14 günlük kültürlerinden sağlanan amniyositler de kullanılabilir. Bir mutasyonun araştırılmasında PCR veya ARMS multiplex testi kullanılabilir. Fakat maliyet ve etkinlik açısından en uygun şekil PCR ve bunu takiben poliakrilamid jel elektroforezinin (PAGE) birlikte kullanılmasıdır. Fazla sayıdaki mutasyonların araştırılmasında birçok test tekniği birlikte denenebilir. Allel spesifik PCR (ASP) ve mikroflavmetre (MFL) tekniklerinin birlikte kullanılmasının,

Tablo I. CFTR genine ait sık rastlanan mutasyonların bazı ülkelere göre dağılımı					
	Türkiye	İngiltere	İspanya	İsrail	Avrupa
F508	%18.8-28.4	%75.32	%43.5	%27	%66.8
1677delTA	%7.3				
G542X		%1.68	%11.4		%2.6
N1303K	%3.7	%0.46			%1.6
G551D		%3.08			%1.5
W1282X		%0.17	%1.0	%36.2-51	%1.0
R334W			%5.0		
R1162X			%3.0		
R347H	%3.0				

tek nükleotid polimorfizmi veya bilinen mutasyonların basit, duyarlı ve ekonomik olarak belirlenmesini sağladığı da bildirilmektedir [4,30].

Kistik fibrozisli çocuğun ailesine yukarıdaki prenatal moleküler tanı yöntemleriyle doğrudan mutasyonel DNA analizleri uygulanır. Etkilenmiş çocukta, mutasyonlardan bir ya da fazlası kanıtlanamamışsa bağlantı (linkaj) analizi ile ailesel allel geçişinin saptanması amacıyla prenatal tanı önerilir [4].

Kistik fibrozis için iki farklı prenatal yaklaşım önerilmektedir. Bir modelde gebe kadına CFTR geni mutasyonunun araştırılması için test önerilir ve negatif bulunursa gebelikte düşük bir riske sahip olduğu sonucuna varılır. Eğer bir mutasyon tanımlanırsa, kadınların eşleri aynı alleller için test edilir. Eşlerin her ikisinde de mutasyon tanımlandığında, etkilenmiş infant riski  $1/4$  oranındadır. Alternatif model çift taramasında tanımlanmıştır. Risk birimi çiftlerde eşittir ve mutasyon her iki çiftte tanımlandığında yüksek risk durumundan bahsedilir. Her iki çiftin negatif, bir eşin pozitif, diğersinin negatif bulunduğu durumlar düşük risk grubunu oluşturur [7,23].

CFTR geninin ürünü CFTR proteini olarak bilinir. CFTR proteini 168 kDa moleküler ağırlığında ve 1480 aminoasit (aa) uzunluğunda bir integral proteindir. Hücre membranında çapa şeklinde iki transmembran alandan oluşur. ATP bağlanan iki nükleotid bağlanma kıvrımı (NBF) ve bir regülatör (R) alan, birkaç fosforilasyon bölgesine sahip olan bir proteindir [9,19]. Başlangıçta CFTR proteinin bir klorür kanal olarak hareket ettiği düşünülmekteyken, bugün hem Cl transportundan hem de mün sekresyonundan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir [31]. Protein açık ya da kapalı olabilir. Açılma NBF alanlara ATP'nin bağlanmasını takiben R alanının fosforilasyonu ile başlar [9].

Şimdiye kadar tanımlanmış, birçoğu kişisel mutasyonlar olan 1000'den fazla CFTR geni mutasyonu vardır [4,7,32,33]. Bazı mutasyonlarda daha belirgin olmakla birlikte, mutas-

yonlardaki dağılım oranları değişik ülke ve bölgelere göre farklılık göstermektedir (Tablo I) [4,34-38].

Türkiye'de, bilinen 15 mutasyona ilave olarak 3172delAC, P1013L ve M1028I'dan oluşan üç yeni mutasyon saptanmıştır [35].

Tüm ülkeler için yaklaşık %70 sıklıkla en yaygın mutasyon olan F508, CFTR'nin değişmiş glikolizasyonu ve yanlış lokalizasyonu sonucu oluşur. : delesyon için, F: fenilalanin için kullanılan bir simgedir [4,9,19,30,34]. F508 mutasyonu kistik fibrozis hastalarının %50'sinde homozigottur [23]. F508

mutasyonu iki bitişik kodonu etkilediği için kodonun okunma çerçevesi değişir. 10. ekzondaki CTT'nin delesyonu nedeniyle yeni füzyon kodonu ATT oluşur. Delesyon sonucu fenilalanini kodlayan kodon kalkar yeni füzyon kodonu ATT ile CFTR geninin protein ürünü olan izolösin 508 pozisyonunda kodlanır. Bu F508 mutasyonu olarak adlandırılır [28]. Normal bireylerden 10. ekzonun amplifikasyonu 98 baz çifti (bp)'lik bir fragment üretir. Homozigot etkilenmiş bireylerden 10. ekzonun amplifikasyonu daha küçük ve daha hızlı hareket eden 95 bp fragment üretir. Klasik kistik fibrozis için heterozigot bireylerde F508 olarak bilinen hem 98 bp hem de 95 bp fragmentler karakteristik heteroduplex fragmentlerdir [28,39].

Bir hasta üzerinde uygun testlerin yürütülmesi için bir takım soruların yanıtlanması gerekir:

1. Ailede kistik fibrozis öyküsü var mıdır?
2. Ailede kistik fibrozis öyküsü varsa, etkilenmiş kişinin genotipi biliniyor mu?
3. Test edilen kişinin etnik kökeni nedir?

Bir örnek üzerinde uygulanan analizin tipi ve kapsamı test edilen kişinin aile öyküsüne bağlıdır. Örneğin, bir ailede kistik fibrozisi doğrulamak için onun iki mutant allelini tanımlamak gereklidir. Oysa ailesel kistik fibrozis öyküsü olmayan kişilere daha az kapsamlı testler uygulanmaktadır. Kistik fibrozisteki genotip-fenotip ilişkisi iyi tanımlanmamış olmasına rağmen, belli klinik durumlarla daha sık birliktelik gösteren mutasyonlar vardır. Örneğin ılımlı akciğer hastalığı (uzun yaşam süresi ile ilişkilidir), pankreatik yeterlilik ve normal ter Cl düzeyi, sıklıkla kistik fibrozis sebeplerinden biri olan "splicing" mutasyona  $-[3849+10\text{kb} (C>T)]-$  sahip bireylerde daha sık bildirilmiştir (7,40). Diğer bir örnek mekonyum ileusu ile sık birliktelik gösteren F508 ve G542X mutasyonlarıdır [4].

Gen haritalaması için tek seçenek, polimorfik marker'larla hastalığın ayırım çalışmasına dayanan bağlantı analizi tek-

niğini kullanmaktadır [9]. 1985'te lokus pozisyonel klonlama tekniği ile kromozom 7q31-7q32'ye haritalandı [32,39]. Kısa zaman sonra MET ve D7S8 olarak bilinen iki polimorfik DNA lokusunun kistik fibrozis lokusuna yakın bağlı ve yanında olduğu gösterildi [4,20]. Güçlü linkaj eşitsizliği (yakın odaklara bağlanmış iki veya daha fazla allelin beklenenden daha sık birlikteliği olarak tanımlanır) nedeniyle, toplumdaki çoğu kistik fibrozis mutant kromozomları atasal sekansın büyük bir kısmını paylaşabilir. Fenotipik olarak normal bireylerin %3-4'ünde F508 mutasyonu mevcuttur (onları taşıyıcı –heterozigot– olarak adlandırırız). F508 mutasyonu homozigot olan bireyler daha ciddi olarak etkilenmişlerdir. Linkaj eşitsizliğinin güçlü göstergeleri olan XV2.c ve KM19 *marker*'ları, kistik fibrozis taşıyıcılık riskini tarif etmek için genetik danışmanlıkta kullanılmaktadır. Bir eşin heterozigot olduğu bilinen ve diğersinin durumu bilinmeyen çiftlerde en değerli tekniktir [28,32].

Bir kistik fibrozis hastasında yoğun testlerden sonra tanımlanmamış iki mutasyon saptandığında, prenatal tanı amacıyla kistik fibrozis taşıyan kromozomları tanımlama prosedürü olan intragenik *marker*'ların kullanımına başvurmak gerekebilir [7].

Hem allel spesifik oligonükleotid problemada hem de farklı restriksiyon enzim kesiminde normal ve mutant alleller arasındaki tam sekans farkını bilmek gereklidir. Bu bilgi, incelenen bölgenin seçilmiş amplifikasyonu için PCR primerlerinin tasarımına olanak sağlar [28].

## TEDAVİ

### a. Semptoma yönelik tedavi yaklaşımları:

Bakteriyel infeksiyonun ve kolonizasyonun kontrolü için izole edilen mikroorganizmalara yönelik özgül antibiyotik tedavisi gerekir. Kistik fibrozisli hastalarda pulmoner hastalığın tedavisinde, sekresyonların mekanik drenajı önemli yer tutar. İnfeksiyon veya doku dekstrüksiyonu iyi lokalize olmuşsa ve ciddi boyutta ise bazen cerrahi müdahale gerekli olabilir [3,8].

Kistik fibroziste her zaman kolay olmasa bile, genel olarak beslenme sorunları için çözümler üretmek zor olmaz. Proteinden zengin diyet uygulanır. Sindirim ve emilim olabilmesi için hastaların %90'ına pankreas enziminin verilmesi gerekir. Çocuğun büyüme ve gelişiminin iyi olması ve düzenli kilo alması tedavinin etkinliğini gösterir [3,9].

### b. Gen tedavisi:

Laboratuvarda rutin olarak akciğer hücre kültür yöntemleri olmadığı için *in vivo* gen terapisi yöntemleri benimsenmiştir. İlk adenovirüs aracılı protokol 1993'te başlamıştır ve hazırlayıcı veri *in vivo* respiratuar epitel içinde gen transferini doğrulamasına rağmen işlemin güvenilirliği hakkında büyük kaygı oluşmuştur. Gen terapisi denemelerinde, adenovi-

rüs vektörler ya da lipozomlar, CFTR minigen transferi için nazal kavite yoluyla ve bronkoskop aracılığıyla kullanıldı [32]. CFTR geni ya da CFTR cDNA'sı uygun bir vektör içine yerleştirilebilirse (adeno grubu virüslerle) aerosol tekniği ile alıcı epitel hücrelerine penetre olur ve uygun bir protein ekspresyonunu başarır [28].

Retroviral vektörler de, konak hücre genomuna entegre olabilme yetenekleri nedeniyle, kistik fibrozisin gen tedavisi için uygun ve çekici vektörlerdir. Bu şekilde, uzun süreli ekspresyonu ve belki de tedaviyi yönlendirebilirler. Bununla birlikte, hava yolu epiteline gen transferi için yapılan retroviral uygulamalar, proliferen olan hücre gerekliliği ve düşük titreler ile sınırlandırılmıştır. Retroviral ürünlerle ilgili anlamlı gelişmeler titre ile ilgili bazı endişeleri gidermiştir. Lentiviral vektörlerin gelişimi de retroviral uygulamalar ile gen tedavisinin, bölünmeyen hücrelerde uygulanabilirlik şansını belirlemede yardımcı olmuştur. Bu gelişmelere rağmen hava yolu epitelinin apikal membranı gen transferi için önemli bir bariyer oluşturmaya devam etmektedir [41].

CFTR geni için hedef hücreler olan solunum epiteli ve özellikle de submukozal bez hücrelerine postnatal gen transferi çabalarında karşılaşılan güçlükleri aşmada yeni yöntemler denenmektedir. Yeni bir çalışmada, adenovirüs vektörlerle insan fetal trakeal organ kültürlerinde solunum epiteli ve submukozal bez hücrelerine gen transferinin 4 haftalık sürede mükemmel şekilde ve yüksek etkinlikle başarıldığı bildirilmiştir. Bu sonucun, fiziki bariyerlerin daha az ve hedef hücreye ulaşımın daha kolay olmasından kaynaklandığı vurgulanmıştır. Kistik fibrozis gibi doğumsal hava yolu hastalıklarının tedavisi amacıyla, adenovirüs vektörler aracılığıyla fetal trakeal epitele yönelik gen transferi uygulamasının daha etkin gen transferi sağladığı bildirilmektedir [6].

## KAYNAKLAR

1. Fraser RG, Peter Pare JA, Pare PD, Fraser RS, Genereux GP. In: Bralow L. Diseases of the airways. Diagnosis of Diseases of the Chest. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1990: 1208-1219.
2. Mitchell I, Nakielna E, Tullis E, Adair C. Cystic Fibrosis: End-stage care in Canada. Chest. 2000; 118: 80-4.
3. Neyzi O, Ertuğrul T. Pediatri 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 1990; 867-71.
4. Schwarz MJ, Malone GM, Haworth A, Cheadle JP, Meredith AL, Gardner A, Sawyer IH, Connarty M, Dennis N, Seller A, et al. Cystic fibrosis mutation analysis: report from 22 U.K. regional genetics laboratories. Hum Mutat. 1995; 6: 326-33.
5. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Genetic Testing for Cystic Fibrosis. Genetic testing for cystic fibrosis. Arch Intern Med. 1999; 159: 1529-39.
6. Lim FY, Martin BG, Sena-Esteves M, Radu A, Crombleholme TM. Adeno-associated virus (AAV)-mediated gene transfer in respiratory epithelium and submucosal gland cells in human fetal tracheal organ culture. J Pediatr Surg. 2002; 37: 1051-57.
7. Schwarz M, Malone G. Methods for Screening in Cystic Fibrosis. In: Elles R, ed: Molecular Diagnosis of Genetic Diseases. New Jersey: Humana Press. 1996; 99-119.
8. Colten RH. Cystic Fibrosis. In: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf

- RG, et al, ed. Harrison's Principles of Internal Medicine 2. Hamburg: McGraw-Hill Book Company. 1987; 1085-87.
9. Mueller RF, Young ID. Emery's Elements of Medical Genetics. Singapore: Produced by Longman. 1997; 233-43.
  10. Nousia-Arvanitakis S. Cystic fibrosis and pancreas: recent scientific advances. *J Clin Gastroenterol.* 1999; 29: 138-42.
  11. Dodge JA. Why screen for cystic fibrosis? A clinician's view. *Acta Paediatr Suppl.* 1999; 88: 28-32.
  12. Castellani C, Tamanini A, Mastella G. Protracted neonatal hypertrypsinogenemia, normal sweat chloride, and cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood.* 2000; 82: 481-82.
  13. Florea VG, Florea ND, Sharma R, et al. Right ventricular dysfunction in adult severe cystic fibrosis. 2000; 118: 1063-68.
  14. Wilcken B, Travert G. Neonatal screening for cystic fibrosis: present and future. *Acta Paediatr Suppl.* 1999; 88: 33-35.
  15. Symth RL, Croft NM, O'Hea U, Marshall TG, Ferguson A. Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood.* 2000; 82: 394-99.
  16. Lands LC, Grey V, Smountas AA, Kramer VG, McKenna D. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. *Chest.* 1999; 116: 201-05.
  17. Sagel SD, Accurso FJ. Monitoring inflammation in CF. *Cytokines. Clin Rev Allergy Immunol.* 2002; 23: 41-57.
  18. Meyer KC, Sharma A, Brown R, et al. Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young adults with cystic fibrosis. *Chest.* 2000; 118: 164-74.
  19. Scanlin TF, Glick MC. Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1455: 241-253.
  20. Lema G, Dryja D, Vargas I, Enhorning G. *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis affects function of pulmonary surfactant. *Pediatr Res.* 2000; 47: 121-26.
  21. Csiszer E, Hajdu K. Respiratory insufficiency and pregnancy in cystic fibrosis. *Orv Hetil.* 1999; 140: 2639-42.
  22. Dohle GR, Halley DJ, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* 2002; 17: 13-6.
  23. Stern RC, Doershuk Durumm ML. 3849+10 kb C>T mutation and disease severity in cystic fibrosis. *Lancet.* 1995; 346: 274-76.
  24. Özçelik U, Kiper N, Göçmen A. Solunum Sistemi Hastalıklarında Prenatal Tanı. In: Beksac MS, ed: *Fetal Tıp; Prenatal Tanı.* Ankara: Medical Network. 1995; 182-183.
  25. Brock DJH, Barron L, Bedgood D, Hayward C. Prospective prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet.* 1985; 1: 1175-1178.
  26. Monaghan KG, Feldman GL. The risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically a racially diverse North American Population. *Prenatal Diagnosis.* 1999; 19: 604-609.
  27. Wu J, Griffith BB, Bassinger S, Moehlenkamp C, et al. Strategies for unambiguous detection of allelic heterozygosity via direct DNA sequencing of PCR products: application to the HLA DRB1 locus. *Mol Diagn.* 1996; 1: 89-98.
  28. Brock DJH. *Molecular Genetics for Clinician.* Cambridge University Press. 1993; 168-206.
  29. Thorpe PH, Porteous DJ. Rapid quantitation of gene therapy specific CFTR expression using the amplification refractory mutation system. *Biotechniques.* 1999; 27: 122-26.
  30. Yamaguchi A, Nepote JA, Kadivar M, et al. Allele specific PCR with microfluorometry: application to the detection of del F508 mutation in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2002; 316: 147-54.
  31. Bienvenu T, Claustres M. Molecular basis of cystic fibrosis and congenital bilateral agenesis of vas deferens. *Contracept Fertil Sex.* 1996; 24: 495-500.
  32. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics.* Bios Scientific Publishers. 1996; 367-455.
  33. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: The role of modifier genes. *Am J Med Genet.* 2002; 111: 88-95.
  34. Gomez-Llorente MA, Suarez A, Gomez-Llorente C, et al. Analysis of 31 CFTR mutations in 55 families from the South of Spain. *Early Human Development.* 2001; 65: S161-S164.
  35. Onay T, Topaloğlu O, Zielenski J, et al. Analysis of the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients: identification of three novel mutations (3172delAC, P1013L and M1028I). *Hum Genet.* 1998; 102: 224-30.
  36. Yılmaz E, Erdem H, Özgüç M, et al. Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered.* 1995; 45: 175-77.
  37. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997; 10: 135-54.
  38. Kalman YM, Kerem E, Darvasi A, et al. Difference in frequencies of the cystic fibrosis alleles, delta F508 and W1282X, between carriers and patients. *Eur J Hum Genet.* 1994; 2: 77-82.
  39. Tolstol LG, Smith CL. Human genome project and cystic fibrosis-a symbiotic relationship. *J Am Diet Assoc.* 1999; 99: 1421-27.
  40. Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, et al. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem.* 1999; 274: 36193-99.
  41. Johnson LG. Retroviral approaches to gene therapy of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 953: 43-52.