

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA MİTOKONDRIYAL DNA  
MUTASYONLARI İLE AMİNGLİKOZİT OTOTOKSİSİTESİ  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zülal İlayda GÖKIRMAK**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2023**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA MİTOKONDRIYAL DNA  
MUTASYONLARI İLE AMİNGLİKOZİT OTOTOKSİSİTESİ  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zülal İlayda GÖKIRMAK**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN**

**ANKARA  
2023**

## ONAY SAYFASI

### KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA MİTOKONDRİYAL DNA MUTASYONLARI İLE AMİNOGLİKOZİT OTOTOKSİSİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Öğrenci: Zülal İlayda Gökırmak

Danışman: Prof. Dr. Didem Dayangaç-Erden

Bu tez çalışması 06/12/2023 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Ebru Yalçın*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Didem Dayangaç-Erden*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Çetin Kocaepe*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Banu Peynircioğlu*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi*  
*Başkent Üniversitesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

15 Aralık 2023

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN*

Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

27/11/2023

Zülal İlayda GÖKIRMAK

<sup>1</sup>“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*

*Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

*\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

*Zülal İlayda GÖKIRMAK*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren ve destek veren danışmanım Prof. Dr. Didem Dayangaç-Erden'e,

Tezimi okuyan ve değerli katkılarını sunan jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Ebru Yalçın, Prof. Dr. Çetin Kocaefe, Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi ve Prof. Dr. Banu Peynircioğlu'na,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve bana katkıda bulunan tüm hocalarıma,

Geldiğim ilk günden beri bölüm içinde ve sosyal hayatımda her zaman desteklerini hissettiğim, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Nilay Çolak, Dudu Gümüş, Başak Şen, Rüveyda Çöklü, Eray Taha Kumtepe ve Pelin Zobaroglu Özer'e, hep yanımda olan, her zaman beni motive eden Cem Yeşil'e

Her konuda her zaman arkamda olan ve beni hep destekleyen aile üyelerim Ayla ve Cengiz Gökırmak ve canım kız kardeşim Dilara Gökırmak'a

Neşesiyle her şeyi daha kolay hale getiren muhabbet kuşum Deniz Ciguli'ye,  
En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (**Proje Kodu: TYL-2023-20638**)

## ÖZET

**Gökırmak, Z. İ., Kistik Fibrozis Hastalarında Mitokondriyal DNA Mutasyonları ile Aminoglikozit Ototoksitesisi Arasındaki İlişkinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.** Kistik fibrozis beyaz ırkta görülen, CFTR genindeki mutasyonların sebep olduğu otozomal resesif kalıtılan genetik bir hastalıktır. Kistik fibrozis tedavisinde kullanılan aminoglikozitler, hastalarda yan etki olarak işitme kaybına neden olmaktadır. Mitokondriyal DNA'da MTRNR1 genindeki m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının aminoglikozit ilişkili işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir. Bu sebeple hastalara aminoglikozit tedavisi uygulanmadan önce hastaların mutasyonlar açısından taranması kistik fibrozis hastalarında büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasındaki amacımız, kistik fibrozis hastalarında MTRNR1 geninde aminoglikozit ototoksitesisi ile ilişkili mutasyonların sıklığını araştırmaktır. Çalışmamıza aminoglikozit kullanım öyküsü olan/olmayan retrospektif olarak seçilen 119 hasta dahil edildi. Hastalar otorinolaringolojik bulgular, odyolojik bulgular ve aminoglikozit kullanımı gibi klinik özelliklere göre sınıflandırıldı. Mutasyonlar PCR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edildi. 119 hastanın 97'si aminoglikozit kullanmış olup; 22 hasta için aminoglikozit kullanım öyküsü bulunmamaktadır. Aminoglikozit kullanan 13 hastada yüksek frekanslı sensörinöral işitme kaybı tespit edilmiştir. 119 hasta mutasyonlar açısından taranmış ve mutasyon saptanmamıştır. Aminoglikozit ototoksitesisine rağmen MTRNR1 gen mutasyon taramaları ülkemizde rutin olarak yapılmamaktadır, aminoglikozit tedavisinden önce kistik fibrozis hastalarında mutasyon taramalarının hasta tanı ve izleme rehberlerinde yer alması planlanmaktadır. Klinik parametrelerin birlikte değerlendirilmesi ile kistik fibrozis hastalarında kişiye özgü tedavi yaklaşımı geliştirilmiş olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Kistik Fibrozis, CFTR geni, Aminoglikozitler, Ototoksitesite, MTRNR1

## ABSTRACT

**Gökirmak, Z.İ., Investigation of the Relationship Between Mitochondrial DNA Mutations and Aminoglycoside Ototoxicity in Cystic Fibrosis Patients, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2023.** Cystic fibrosis is an autosomal recessive genetic disease seen in Caucasians and caused by mutations in the CFTR gene. Aminoglycosides used in the treatment of cystic fibrosis cause hearing loss as a side effect in patients. It is known that mutations m.1555A>G, m.1494C>T and m.1095T>C in the MTRNR1 gene in mitochondrial DNA cause aminoglycoside-associated hearing loss. For this reason, screening patients for mutations before administering aminoglycoside treatment is of great importance in cystic fibrosis patients. Our aim in this thesis study is to investigate the frequency of mutations associated with aminoglycoside ototoxicity in the MTRNR1 gene in cystic fibrosis patients. 119 retrospectively selected patients with or without a history of aminoglycoside use were included in our study. Patients were classified according to clinical features such as otorhinolaryngological findings, audiological findings and aminoglycoside use. Mutations were analyzed using the PCR-RFLP method. Aminoglycoside use was found in 97 of 119 patients; it is not present in 22 patients. High-frequency sensorineural hearing loss was detected in 13 patients using aminoglycosides. 119 patients were screened for mutations and no mutations were detected. Despite aminoglycoside ototoxicity, MTRNR1 gene mutation screenings are not routinely performed in our country. Mutation screenings in cystic fibrosis patients before aminoglycoside treatment are planned to be included in patient diagnosis and monitoring guidelines. By evaluating clinical parameters together, a personalized treatment approach will be developed for cystic fibrosis patients.

**Keywords:** Cystic Fibrosis, CFTR gene, Aminoglycosides, Ototoxicity, MTRNR1

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Kistik Fibrozis Patofizyolojisi	3
2.2. CFTR Geni ve CFTR Proteini	4
2.3. CFTR Geninde Tanımlı Mutasyonlar	7
2.4. CFTR Proteini Mutasyon Sınıfları	9
2.5. Kistik Fibrozis Hastalarında Tedavi	12
2.6. Aminoglikozit Antibiyotikler	14
2.7. Aminoglikozit Antibiyotiklerin Bakteriye Etki Mekanizması	16
2.8. Aminoglikozitler ve Ototoksisite	17
2.9. Mitokondriyal DNA ve MTRNR1 Gen Mutasyonları	20
2.9.1. m.1555A>G ve m.1494C>T Mutasyonu	22
2.9.2. m.1095T>C Mutasyonu	23
<b>3. BİREYLER VE YÖNTEMLER</b>	25
3.1. Bireyler	25
3.1.1. Hastaların Klinik Özellikleri	25
3.1.2. Otolaringolojik ve Odyolojik Analizler	26
3.1.3. Aminoglikozit Kullanım Öyküsü	27
3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar	29
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. m.1555A>G Mutasyon Taraması	30

3.2.2. m.1494C>T Mutasyon Taraması	33
3.2.3. m.1095T>C Mutasyon Taraması	36
3.2.4. Etik Kurul İzni	39
3.2.5. İstatistiksel Analiz	39
<b>4. BULGULAR</b>	40
<b>5. TARTIŞMA</b>	47
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	56
<b>7. KAYNAKLAR</b>	58
<b>8. EKLER</b>	62
EK-1: Tez Orijinallik Ekran Görüntüsü	62
EK-2: Dijital Makbuz	63
EK-3: Tez çalışmasında Yer Alan 119 Kistik Fibrozis Hastasına Ait Klinik Parametreler	64
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>ABC</b>	: <i>ATP-binding cassette</i>
<b>ACMG</b>	: <i>The American College of Medical Genetics and Genomics</i>
<b>AG</b>	: Aminoglikozit
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>cAMP</b>	: <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
<b>CFTR</b>	: <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
<b>COPI</b>	: Kat protein I
<b>COPII</b>	: Kat protein II
<b>CPIC</b>	: <i>The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>
<b>dB</b>	: Desibel
<b>dBHL</b>	: Desibel işitme düzeyi
<b>dB-ISO</b>	: İşitme seviyesi
<b>db-KAE</b>	: Konuşmayı anlama eşiği
<b>dB-KFE</b>	: Konuşmayı ayırt etme
<b>dB-SSO</b>	: Saf ses ortalaması
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>dk</b>	: Dakika
<b>D-loop</b>	: <i>Displacement loop</i>
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotit trifosfat
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>ERQC</b>	: Endoplazmik retikulum kalite kontrolü
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>F primer</b>	: <i>Forward</i> primer
<b>FEV1</b>	: Zorlu ekspirasyonun 1. saniyesinde atılan volüm
<b>HÜTF</b>	: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>Hz</b>	: <i>Hertz</i> , frekans
<b>ISO</b>	: <i>International Organization for Standardization</i>

<b>IV</b>	: İntrevenöz, damar içi tedavi
<b>KBB</b>	: Kulak Burun Boğaz
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KF</b>	: Kistik fibrozis
<b>kHz</b>	: Kilohertz
<b>KLB</b>	: Kan labirent bariyeri
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b><i>Micromonospora spp</i></b>	: <i>Micromonospora</i> alt türleri
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
<b>MTRNR1</b>	: Mitokondriyal kodlanmış 12S rRNA
<b>NBD1</b>	: <i>Nucleotide Binding Domain 1</i>
<b>NBD2</b>	: <i>Nucleotide Binding Domain 2</i>
<b>nDNA</b>	: Nükleer DNA
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>NTC</b>	: <i>Negative control</i>
<b>OXPHOS</b>	: Oksidatif fosforilasyon
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PCR</b>	: <i>Polymerase chain reaction</i>
<b><i>pkA</i></b>	: <i>Protein kinase A</i>
<b>pmol</b>	: Pikomol
<b>R primer</b>	: <i>Reverse primer</i>
<b>R</b>	: <i>Regulatory</i>
<b>RFLP</b>	: <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>rRNA</b>	: Ribozomal ribonükleik asit
<b>rxn</b>	: Reaksiyon
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SPSS</b>	: <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>TBE</b>	: <i>Tris-Borat-EDTA</i>

<b>TMD1</b>	: <i>Transmembrane domain 1</i>
<b>TMD2</b>	: <i>Transmembrane domain 2</i>
<b>tRNA</b>	: Taşıyıcı ribonükleik asit
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>V</b>	: Volt
<b>µl</b>	: Mikrolitre



## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. CFTR proteinin üç boyutlu yapısı ve domainleri.	5
2.2. CFTR kanalının açılması.	6
2.3. CFTR biyogenezi.	7
2.4. CFTR mutasyon sınıfları.	9
2.5. CFTR mutasyonlarına göre modülatör tedaviler.	12
2.6. Aminoglikozitlerin iç kulak koklear hücre tahribatına yol açması.	19
2.7. <i>E. coli</i> 16S rRNA ve insan mitokondriyal 12S rRNA'sı.	23
4.1. MTRNR1 geni m.1555A>G mutasyon bölgesini içeren 248 bç PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	42
4.2. MTRNR1 geni m.1555A>G mutasyonu <i>BsmAI</i> restriksiyon endonükleaz ile PCR-RFLP sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	42
4.3. MTRNR1 geni m.1494C>T mutasyon bölgesini içeren 441 bç PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	43
4.4. MTRNR1 geni m.1494C>T mutasyonu <i>HphI</i> restriksiyon endonükleaz ile PCR-RFLP sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	43
4.5. MTRNR1 geni m.1095T>C mutasyon bölgesini içeren 201 bç PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	44
4.6. MTRNR1 geni m.1095T>C mutasyonu <i>HphI</i> restriksiyon endonükleaz ile PCR-RFLP sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	44
4.7. 119 hastanın FEV1 değer düşüklüğü ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarının istatistiksel analiz grafikleri.	45
4.8. 119 hastanın pankreatik yetmezlik ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarının istatistiksel analiz grafikleri.	45
4.9. 119 hastanın bronşektazi bulundurup bulundurmama ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarının istatistiksel analiz grafikleri.	46

**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	CFTR geninde tanımlı mutasyon tipleri.	8
<b>2.2.</b>	Aminoglikozitler, elde edildiği bakteri türleri ve bulunduğu yıllar.	15
<b>3.1.</b>	İşitme kaybı dereceleri.	27
<b>3.2.</b>	Çalışmada yer alan hastaların klinik tablosu.	28
<b>3.3.</b>	m.1555A>G Mutasyon Taraması PCR için kullanılan Primer Dizileri.	30
<b>3.4.</b>	m.1494C>T Mutasyon Taraması PCR için kullanılan Primer Dizileri.	33
<b>3.5.</b>	m.1095T>C Mutasyon Taraması PCR için kullanılan Primer Dizileri.	36

## 1. GİRİŞ

Kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan kistik fibrozis (KF), otozomal resesif kalıtlı ve oldukça sık görülmektedir. Epitel hücre membranında yer alan ve klor kanalı görevi gören CFTR proteini, protein kinaz A ve cAMP bağımlıdır.

Günümüzde CFTR geninde 2100'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyon türüne göre CFTR proteininin üretiminden hücre yüzeyine yerleşme aşamalarından birinde bir hata olduğunda solunum yolu, pankreas kanalı, safra kanalı ve bağırsak gibi yapıların epitel dokularda iyon geçişi bozulmaktadır. İyon geçişindeki bu bozulma ile su Emilimi artar, solunum yolundaki sıvının azalmasıyla ise mukus daha katı bir hal almaktadır.

Mukusun daha katı bir hal almasıyla mukosilyer klirens olarak tanımlanan mukusun solunum yolundaki mikroorganizma ve bakterilerden temizleme mekanizması da bozulmaktadır. Solunum yolunda mukus birikimi ve mukosilyer klirens mekanizmasının bozulması bakterilerin hava yollarına yerleşmesine uygun ortam sağlar ve inflamasyon gelişmesine sebep olur.

Aminoglikozit antibiyotikler, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakterilerin solunum yolunda kolonize olmasıyla meydana gelen enfeksiyonların tedavisi için kistik fibrozis hastalarında yaygın olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Kistik fibrozis hastalarında tedavi amaçlı kullanılan aminoglikozitler, hastalarda yan etki olarak işitme kaybına neden olmaktadır. Mitokondriyal DNA'da MTRNR1 (12S ribozomal RNA) genindeki m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının aminoglikozit ilişkili işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir. Bu sebeple hastalara aminoglikozit tedavisi uygulanmadan önce hastaların mutasyonlar açısından taranması kistik fibrozis hastalarında büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde bu mutasyonların sıklıkları bilinmemekte olup; aminoglikozit kullanmadan önce kistik fibrozis hastalarında mutasyon taramalarının hasta tanı ve izleme rehberlerinde yer alması planlanmaktadır. Bu nedenle tez çalışmada retrospektif olarak seçilen 119 kistik fibrozis hastasını çalışmaya dahil ederek MTRNR1 geninde en sık görülen m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının sıklığını araştırmayı amaçladık.

Mutasyon sıklıkları ile işitme kaybı parametrelerinin birlikte değerlendirilmesi ile kistik fibrozis hastalarında kişiye özgü tedavi yaklaşımı geliştirilmiş olacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kistik Fibrozis Patofizyolojisi

Kistik fibrozis (OMIM 219700); yaygın olarak beyaz ırkta görülen, *kistik fibrozis transmembran regülatör* (CFTR) genindeki mutasyonların sebep olduğu otozomal resesif kalıtılan genetik bir hastalıktır (1).

Bu hastalığın ortaya çıkışı ilk olarak 1938 yılında Dr. Dorothy Andersen'in pediatri hastalarının pankreaslarında gördüğü kist ve fibrozis semptomlarından yola çıkarak hastalığa kistik fibrozis adını vermesiyle gerçekleşmiştir. Dr. Andersen, CFTR genini de yine aynı yıl olan 1938'de tanımlamıştır (2).

Kistik fibrozis hastalığının görülme sıklığı farklı popülasyonlarda değişkenlik göstermekle beraber, 3.500 kişide 1 olmak üzere en sık Kuzey Amerika'da ve 2.000-4.500 kişide 1 olmak üzere Avrupa'da görülmektedir. Genetik açıdan oldukça heterojen olan ülkemizde ise kistik fibrozis hastalığının görülme sıklığı her 3.000 doğumda 1'dir (3).

Özellikle akciğerlerde meydana gelen fonksiyonel bozukluklarla ilişkilendirilen fakat aslında multisistemik bir hastalık olan kistik fibroziste akciğerler dışında; pankreas, kalp, böbrek, bağırsak, üreme sistemi, ter bezleri, karaciğer gibi farklı doku ve organlar da etkilenmektedir (3).

CFTR proteini, sağlıklı bireylerde epitel hücrelerin klor ve bikarbonat iyon sekresyonunda görevlidir ve epitellerde, hücre içi ve hücre dışında bulunan iyonların dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Akciğerlerde yer alan ve sil hareketi sayesinde klorür iyonlarının hücre içine alınıp suyun hücrelerden atılmasını sağlayan silli epitel hücreler, bu sayede hücre dışı matriste bulunan mukozanın da patojenler ile vücuttan atımını sağlar (4). Fakat kistik fibrozis hastalarında CFTR proteininin yapısında meydana gelen mutasyonlar sebebiyle, silli epitel hücreler görevini yerine getiremez ve klorür iyonlarının hücre içinde kalması, suyun hücre dışına atılmasını engelleyerek hücre içi ve dışı iyon dengesinin bozulmasına yol açar. İyon geçişindeki bu bozulma ile su Emilimi artar, solunum yolundaki sıvının azalmasıyla ise mukus daha katı bir hal almaktadır. Mukusun daha katı bir hal almasıyla silyalar temizleme işlemini gerçekleştiremez ve mukosilyer klirens olarak tanımlanan mukusun solunum

yolundaki mikroorganizma ve bakterilerden temizlenme mekanizması da bozulur (3,4).

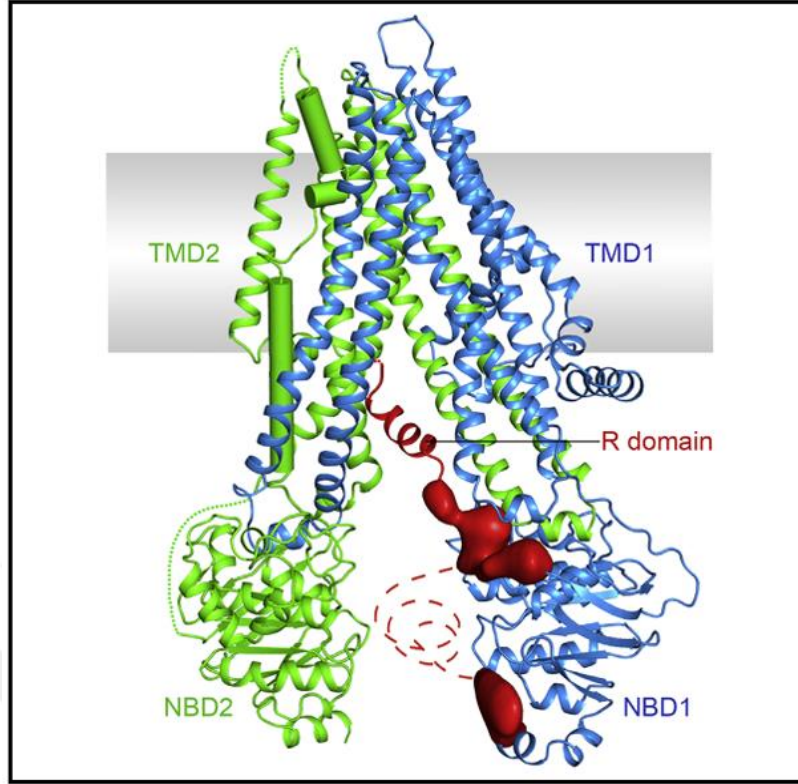
Solunum yolunda mukus birikimi kistik fibrozis hastalarında nefes almayı güçleştirmektedir. Hastalık ilerledikçe hava yolu tıkanmakta ve nefes alışverişi daha da zorlaşmaktadır. Mukosilyer klirens mekanizmasının bozulması epitel hücreleri enfeksiyona açık hale getirir ve bakterilerin hava yollarına yerleşmesine uygun ortam sağlanmasıyla hastalarda inflamasyon gelişimine sebep olur (4).

Kistik fibrozis hastalarında inflamasyon gelişimine ve kronik akciğer enfeksiyonuna yol açan başlıca bakteriler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* bakterileridir, bununla birlikte *Aspergillus fumigatus* hastalarda alerjik reaksiyonlara, sinüzit ve nazal polip oluşumuna sebebiyet verebilmektedir. Hastalarda görülen diğer bakteriler olan *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia*, akciğer enfeksiyonlarında rol oynamaktadır (5).

Kistik fibrozis hastalığı hastanın yaşı, hastalıktan etkilenen sistemler, çevresel faktörler, modifiye eden genler ve mutasyonun ciddiyet durumu gibi faktörlerle klinik bulgular farklılık göstermektedir. Hastanın kistik fibrozis hastası olarak tanımlanmasında ter testi, akciğer fenotipi, mutasyon analizi ve çeşitli bakteriyolojik tetkikler uygulanmaktadır (4).

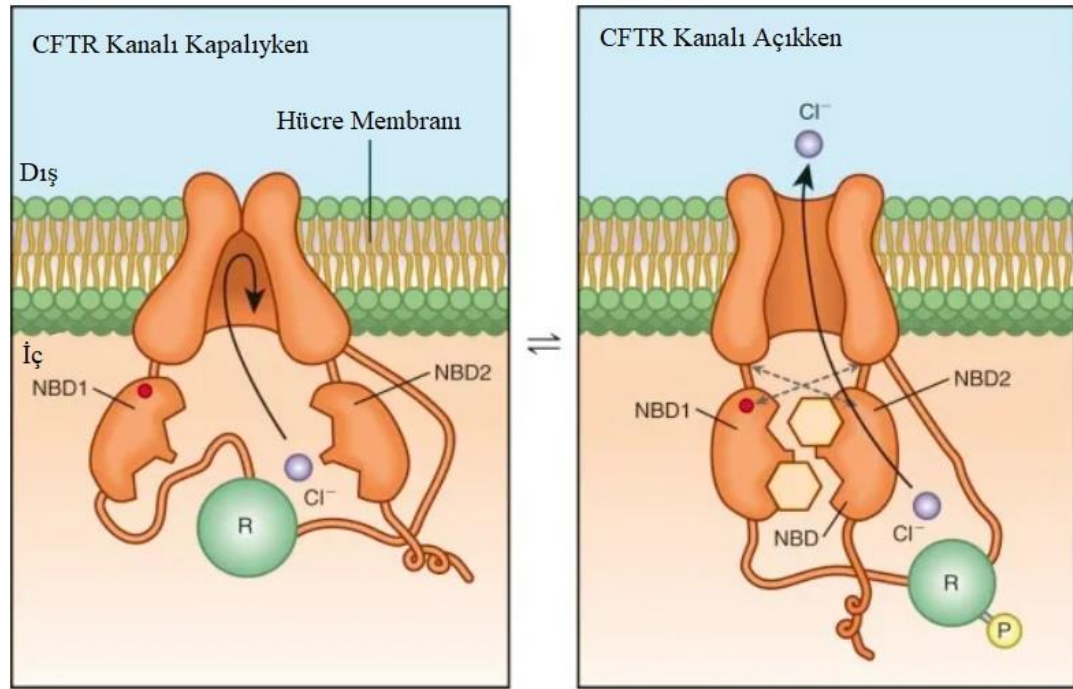
## 2.2. CFTR Geni ve CFTR Proteinini

Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör (CFTR) geni kromozomun 7q31.2 bölgesinde lokalizedir; 250 kilo baz uzunluğundadır ve 27 ekzondan oluşur. CFTR geni 1480 amino asitlik ve 168 kDa olan CFTR proteinini kodlamaktadır (4). CFTR proteini, *ATP-binding cassette (ABC)* ailesinin C alt ünitesinin 7. üyesidir bu nedenle aynı zamanda ABCC7 olarak da adlandırılır ve iyon kanalı olarak görev yapmaktadır. *Protein kinase A* (pkA) bağımlı olan CFTR proteini, kanal işlevini yerine getirirken ATP enerjisine ihtiyaç duyar. *Transmembrane Domain 1* (TMD1) ve *Transmembrane Domain 2* (TMD2), sitozolik *Nucleotide Binding Domain 1* (NBD1) ve *Nucleotide Binding Domain 2* (NBD2) ve birçok fosforilasyon bölgesi içeren *Regulatory domain* (R) olmak üzere 5 işlevsel domainden oluşmaktadır (6). (Şekil 2.1)



**Şekil 2.1.** CFTR proteinin üç boyutlu yapısı ve domainleri (7).

Sitoplazmik bölgede yer alan R domain, *protein kinase A* tarafından fosforile edilmesinin ardından NBD1 ve NBD2 ile etkileşir, kanalın açılması sağlanır. Kanalın açılmasıyla iyon sekresyonu gerçekleşir ve ardından CFTR kanalı yeniden kapanır. (3) (Şekil 2.2)



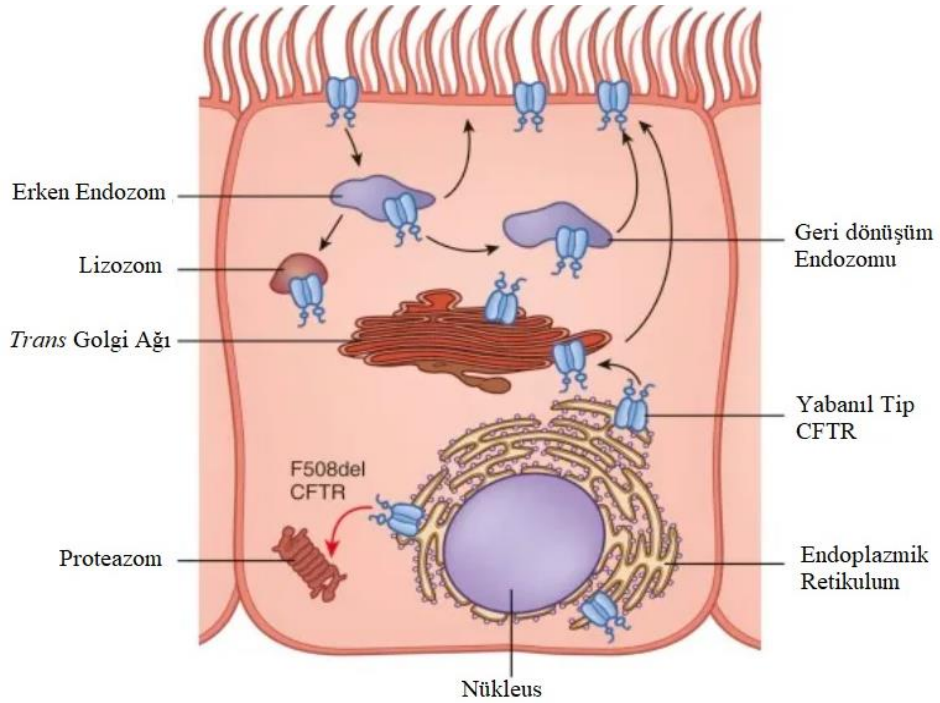
**Şekil 2.2.** CFTR kanalının açılması. R domaininin, *protein kinase A* tarafından fosforile edilmesinin ardından NBD1 ve NBD2 ile etkileşir, kanalın açılması sağlanır. Kanalın açılmasıyla iyon sekresyonu gerçekleşir ve ardından CFTR kanalı yeniden kapanır. (7).

CFTR gen ifadesinin hücre dışı sinyaller tarafından uyarılmasının ardından, CFTR polipeptit zinciri ribozomdan çıkarak endoplazmik retikulum (ER) membranında Sec61 kompleksi tarafından tanınır. Tanınmasıyla birlikte CFTR proteini, ER lümenine yerleşir ve N-glikozilasyon ile katlanır, katlanma CFTR proteinin TMD2 bölgesinde yer alan Asn894 ve Asn900 aminoasitleri ile gerçekleşir. CFTR proteini, Asn894 ve Asn900 aminoasitleri yardımıyla N-glikozillenme ile katlanmasına Hsp70 ve Hsp90 şaperon kompleksleri de yardımcı olmaktadır. Şaperon komplekslerine sıkıca bağlanan CFTR proteininin, yeniden şaperon komplekslerinden ayrışması durumu gerçekleşemediğinde ubiquitin-proteazom yoluyla parçalanma mekanizması, endoplazmik retikulum kalite kontrolü olarak tanımlanmaktadır. Kısaca ERQC olarak adlandırılan bu basamak, en sık rastlanan CFTR protein mutasyonu olan F508del bulunan CFTR proteini, şaperonlara sıkıca bağlanmaktadır (8).

Bir diğer ER kalite kontrol basamağı olan CFTR glikozillenmesi ve kalneksin döngüsünde, mutasyon bulunmayan, yabancı tip CFTR kalneksin döngüsü süresince

katlanmak için ilerlerken arka arkaya deglikozilasyona uğrarken, F508del mutasyonlu CFTR'da bu aşama gerçekleşmez. Üçüncü kontrol noktası ise CFTR, ER'dan COPII vezikülleri ile golgiye taşınması sırasında gerçekleşir. COPII veziküllerin oluşumu sırasında ise NBD1'de yer alan aspartat-alanin-aspartat ve ER motifleri taşıma sinyalleri olarak rol oynamaktadır (6,8).

Son basamakta ise oluşturulan olgun CFTR cis-Golgi'ye iletilerek kat protein I (COPI) veziküllerinde endoplazmik retikuluma yeniden gönderilir ve bu sayede tekrardan katlanma aşamasına girebilmesi sağlanır. Sonrasında ise ubiquitin-proteazom basamağı ile yıkılmak üzere yeniden cis-Golgi'ye iletilir (8).



Şekil 2.3. CFTR biyogenezi (7).

### 2.3. CFTR Geninde Tanımlı Mutasyonlar

Günümüzde CFTR geninde çeşitli veritabanlarında (<https://www.CFTR2.org> , <http://genet.sickkids.on.ca/app>) 2114 adet mutasyon tanımlanmıştır. CFTR protein varyantları <https://www.CFTR2.org> veritabanına göre listenmiş ve kistik fibrozise neden olan 719, değişken klinik sonuçlara göre değişen 49, kistik fibrozise neden olmayan 25 ve bilinmeyen 11 varyant tanımlanmıştır (9).

CFTR gen mutasyonları, mutasyon sınıflarına göre gruplandığında, *Cystic Fibrosis Mutation* veritabanına (<http://genet.sickkids.on.ca/app>) göre en çok rastlanan ve 816 adet olan yanlış anlamlı mutasyon (missense) tipidir. İkinci sırada 342 adet olarak çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları görülürken, üçüncü sırada ise 231 adet olmak üzere uç birleştirme mekanizması (*splicing*) mutasyon tipi yer alır. Devamında yer alan mutasyon tipleri ise anlamsız (*nonsense*), insersiyonlar, delesyonlar ve CFTR'ın kodlanmayan bölgesi olan promotör mutasyonlarıdır (Tablo 2.1)(10).

Kuzey Avrupa ve Amerika'da %70-80, ülkemizde ise %28,06 oranıyla en sık görülen mutasyon, üç nükleotitlik bir delesyon olan F508del mutasyonudur (11).

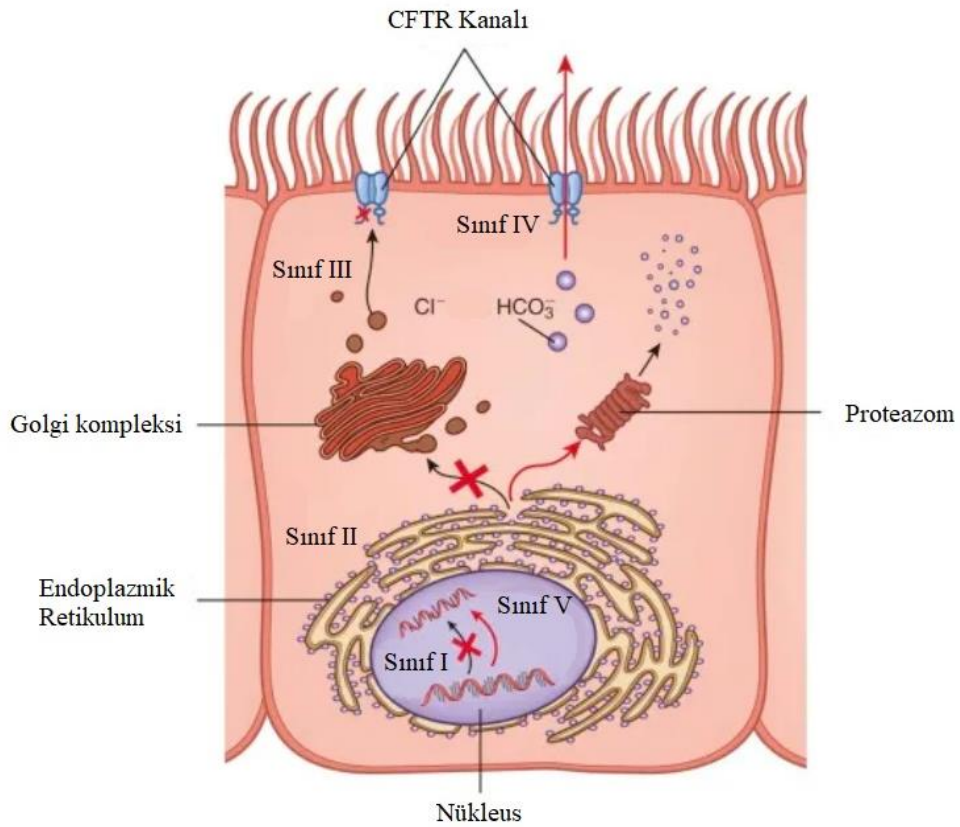
F508del mutasyonundan sonra görülme sıklığı en çok olan mutasyonlar: çerçeve kayması mutasyonu 1677delTA (%6,13), çerçeve kayması mutasyonu 2183AA-G (%4,87), yanlış anlamlı mutasyon N1303K (%4,8), yanlış anlamlı mutasyon G85E (%4,47), *splicing* mutasyon 2789+5G-A (%4,22), yanlış anlamlı mutasyon G542X (%7,44), delesyon olan CFTRdele2 (%2,07), yanlış anlamlı mutasyon W1282X (%3,67), *splicing* mutasyon olan 3849+10kbC-T (%1,49) ve yanlış anlamlı mutasyon olan R334W (%3,59) mutasyonlarıdır (11).

**Tablo 2.1.** CFTR geninde tanımlı mutasyon tipleri

Mutasyon Tipi	Sayısı	Frekans (%)
Yanlış anlamlı	816	38.60
Çerçeve içi insersiyon/delesyon	43	2.03
<i>Splicing</i>	231	10.93
Anlamsız	177	8.37
Çerçeve kayması	342	16.18
Promotör	17	0.80
Büyük insersiyon/delesyon	59	2.79
Dizi varyasyonları	269	12.72
Bilinmeyen	160	7.57

## 2.4. CFTR Proteini Mutasyon Sınıfları

CFTR protein mutasyonları; CFTR sentezinden, proteinin katlanması, epitel hücre membranına taşınması, membrana yerleşmesi ve doğru fonksiyon göstermesi gibi çeşitli basamaklarda meydana gelebilecek hatalara göre 7 sınıf altında toplanmaktadır (8).



Şekil 2.4. CFTR mutasyon sınıfları (7).

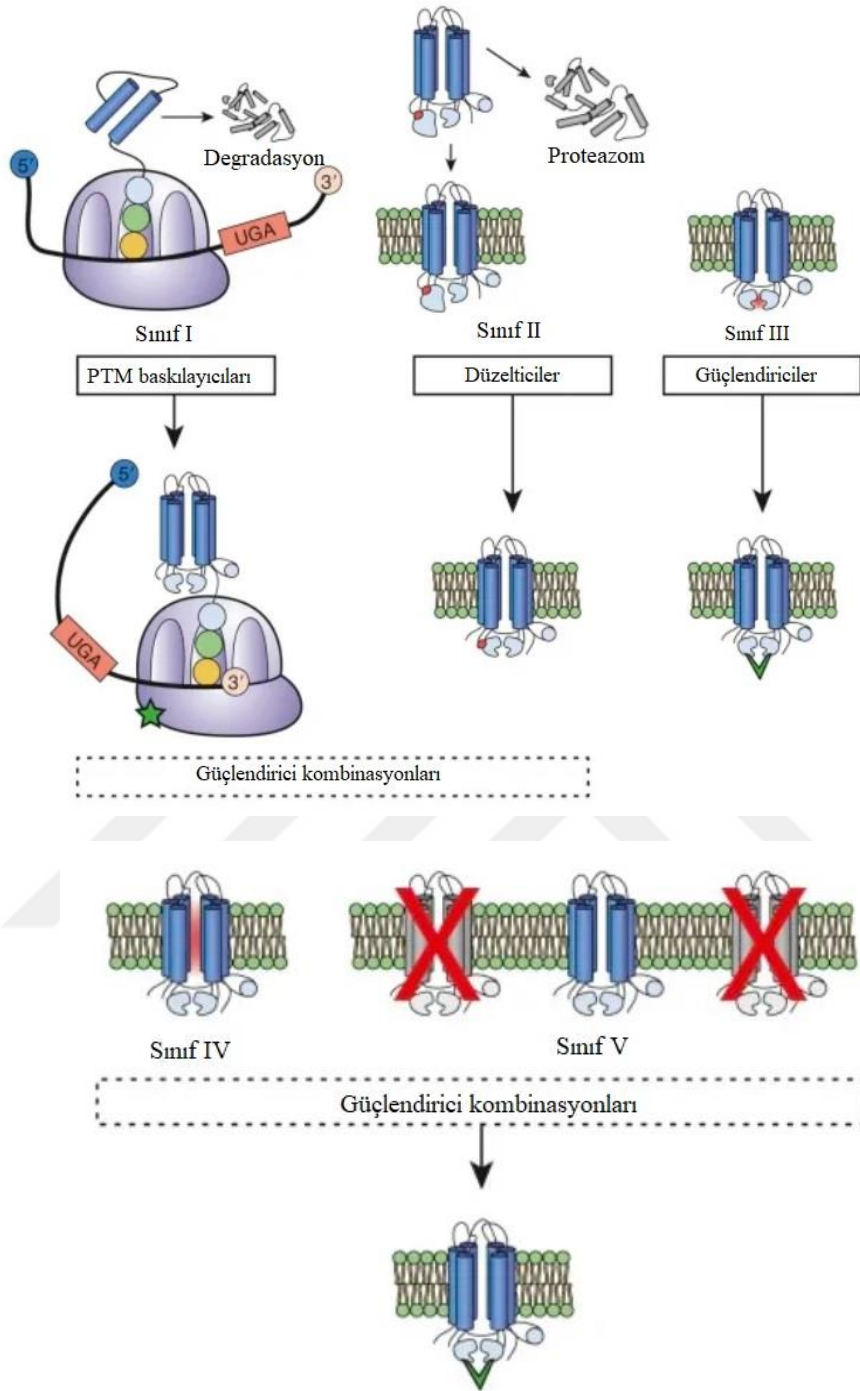
- Sınıf I mutasyonu kendi içinde Sınıf IA ve Sınıf IB grubu olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sınıf IA grubunda büyük delesyonlar ve büyük insersiyonlar yer almaktadır. Büyük delesyon ve insersiyonlar sonucu CFTR geninden mRNA sentezlenmemekte ve protein hiç oluşmamaktadır. Bu nedenle düzeltici tedaviler (*corrective therapy*) ile tedavi sağlanamamakta, bunların yerine epitel hücrelerin apikal yüzeyinde CFTR proteini olmaksızın iyonları dengelemek amaçlı sodyum kanallarını inhibe eden ya da klorür kanallarını uyaran tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu grup mutasyonlara örnek

ülkemizde görülme sıklığı %0,5 olan 21 kb'lik delesyon Dele2,3 ve CFTRdele14b-17b mutasyonları verilmektedir(12).

- Sınıf IB grubu, Sınıf VII olarak da adlandırılmakla beraber, bu grup mutasyonlarda translasyon sırasında anlamsız mutasyonların neden olduğu erken dur kodonu oluşumu sebebiyle hatalı uzunlukta veya fonksiyonel olmayan CFTR proteini sentezlenir. Bu nedenle Sınıf IB grup mutasyonlarının tedavisinde translasyon sırasında ribozomun dur kodonu dizisini atlamasını ve kalan dizinin okunmasını sağlayan *read-through* bileşikleri kullanılmaktadır. Örnek olarak yanlış anlamlı mutasyon olan G542X ve R1158X mutasyonları gösterilebilir. Sınıf IB mutasyonları günümüzde, kişiselleştirilmiş tıp alanında, kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesinde ve gen terapilerinde sıklıkla çalışılan mutasyon tipini oluşturmaktadır (12).
- Sınıf II mutasyonunda sentezlenen CFTR proteini yanlış katlanmaktadır. Yanlış katlanan CFTR proteini, ER aracılı degradasyona yönlendirilir ve böylece hücre içi iyon stabilitesi bozularak epitel hücrelerin apikal membranında daha az stabil protein oluşumuna neden olur. Bu mutasyon sınıfına en sık görülen üç nükleotitlik bir delesyon olan F508del ve yanlış anlamlı G85E mutasyonları örnek gösterilebilir. Sınıf II mutasyonlarının tedavisinde ise CFTR proteini katlanma hatalarının düzeltilerek hücre membranına transportunu sağlayan *Lumacaftor* ve *Tezacaftor* düzelticileri (*correctors*) ve CFTR protein üretimini artırmak için yükselticiler (*amplifiers*) kullanılmaktadır (12).
- Sınıf III mutasyonunda protein sentezi gerçekleşir, protein membrana ulaşır fakat mutasyon nedeniyle CFTR kanalının açılmasında hata vardır. Bu mutasyon grubuna G551D ve D1152H yanlış anlamlı mutasyonlar örnek verilmektedir. Sınıf III mutasyonlarının tedavisinde ise CFTR kanalının daha uzun süre açık tutulmasını amaçlayan *Ivacaftor* güçlendiricileri (*potentiators*) kullanılır (12).
- Sınıf IV mutasyonunda CFTR proteini üretilip membrana yerleşir fakat klor ve bikarbonat iyon transportunda azalma görülmektedir. Bu azalma ise azaltılmış iletkenlik olarak da tanımlanmaktadır. Sınıf IV grubuna örnek mutasyonlar ise R347P, D110H'dir. Bu mutasyon grubu tedavisinde CFTR kanalının daha uzun

süre açık tutulmasını ve daha fazla iyon geçişini sağlayan güçlendiriciler (*potentiators*) ve membrandaki stabilitesini artırmayı amaçlayan stabilizatörler (*stabilizers*) kullanılır (12).

- Sınıf V mutasyon grubunda CFTR protein sentezi gerçekleşir fakat hatalı katlanan CFTR proteinleri olması sebebiyle az sayıda CFTR proteini hücrenin apikal membranına yerleşir, membranda yetersiz sayıda CFTR proteini olması nedeniyle klor iyonu geçişi düzgün sağlanamaz ve sitoplazmaya daha az klor iyonu taşınımı olur. 2789+5G-A ve 3849+10kbC>T mutasyonları bu sınıfta yer alır. Sınıf V mutasyon grubunun tedavisinde ise hatalı katlanan CFTR proteinlerinin düzgün katlanmasını sağlayan düzelticiler (*correctors*), CFTR protein üretiminin artırılmasını sağlayan yükselticiler (*amplifiers*) ve kanalın daha uzun süre açık tutulmasını sağlayan güçlendiriciler (*potentiators*) kullanılmaktadır (12).
- Sınıf VI son mutasyon grubunda ise CFTR protein sentezi gerçekleşir fakat sentezlenen CFTR proteinin stabilitesi az ve yarı ömrü kısadır, bu nedenle hücrenin apikal membranında oldukça hızlı degrade olmaktadır. 4326delTC, Q1412X mutasyonları bu gruptadır. Sınıf VI mutasyon grubunun tedavisinde membrandaki CFTR proteininin stabilitesini artırmayı amaçlayan stabilizatörler (*stabilizers*) ve CFTR protein üretiminin artırılmasını sağlayan yükselticiler (*amplifiers*) kullanılmaktadır (12).



Şekil 2.5. CFTR mutasyonlarına göre modülör tedaviler (7).

## 2.5. Kistik Fibrozis Hastalarında Tedavi

Kistik fibrozis hastalarında, CFTR sentezinden, proteinin katlanması, epitel hücre membranına taşınması, membrana yerleşmesi ve doğru fonksiyon göstermesi gibi çeşitli basamaklarda meydana gelebilen CFTR protein hatalarına göre kullanılan

düzeltilici tedaviler (*corrective therapy*), *read-through* bileşikleri, Lumacaftor ve Tezacaftor düzelticileri (*correctors*), yükselticiler (*amplifiers*), Ivacaftor güçlendiricileri (*potentiators*) gibi modülatör ilaçların dışında hastaların tedavisinin temel parçalarından biri de antibiyotiklerdir.

Kistik fibrozis hastalarında CFTR proteininin yapısında meydana gelen mutasyonlar sebebiyle, silli epitel hücreler görevini yerine getiremez ve klorür iyonlarının hücre içinde kalması, suyun hücre dışına atılmasını engelleyerek hücre içi ve dışı iyon dengesinin bozulmasına yol açar (4). İyon geçişindeki bu bozulma ile su emilimi artar, solunum yolundaki sıvının azalmasıyla ise mukus daha katı bir hal almaktadır. Mukusun daha katı bir hal almasıyla silyalar temizleme işlemini gerçekleştiremez ve mukosilyer klirens olarak tanımlanan mukusun solunum yolundaki mikroorganizma ve bakterilerden temizlenme mekanizması da bozulur (3,4). Solunum yolunda mukus birikimi kistik fibrozis hastalarında nefes almayı güçleştirmektedir. Hastalık ilerledikçe hava yolu tıkanmakta ve nefes alışverişi daha da zorlaşmaktadır. Mukosilyer klirens mekanizmasının bozulması epitel hücreleri enfeksiyona açık hale getirir ve bakterilerin hava yollarına yerleşmesine uygun ortam sağlanmasıyla hastalarda inflamasyon gelişimine sebep olur (4).

Kistik fibrozis hastalarında inflamasyon gelişimine ve kronik akciğer enfeksiyonuna yol açan başlıca bakteriler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia*'dır (13).

Kistik fibrozis'te tedavinin temel parçasından biri olan antibiyotikler, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakterilerin solunum yolunda kolonize olmasıyla meydana gelen enfeksiyonlarda ve hastalarda meydana gelen akut pulmoner alevlenme tedavisinde genellikle kullanılır (13).

Başlıca hedefi solunum yolunu enfeksiyonlardan arındırmak olan antibiyotik tedavisi kistik fibrozis hastalarına dört genel endikasyonla verilmektedir. Bunlardan ilki: hastadaki akciğer akut alevlenmenin tedavi edilmesi, ikincisi: belli bir mikroorganizmadan dolayı gelişen enfeksiyonun önlenmesi, üçüncüsü: mikroorganizmaların enfeksiyonun erken aşamalarında yok edilmesi ve sonuncusu solunum yolunda kronik bulunan mikroorganizmaların üremesinin inhibe edilmesidir (13,14).

Kistik fibrozis tedavisinde amikasin, tobramisin, kanamisin gibi aminoglikozit antibiyotikler hastalarda yaygın olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Hastaya başlanacak tedavide antibiyotik seçimi yapılırken, hastada akut pulmoner alevlenme ve kronik kolonizasyon varsa hastadan balgam örneği alınarak kültürde üreyen mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığı analiz edilir (14).

Kistik fibrozis hastalarında, *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyon tedavisinde yaygın kullanılan yöntemlerden biri bakteriyi yok etmek için sinerjistik etki yaratmak amacıyla ikili antibiyotik kullanımıdır (14).

## 2.6. Aminoglikozit Antibiyotikler

Kistik fibrozis hastalarında yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu antibiyotikler, geniş spektrumlu olması, anti-pseudomonal etki sağlaması ve düşük çapraz dirence sahip olması nedeniyle sıklıkla tercih edilir ve genellikle antibiyotikte sinerjistik etkinin oluşturulması amaçlı beta-laktam grubu ve karbapenem grubu ile kombine şekilde tedavilerde kullanılır, bu sayede direnç gelişimi önlenmiş olur (15).

1944 yılında Selman Waksman ve arkadaşlarının *Streptomyces griseus* gram pozitif bakteri kültüründen elde ettiği ilk antibiyotik olan streptomisin ile antibiyotik devri başlamış ve o yıllarda tüberküloz ve ilerlemiş bakteri enfeksiyonlarında tedavi amaçlı kullanılmak için geliştirilmiştir. Streptomisin keşfinin ardından ise sırasıyla neomisin, kanamisin, gentamisin, tobramisin, amikasin gibi aminoglikozit antibiyotikler tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır (16).

Günümüz tedavilerinde *Micromonospora spp.*'den elde edilen aminoglikozitler: gentamisin, sisomisin, netilmisindir. *Streptomyces* türlerinden elde edilen doğal aminoglikozitler ise streptomisin, neomisin, kanamisin, amikasin, tobramisin, paramomisindir. Sıklıkla bu aminoglikozit antibiyotiklerin türevleri de klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Aynı zamanda amikasin, kanamisin A antibiyotiğinin, netilmisin ise sisomisin antibiyotiğinin semi-sentetik türevidir. (17).

**Tablo 2.2.** Aminoglikozitler, elde edildiği bakteri türleri ve bulunduğu yıllar (18)

Aminoglikozit Çeşidi	Elde edildiği bakteri türü	Buluş Yılı
Streptomisin	<i>S. griseus</i>	1944
Neomisin	<i>S. fradiae</i>	1949
Kanamisin	<i>S. kanamyceticus</i>	1957
Paramomisin	<i>S. fradiae</i>	1959
Spektinomisin	<i>S. spectabilis</i>	1962
Gentamisin	<i>M. purpurea</i>	1963
Tobramisin	<i>S. tenebrarius</i>	1968
Sisomisin	<i>M. inyoensis</i>	1970
Dibekasin	<i>S. kanamyceticus</i>	1971
Amikasin	<i>S. kanamyceticus</i>	1972
Netilmisin	<i>M. inyoensis</i>	1975

*Streptomyces* ve toprak bakterileri olan *Actinomycetes*'ten elde edilen aminoglikozitler, merkezde aminosiklitol olarak adlandırılan 6 üyeli bir halka ve bu yapıya glikozidik bağ ile tutunan iki veya daha fazla amino-şeker yapısından meydana geliri bu nedenle yaygın isimleri aminoglikozit olsa da yapısında bulundurduğu halkadan dolayı aynı zamanda aminosiklitolik aminoglikozit olarak da tanımlanır (17,19).

Aminoglikozitlerin molekül ağırlıkları 500-800 arasındadır, suda iyi çözünürler, ısıya oldukça dayanıklıdır ve kimyasal yapıları stabildir fakat pH değişimlerine oldukça duyarlıdır ve optimum aktivite gösterdiği pH aralığı 7,5-8,5'tir. Polar yapıda olan aminoglikozitler çok az lipofilik özellik gösterir bu nedenle yağ molekülü içeren zarlardan geçişleri sınırlıdır. (17)

Aminoglikozit antibiyotikler buldukları kimyasal yapılarına göre beş aileye ayrılmaktadır: Streptomisin, kanamisin, gentamisin, neomisin ve spektinomisin

(17). Streptomisin ailesi: streptomisin aminoglikozitini, kanamisin ailesi: kanamisin A,B, amikasin, tobramisin ve dibekasini, gentamisin ailesi: gentamisin C1, C1a, C2, sisomisin, netilmisin, isepamisini, neomisin ailesi: neomisin ve paromamisini ve spektinomisin ailesi ise spektinomisin aminoglikozitini içerir (17).

*Streptomyces* türlerinden elde edilen aminoglikozitler adlandırılırken -mycin eki getirilir. Örneğin: streptomycin, neomycin, kanamycin ve tobramycin. *Micromonospora* türlerinden elde edilen aminoglikozitler adlandırılırken ise -micin eki getirilir. Örneğin: gentamicin ve sisomicin. Aminoglikozitlerinin sonundaki ekler ile bu farklılık gösterilmektedir (17).

En sık kullanılan aminoglikozit antibiyotik olan tobramisin, anti-pseudomonal etkisi en yüksek olması sebebiyle tedavide ilk sırada yer almaktadır fakat ototoksisite, nefrotoksisite ve miyelotoksisiteye sebep olduğu için büyük dezavantajları vardır. Aminoglikozit antibiyotiklerin kullanan kişilerde işitme kaybına neden olma oranı %33'ken, vestibülotoksisite oranı %15 olarak bildirilmiştir (20,21).

En toksik aminoglikozit olan neomisini sırasıyla gentamisin, kanamisin ve tobramisin antibiyotikleri takip eder, vestibulotoksik özellik gösteren streptomisin ve gentamisin dışında kalan aminoglikozitler ise ilk sırada ototoksik özellik göstermektedir fakat netilmisinin diğer aminoglikozitlere oranla daha az ototoksik özellikte olduğu bulunmuştur (20,21).

## 2.7. Aminoglikozit Antibiyotiklerin Bakteriye Etki Mekanizması

Antibiyotiklerin bakterilere etki mekanizması bakteri gelişiminin durdurulmasını hedefleyen bakteriyostatik ve bakterinin öldürülmesini hedefleyen bakterisidal etki olmak üzere iki şekildedir. Bakteri hücresinin içerisine girerek inaktif forma dönüşmeden ve metabolize edilmeden bakteri hücresinin inhibisyonunu hedefleyen antibiyotikler; bakterinin hücre membranını, hücre duvarını veya protein sentezi ve replikasyon gibi çeşitli fonksiyonlarını engelleyerek bakteriye etki etmeyi hedefler. (22, 23).

70S prokaryotik ribozomlar 30S ve 50S alt birimlerinden oluşurken, 80S ökaryotik ribozomlar 40S ve 60S alt birimlerden oluşmaktadır (24).

Aminoglikozit antibiyotikler bakterinin 30S ribozomal alt biriminin 16S ribozomal RNA'sına bağlanıp bakteriyel kod okuma hatalarına neden olarak bakteriyel

protein sentezinin engellenmesi yoluyla bakteriye etki etmekte ve bakteriyel ölüme neden olmaktadır (24).

Mitokondrinin bakterilerden türediği ‘‘endosimbiyotik teori’’ ökaryotlar tarafından bakterilerin hücre içine alınmasıyla, konakçı ile simbiyotik bir ilişki kurulduğu ve bu süreç boyunca evrimleşerek mitokondriyi oluşturduğu teoridir, bu nedenle ökaryotik mitokondriyal ribozomların prokaryot 70S ribozomlarına daha benzer olduğu tespit edilmiştir (23, 24).

MTRNR1 gen mutasyonları, 12S rRNA'nın ikincil yapısını değiştirip bakteriye benzer hale getirerek aminoglikozitlere daha duyarlı hale getirir ve aminoglikozitler 16S rRNA bakteri ribozomal RNA'sını hedefledikleri gibi, insan 12S rRNA'sını hedefleyip kolayca bağlanır ve insan mitokondriyal protein sentezinde hatalara neden olur (22, 24).

## 2.8. Aminoglikozitler ve Ototoksisite

İşitme, kulağın en büyük dış kısmını oluşturan kulak kepçesiyle yakalanan ses dalgalarının orta ve iç kulak yapıları boyunca iletilmesi ve koklear sinirler yoluyla beyin merkezlerine ulaşmasıyla ses olarak anlam kazanması sürecidir. Normal işitme ISO-1969'a göre 25 dB'den daha düşük işitme eşiğinin bulunması olarak kabul edilir (25). İşitme kaybı tipleri: iletim tipi işitme kaybı, sensörinöral tip işitme kaybı, mikst tip, santral tip ve fonksiyonel (organik olmayan) tip işitme kaybı olmak üzere 5 sınıfta incelenir (26).

Ototoksisite ise kullanılan bir ilaç veya kimyasalın iç kulakta fonksiyon bozukluğu ve hasara neden olması şeklinde tanımlanmakta ve sendromik olmayan, sensörinöral tip işitme kaybı olarak sınıflandırılmaktadır (27). Sensörinöral işitme kaybı ise yok (0– 15 dBHL), minimal (16-25 dBHL), hafif (26-40 dBHL), orta (41-60 dBHL), şiddetli (61-90 dBHL) ve derin (91 dBHL'den yüksek) olarak sınıflandırılmaktadır (28).

*Pseudomonas* enfeksiyonu bulunan kistik fibrozis hastalarının tedavisinde inhaler veya intravenöz olarak kürler halinde uygulanan aminoglikozitler, geniş spektrumlu olması, kişilerde nadiren alerjik reaksiyonlara sebep olması, direnç gösteren enfeksiyonlarda oldukça etkili olması gibi nedenlerle sıklıkla kullanılmaktadır (14).

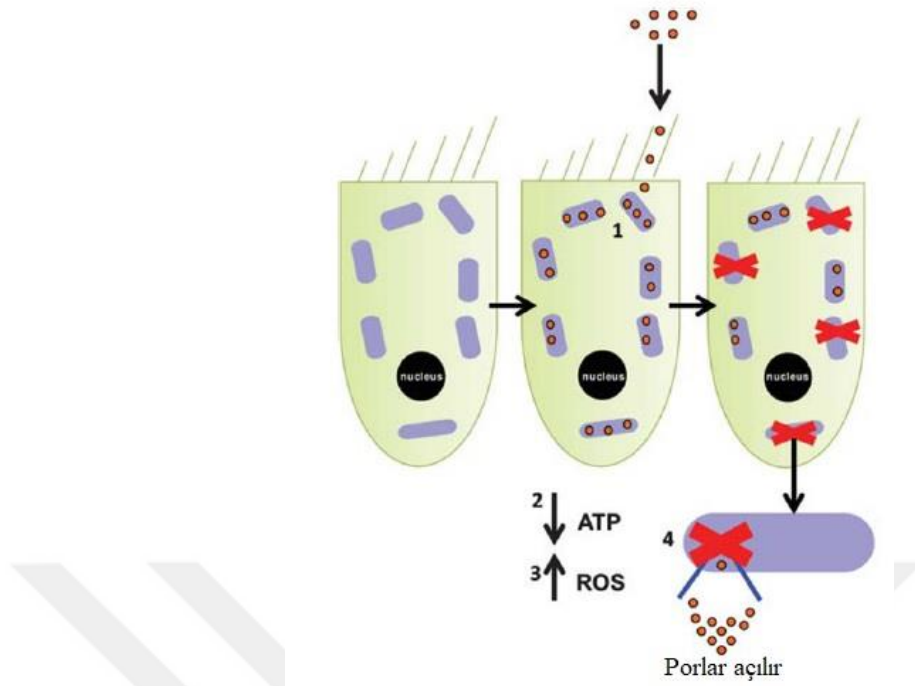
Aminoglikozit tedavisinin kistik fibrozis hastaları üzerinde hayat kalitesini artırdığı, atak sıklığını azalttığı ve akciğer fonksiyonlarında iyileşmeler sağladığı belirlense de anti-pseudomonal etkili bu antibiyotiklerin en büyük dezavantajı kişilerde ototoksisiteye neden olmasıdır. Streptomisin ve gentamisin dışındaki aminoglikozitlerin neden olduğu ototoksisite oranı %33 olarak bilinmekte ve genellikle işitme kaybı ile beraber baş dönmesi de bu bulgulara eşlik etmektedir (29).

Lokal veya parenteral şekilde tedavide kullanılabilen aminoglikozitlerin gastrointestinal emilimleri iyi olmadığından, işitme için her iki kullanım şekli de ototoksisiteye neden olabilmektedir. Aminoglikozitlerin lokal kullanımı ile kulakta bulunan yuvarlak pencere aracılığıyla pasif veya aktif transportu gerçekleştiren aminoglikozitler sistemik dolaşıma karışmaktadır (30).

Aminoglikozit antibiyotik kullanımı sonucu karşılaşılan ototoksisite sıklığı yetişkinlerde %2-45 ve yeni doğanlarda %0-2 olarak bilinmekte ve hastalarda ototoksisitenin kabul edilmesi için aminoglikozit kullanım sonrasında kişilerde 10 desibellik (dB) işitme kaybı beklenmektedir (30).

Büyük yapılı moleküller olan aminoglikozitler, sistemik veya apikal yol ile iç kulağa girerek burada birikir. Sistemik yolu izleyen aminoglikozitler, tüy hücrelerinin iyon-sıvı dengesini ayarlayan kan-labirent bariyerini (KLB) geçerek *stria vaskularis* yoluyla iç kulağa ulaşır (15). Diğer yandan topikal uygulamada, aminoglikozit antibiyotik, kan-labirent bariyerini atlayarak yuvarlak pencere ile iç kulağa ulaşır (31).

İç kulağa ulaşan aminoglikozit antibiyotikler apikal yüzeyden endositoz yoluyla veya transdüksiyon kanallar aracılığıyla emilir ve iç kulak koklear hücrelerin mitokondrilerine girerek birikir (31). 12S rRNA mutasyonlarının da varlığı ile mitokondriyal ribozomların translasyonu inhibe edilir, oksijen tüketim hızının azalmasıyla oksidatif fosforilasyonla O<sub>2</sub> suya dönüştürülemez, üretilen ATP'nin azalmasıyla hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) artar ve mitokondri membranının da tahribatıyla koklear apoptoz gerçekleşir böylece aminoglikozit kaynaklı işitme kaybı ortaya çıkar (31).



**Şekil 2.6.** Aminoglikozitlerin iç kulak koklear hücre tahribatına yol açması. Aminoglikozitler iç kulak koklear hücrelerin mitokondrilerine girerek birikir. 12S rRNA mutasyonlarının da varlığı ile mitokondriyal ribozomların translasyonu inhibe edilir, üretilen ATP'nin azalmasıyla hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) artar ve mitokondri membranının da tahribatıyla koklear apoptoz gerçekleşir (32).

Normal şartlar altında ROS organizmaların metabolizmalarında bulunan, proliferasyon, apoptoz ve gen ekspresyonu gibi hücresel süreçlerde yer alan normal bir üründür ve iç kulakta homeostazı sağlamak için glutatyon gibi antioksidanlar yardımıyla kolaylıkla temizlenmektedir ancak aminoglikozit ilaçlar, yaşlanma ve çevresel faktörler bu dengeyi bozmaktadır (33). Aminoglikozitler, demir ve bakır gibi metallere birleşerek reaktif oksijen türlerini oluşturabilmektedir. Aminoglikozit antibiyotiklerin iç kulakta bulunan duyu hücreleri ve nöronlara zarar veren, bu hücrelerin esas olarak apoptozu indükleyen iç yoldan, kaspaz aktivasyonu ile hücre nekrozu ve apoptozuna neden olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak işitme kaybına yol açan reaktif oksijen türlerinin üretiminde ve ototoksisitede aminoglikozitlerin önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (33).

Mitokondriyal DNA'da MTRNR1 (12S ribozomal RNA) geninde bulunan m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının aminoglikozit ilişkili ototoksisite riskini artırdığı bilinmektedir.

Heteroplazmi görülme oranı oldukça az olmakla beraber (%3.4), mutant kopyaların %20'sinden azını taşıyan heteroplazmik hastalarda mutasyonun işitme kaybına neden olmadığı ve bu hastaların asemptomatik veya hafif işitme kaybına sahip olduğu bilinmektedir. %52'den fazla mutant kopya sayısına sahip heteroplazmik hastalarda ise bu durum, orta ile şiddetli işitme kaybı ile ortaya çıkmaktadır (34).

Mutasyon varlığında insan MTRNR1 gen yapısında bir aminoglikozit bağlanma bölgesi oluşmasıyla, mitokondriyal protein sentezi azalır, serbest radikal oluşumu ve ardından hücrenin ölümü gerçekleşir (35). Bunun sonucunda aminoglikozitler tarafından indüklenen işitme kaybı gözlenmektedir. Aminoglikozit maruziyetiyle ilişkili işitme kaybı, tek bir dozdan sonra bile ortaya çıkabildiği gibi; bilateral, geri dönüşümsüz veya koklear implantasyon gerektirebilecek kadar şiddetli olarak ortaya çıkabilmektedir (36).

## 2.9. Mitokondriyal DNA ve MTRNR1 Gen Mutasyonları

Mitokondri; 1850 yılında Kolliker tarafından keşfedilen, tüm ökaryotlarda var olan, oksidatif fosforilasyon (*OXPPOS*), hücresel sinyalizasyon, mitokondride metabolik dengenin sağlanması, hücre yaşlanması ve hücresel apoptoz mekanizması gibi çeşitli hücresel süreçlerde gereken enerjinin elde edilmesinden sorumlu, çapı 0,75-3 µm arasında değişebilen en önemli organellerden biridir (37). Kolliker tarafından keşfedilse de ilk olarak 1948 yılında Eugene Kennedy ve Albert Lehninger'ın çalışmaları sonucu hücrede oksidatif fosforilasyon süreçlerinden sorumlu olduğu bulunmuştur (37).

Mitokondriyal kalıtmadan 1970'li yılların sonlarına doğru söz edilmeye başlanmış, 1981 yılında ise insan ve farklı türlerdeki mitokondriyal DNA'nın dizi analizi Anderson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve bu tarihten itibaren ise mitokondriyal DNA ve mitokondriyal DNA hastalıkları ile ilişkili çalışmalar hız kazanmıştır (37).

Mitokondride oksidatif fosforilasyon, mitokondri iç zarına yerleşmiş halde bulunan ve solunum zincirini oluşturan, birkaçı nükleer DNA (nDNA) ve birkaçı da

mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan beş enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilir. 16.569 baz çifti uzunluğunda, pürinler bakımında zengin bir ağır ve pirimidinler bakımından zengin bir hafif olmak üzere çift zincir içeren ve halkasal yapıda bulunan insan mitokondriyal DNA'sı, 16S ve 12S olmak üzere iki ribozomal RNA (rRNA), 13 adet solunum zinciri alt ünitesinin proteinlerini kodlayan mesajcı RNA (mRNA), 22 taşıyıcı RNA (tRNA) olmak üzere 37 gen kodlamaktadır (37). Çift zincir içeren ve halkasal yapıda bulunan mitokondriyal DNA'da birbirinden farklı iki adet replikasyon orijini bulunur ve *displacement loop* (D-loop) isimli üzerinde gen ve intron bulundurmayan kontrol bölgesinde, 16S ve 12S rRNA'yı sentezleyen ağır zincirin replikasyon orijini yer almaktadır (37). Mitokondriyal DNA'nın transkripsiyonu sırasında polisistronik transkripsiyon gerçekleşir ve ağır ile hafif zincirler birbirine zıt şekilde ilerler, bu nedenle nükleer DNA ile mitokondriyal DNA transkripsiyon açısından farklılıklar içermektedir. Mitokondriyal DNA, nükleer DNA'dan bağımsız bir replikasyon ve transkripsiyon mekanizmasına sahiptir fakat nükleer DNA tarafından kodlanan enzimler yardımı ile replikasyon ve transkripsiyon olaylarını gerçekleştirir (37).

Mitokondrinin bakterilerden türediği teori olan "endosimbiyotik teori" ökaryotlar tarafından bakterilerin hücre içine alınmasıyla, konakçı ile simbiyotik bir ilişki kurulduğu ve bu süreç boyunca evrimleşerek mitokondriyi oluşturduğu düşünülmektedir. 55S memeli mitokondriyal ribozomu, 12S rRNA'yı kodlayan 28S ve 16S rRNA'yı kodlayan 39S olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Ökaryotlarda sitoplazma dışında mitokondride bulunan ribozomların prokaryot 70S ribozomlarına daha benzer olduğu tespit edilmiştir (38).

Mitokondriyal DNA ile nükleer DNA'nın translasyon sırasında neredeyse tamamen genetik kodları aynı olup, mitokondride AUA "metiyonin" kodlarken evrensel kodonda "izolösin" kodlamakta, mitokondride "triptofan" kodlayan UGA evrensel kodonda "stop" kodonu olması gibi farklılıklar bulunmaktadır (39). Genellikle sitoplazmik bir kalırım gösteren mitokondriyal DNA'da bu genler anasal (maternal) olarak adlandırılan anne yolu ile yavrulara aktarım şeklinde gerçekleşir (39). Mitokondriyal DNA'da meydana gelebilecek bir mutasyon sonucu hücrede mutant ve normal mitokondriyal DNA'lar bir arada bulunur ve sonraki nesilde

yavrulara rastgele dağıtılabilir, bu nedenle mitokondriyal DNA heteroplazmik bir dağılım gösterebilmekte ve mitokondriyal DNA çalışmalarında karşılaşılabilmektedir.

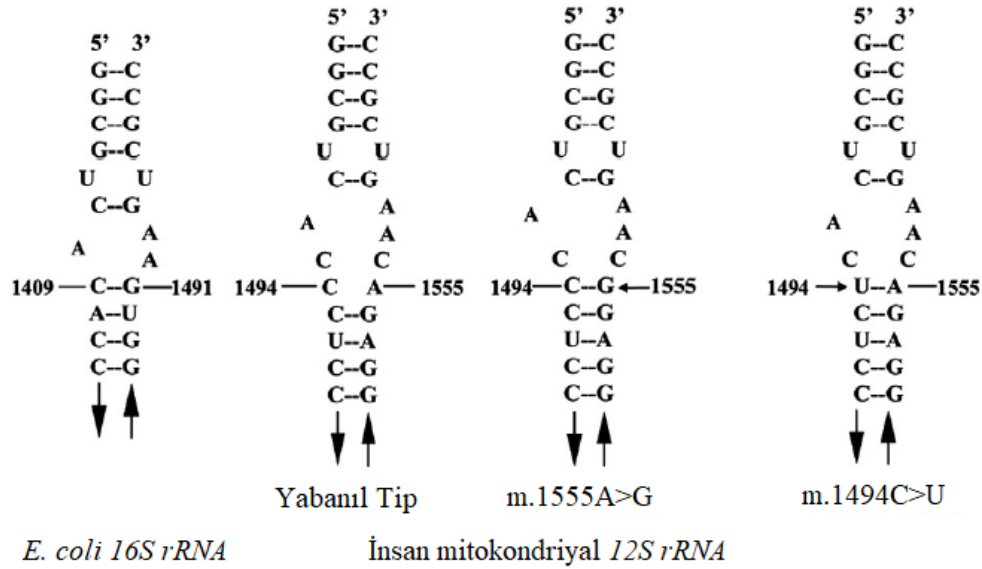
MTRNR1 geni, insan mitokondriyal 12S rRNA'sını kodlamaktadır. Özellikle, 12S rRNA geninin farklı popülasyonlarda aminoglikozit kaynaklı sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybında hot spot bir gen olduğu bulunmuştur (40,41,42). MTRNR1 gen mutasyonları anneden aktarılarak maternal kalıtım ile işitme kaybına neden olabileceği gibi, işitme kaybı öyküsü bulunmayan bir ailelerde de karşımıza çıkabilmektedir.

MTRNR1 genindeki m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonları, aminoglikozit kaynaklı ototoksosite ile ilişkili en yaygın üç mutasyondur. MTRNR1 geninde en sık rastlanan ve işitme kaybına yol açan mutasyon m.1555A>G mutasyonudur ve klinik tedavilerde, hastalarda aminoglikozit antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilmesi nedeniyle oldukça önem arz etmektedir. m.1555A>G mutasyonundan sonra, daha nadir rastlanan m.1494C>T mutasyonu ise yine aminoglikozit kaynaklı işitme kaybıyla ilişkili bulunmuştur. Bu iki mutasyon dışında ise m.1095T>C mutasyonu diğerlerine kıyasla en nadir rastlanan aminoglikozit ototoksitesiyile ilişkili mutasyondur ve esas olarak mitokondriyal ribozomların küçük alt birimlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır.

### 2.9.1. m.1555A>G ve m.1494C>T Mutasyonu

m.1555A>G mutasyonu, aminoglikozit kaynaklı işitme kaybında en yaygın görülen (%0.8) mitokondriyal 12S rRNA mutasyonudur ve homoplazmik m.1555A>G mutasyonunun dünya çapında sendromik olmayan birçok işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (43). m.1555A>G mutasyonundan sonra en sık görülen ikinci mutasyon (%0.64-7) mitokondriyal 12S rRNA geni m.1494C>T mutasyonudur (44). Mitokondriyal 12S rRNA'da *helix* 44'te yer alan ve 1494. pozisyonda bulunan nükleotit yüksek oranda korunmuştur ve 1555. pozisyona karşılık gelmektedir. İnsan mitokondrisinde yabancı tipte 1555 pozisyonundaki nükleotit yüksek oranda korunmuş A'dır. (*E. coli* 16S rRNA'da 1491. pozisyona karşılık gelir) (43,45). Bunun 1494. pozisyonda bulunan C ile eşleşmesi beklenir fakat mutasyon sonucu G'ye dönüşür ve 12S rRNA'nın ikincil yapısını *E.coli* 16S rRNA'ya karşılık gelen bölgesine daha benzer hale getirir ve bakterilerde olduğu gibi bir aminoglikozit bağlanma bölgeleri

oluşur (43,46). Böylece m.1555A>G ve m.1494C>T mutasyonu, 12S rRNA'nın ikincil yapısını değiştirip bakteriye benzer hale getirerek aminoglikozitlere daha duyarlı hale getirir ve aminoglikozitler 16S rRNA bakteri ribozomal RNA'sını hedefledikleri gibi, insan 12S rRNA'sını hedefleyip kolayca bağlanır ve insan mitokondriyal protein sentezinde hatalara neden olur (45,46) (Şekil 2).



**Şekil 2.7.** E. coli 16S rRNA ve insan mitokondriyal 12S rRNA'sı. E. coli 16S rRNA bölgesindeki aminoglikozit bağlanma bölgesi (A) ile gösterilmiştir. E. coli 16S rRNA bölgesindeki aminoglikozit bağlanma bölgesinin insan mitokondriyal 12S rRNA'sına karşılık gelen yabancıl tip bölge (B), m.1555A>G mutasyonu (C), ve m.1494C>T mutasyonu (D) oklarla gösterilmiştir. Mutasyonlar sonucu insan mitokondriyal 12S rRNA'sı, E. coli 16S rRNA aminoglikozit bağlanma bölgesine benzer hale gelmektedir (43).

### 2.9.2. m.1095T>C Mutasyonu

MTRNR1 (12S rRNA) genindeki m.1095T>C mutasyonu, m.1555A>G ve m.1494C>T mutasyonlarından sonra en sık görülen üçüncü (%0.6) mutasyondur. 12S rRNA'nın evrensel olarak korunan mitokondriyal ribozomun peptidil bölgesinde, 25. *loop (helix)*'ta meydana gelmektedir. Bu nedenle m.1095T>C mutasyonu ile birlikte korunmuş *loop* yapısının konfigürasyonunda meydana gelen değişimler sonucunda translasyon sırasında aminoasitlerin aminoaçil bağlanma bölgesinden peptidil bağlanma bölgesine transloke olamadığı bilinmektedir. Mitokondriyal protein sentezinin bozulduğu ve sitokrom c oksidaz aktivitesinde önemli bir azalmanın olduğu

literatürde belirtilmiştir (47). m.1095T>C mutasyonu olan bireylerde, kontrol grubuna oranla apoptotik hücre sayısında on kat artış olduğu böylece bu mutasyonun patojenik bir mutasyon olduğu bulunmuştur.

Yapılan araştırmalar ile m.1555A>G mutasyon varlığının işitme kaybına neden olan bir faktör olduğu bilinse de m.1555A>G ile m.1095T>C mutasyonunun co-segregasyonunun görüldüğü bireylerde işitme kaybının daha da şiddetlendiğı belirtilmektedir (48).



### 3. BİREYLER VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Bireyler

##### 3.1.1. Hastaların Klinik Özellikleri

Çalışmamızda yer alan ve mutasyon taraması yapılan bireyler, 2013 yılı ocak ayı - 2023 yılı ocak ayı tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından takip edilen, ter testi ve mutasyon analizi gibi yöntemlerle kistik fibrozis tanısı konulan ve Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından kistik fibrozis olduğu moleküler analizlerle doğrulanan, 3-14 yaşları arasında bulunan 68 kız (%57.1) ve 51 (%42.9) erkekten oluşan 119 hastadan meydana gelmektedir. Çalışma grubunun yaş ortalaması ise 11'dir.

Hastaların odyolojik sonuçları, aminoglikozit kullanıp kullanmama durumu, cinsiyet, yaş, CFTR mutasyonları, FEV1 değer düşüklüğü, enfeksiyon/kolonizasyon durumu, nazal polip bulundurup bulundurmama gibi klinik veriler kaydedilmiştir.

Çalışmamızda yer alan kistik fibrozis tanılı 119 hastanın CFTR mutasyonları: F508del/F508del mutasyonlu ve F508del/heterozigot mutasyonlu 40 kişi (%33.7) ve diğer mutasyonlara sahip 79 kişi (%66.3) olarak tespit edilmiştir. SPSS yazılım analizi sırasında ise F508del/F508del mutasyonlu ve F508del/heterozigot mutasyonlu hastalar ve diğer mutasyonlara sahip hastalar olmak üzere iki grup şeklinde değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasında bulunan hastalar, geri ödemeleri onaylanmadığı için modülatör tedaviye erişim sağlayamayan pediatrik kistik fibrozis hastalarından oluşmaktadır.

FEV1 değer düşüklüğü kullanılarak hastalar z-skoru  $>-1.645$  ise normal, z-skoru  $-1.65$  ve  $-2.5$  arasında ise hafif, z-skoru  $-2.51$  ve  $-4$  arasında ise orta ve z-skoru  $<-4.1$  ise ağır şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmada bulunan 119 hastanın FEV1 değer düşüklüğü: hastaların 77'si normal (%64.7), 19'u hafif (%15.9), 16'sı orta (%13.4) ve 7'si ağır (%5.8) olarak bulunmuştur. SPSS yazılımında ise normal FEV1 değer düşüklüğüne sahip hastalar ve diğer hastalar (hafif, orta ve ağır) olmak üzere iki grup şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yer alan kistik fibrozis tanılı 119 hasta, bronşektazi bulundurup bulundurmama bakımından değerlendirilmiştir. 119 hastanın 54'ünde (%45.37)

bronşektazi görülürken ve kalan 65'inin (%54.62) bronşektazi bulundurmadığı analiz edilmiştir.

Çalışmada yer alan kistik fibrozis tanılı 119 hasta, pankreatik yetmezlik bulundurup bulundurmama bakımından değerlendirilmiştir. 119 hastanın 113'ünde (%94.9) pankreatik yetmezlik bulunurken, kalan 6'sının (%5.1) pankreatik yetmezlik bulundurmadığı analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında kontrol grubunu inhaler veya intravenöz (IV) aminoglikozit kullanım öyküsü bulunmayan 22 kişiden (%18.4) oluşan hasta grubu oluşturmaktadır.

### **3.1.2. Otolaringolojik ve Odyolojik Analizler**

2013 yılı ocak ayı - 2023 yılı ocak ayı tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından takip edilen, kistik fibrozis olduğu bilinen hastaların, mitokondriyal 12S rRNA bölgesinin mutasyon taraması yapılmadan önce, bu hastaların her biri Hacettepe Üniversitesi Kulak Burun Boğaz polikliniğinde değerlendirilerek KBB muayeneleri gerçekleştirilmiş ve nazal polip bulunma gibi KBB ile ilişkili semptomları kaydedilmiştir.

KBB muayeneleri gerçekleştirilen tez çalışma grubunda bulunan 119 hastanın 28'inde (%23.5) nazal polip görülürken, geri kalan 91 hastada (%76.4) bu bulguya rastlanmamıştır.

KBB muayeneleri gerçekleştirilen çocuklara sırasıyla yapılan işitme testleri: işitme seviyesi (dB-ISO-1964), frekanslar (Hz), saf ses ortalaması (dB-SSO), konuşmayı anlama eşiği (dB-KAE), konuşmayı fark etme eşiği (dB-KFE), konuşmayı ayırt etme (%), tedirgin edici ses yüksekliği (dB) ve timpanometridir.

Sensörinöral işitme kaybı: yok (0– 15 dBHL), minimal (16-25 dBHL), hafif (26-40 dBHL), orta (41-60 dBHL), şiddetli (61-90 dBHL) ve derin (91 dBHL'den yüksek) olarak sınıflandırıldı.

**Tablo 3.1.** İşitme kaybı dereceleri

<b>İşitme Kaybı Derecesi</b>	<b>Saf Ses Ortalaması (Db HL)</b>
Normal işitme	0 - 15
Minimal derecede işitme kaybı	16 - 25
Hafif derecede işitme kaybı	26 - 40
Orta derece işitme kaybı	41 - 60
Şiddetli derecede işitme kaybı	61- 90
Derin derecede işitme kaybı	91>

Tez çalışmasında hastaların odyolojik tetkikleri sonucu değerlendirilirken işitme testi normal olan ve işitme kaybı bulunan hastalar olmak üzere iki grup belirlendi.

Çalışmaya katılan 119 hastanın 13'ünde (%10.9) işitme kaybı tespit edildi, geri kalan 106 (%89.1) hastanın ise işitme testi sonucu normaldi.

İşitme kaybı tespit edilen 13 hastanın ise yüksek frekanslı (91>) sensörinöral işitme kaybına sahip olduğu analiz edildi.

### **3.1.3. Aminoglikozit Kullanım Öyküsü**

Tez çalışmasında hastaların aminoglikozit kullanma öykülerine göre iki grup belirlendi: inhaler veya intravenöz (IV) aminoglikozit tedavisi alan ve hiç aminoglikozit tedavisi almayan.

119 hastanın 97'sinde (%81.5) intravenöz (IV) veya inhaler aminoglikozit alma öyküsü vardı. 97 hastanın 32'si (%26.8) intravenöz, 20'si (%16.8) inhaler ve 45'i (%37.8) intravenöz ve inhaler aminoglikozit kullanma öyküsü olduğu bilinmektedir. Kalan 22 hasta (%18.4) ise aminoglikozit kullanım öyküsü bulunmayan 5-14 yaş arasındaki kistik fibrozis hastalarının bulunduğu kontrol grubunu oluşturmaktadır.

İntravenöz (IV) veya inhaler aminoglikozit alan 97 hastanın 13'ünde (%13.4) sensörinöral işitme kaybı vardı ve bu hastaların 5'inde ise yüksek frekanslı (> 8kHz) işitme kaybı mevcuttu.

**Tablo 3.2.** Çalışmada yer alan hastaların klinik tablosu

Hasta sayısı	<i>n</i> : 119
Yaş (ortalama)	3.8-14.2 (11)
Teşhis yaşı (ortalama)	1-5 (3)
Kız, erkek hasta sayısı	68 (%57.1), 51(%42.9)
CFTR mutasyonu, <i>n</i> (%)	<i>n</i> :119
• F508del	40 (%33.6)
• Diğer	79 (%66.3)
İşitme testi sonuçları	<i>n</i> :119
• Normal işitme	106 (%89.0)
• İşitme kaybı olan	13 (%10.9)
Nazal polip bulunma durumu	<i>n</i> :119
• Nazal polip olan	28 (%23.5)
• Olmayan	91 (%76.4)
Pankreatik yetmezlik	<i>n</i> :119
• Pankreatik yetmezlik var	113 (%94.9)
• Pankreatik yetmezlik yok	6 (%5.1)
Bronşektazi	<i>n</i> :119
• Bronşektazi var	54 (%45.37)
• Bronşektazi yok	65 (%54.62)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kolonizasyonu	<i>n</i> :119
• Kolonizasyon olan	103 (%86.5)
• Olmayan	16 (%13.4)
FEV1 değer düşüklüğü	<i>n</i> :119
• Normal	77 (%64.7)
• Diğer (hafif/orta/ağır)	42 (%32.3)
Aminoglikozit kullanma öyküsü	<i>n</i> :119
• Aminoglikozit kullanan	97 (%81.5)
-İntravenöz	32 (%26.8)
-İnhaler	20 (%16.8)
-İntravenöz + inhaler	45 (%37.8)
• Aminoglikozit kullanmayan	22 (%18.4)

### 3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

#### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Hasta DNA'larının Amplifikasyonu**

Distile su

Taq DNA Polimeraz: 5 U/ $\mu$ l

(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> içeren 10X Buffer

Deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) : 2.5 mM

MgCl<sub>2</sub>: 25 mM

*Forward* primer : 10  $\mu$ M

*Reverse* primer : 10  $\mu$ M

DNA :100ng/ $\mu$ l

#### **PCR Sonucunun Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü**

Agaroz (*electrophoresis grade*) Nzytech

Tris-Asetat-EDTA Tamponu (pH:8,0)

Yükleme Tamponu:

- 1x TAE tamponu : 4,5 ml

- *Orange G* boyası : 0,01 g

- Etidyum Bromür (Sigma) :10 mg/ml

- Distile su

- Moleküler ağırlık belirleyicisi (50 bç) (Nzytech)

#### **Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Hasta DNA'larının Mutasyon Analizi**

Distile su

*BsmAI* rCutSmart™ Buffer 10X (*New England Biolabs*)

*BsmAI* Enzim 1,000 ünite/ml (*New England Biolabs*)

*HphI* rCutSmart™ Buffer 10X (*New England Biolabs*)

*HphI* Enzim 5,000 ünite/ml (*New England Biolabs*)

PCR ürünü 10  $\mu$ l

### 3.2. Yöntemler

#### 3.2.1. m.1555A>G Mutasyon Taraması

##### Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Primerlerin Hazırlanması

m.1555A>G mutasyonunu içeren MTRNR1 gen bölgesi (GenBank: NC\_001807) m.1555A>G mutasyonunun tespiti için literatür referans alınarak liyofilize haldeki mtDNA'daki 1354-1377 pozisyonuna karşılık gelen *forward* (F) ve mtDNA'daki 1580-1601 pozisyonuna karşılık gelen *reverse* (R) primerler satın alındı (41). Primerler DNaz RNaz içermeyen steril saf su ile çözdürülerek 100 pmol (pikomol)/ $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l'lik ara stoklar olarak hazırlanarak  $-20^{\circ}\text{C}$  koşullarında saklandı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** m.1555A>G Mutasyon Taraması PCR için kullanılan Primer Dizileri (41)

<b>F sentetik oligonükleotid primer dizisi</b>	5'AGAAATGGGCTACATTTTCTACCC'3
<b>R sentetik oligonükleotid primer dizisi</b>	5'GTTCGTCCAAGTGACCTTCCA'3

##### Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

m.1555A>G mutasyonunun tespiti için, tüp başına reaksiyon hacmi toplam 30  $\mu$ l olacak şekilde, aşağıda verilen deney koşullarında PCR karışımı hazırlandı.

<b>PCR reaksiyonu</b>	<b>1 rxn (<math>\mu</math>l)</b>
Buffer 10X	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	2 $\mu$ l
<i>Forward</i> Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
<i>Reverse</i> Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Taq DNA Polimeraz (5 U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	19 $\mu$ l

Toplam master mix	28 $\mu$ l
DNA (100 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Toplam hacim:	30 $\mu$ l

### Reaksiyon Koşulları

- 94° C →3 dk
  - 94° C →30 sn
  - 60° C →45 sn
  - 72° C →30 sn
  - 72° C →3 dk
- } 35 döngü

### Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik konsantrasyonda agaroz jeli hazırlarken agarozdan 2 gram tartıldı ve 100 ml 1xTBE tamponu içerisinde çözdürülerek mikrodalga fırın içerisinde maksimum sıcaklıkta kaynatıldı. Daha sonra soğuk suda 50-60°C olana kadar soğutulmuş içerisine 7 µl etidyum bromür (EtBr) eklendi ve elektroforez kasetine tarak yerleştirilerek içerisine agaroz jel döküldü. Yaklaşık 25 dakika jelin soğuyup polimerleşmesi beklendi ve kaset içerisindeki tarak çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

### PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen PCR ürünlerinden 5 µl örnek alınıp, 5 µl yükleme boyası (*orange G*) ile karıştırılarak %2'lik agaroz jeldeki kuyucuklara çökmesi sağlandı, ardından 50 bç'lik DNA belirteç (*ladder*) 2 µl olacak şekilde ilk kuyucuğa yüklendi. Elektroforez tankının elektrotları güç kaynağına takılarak 120V, 130 miliamperde yaklaşık 40 dakika elektroforez edildi. Süre sonunda örnek yüklü jel UV transluminatör yardımı ile kontrol edildi ve m.1555A>G mutasyonu için 248 bç'lik PCR ürünü tespit edildi (Şekil 4.1).

### m.1555A>G Mutasyonu için Restriksiyon Enzim Kesimi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen 248 bç'lik PCR ürünündeki mutasyon analizi bu bölgeye spesifik restriksiyon endonükleaz enzimi olan *BsmAI* (*New England Bio Labs* ®) kesim enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. *BsmAI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile ampikonun kesilmesi için tanıma dizisi GTCTC (1/5) bölgesidir. Aşağıda

verilen miktarlar ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı. Analiz için her bir reaksiyon tüpü başına 10 ünite *BsmAI* kesim enzimi kullanıldı.

PCR reaksiyonu	1 rxn (µl)
<i>BsmAI</i> Enzim Buffer 10X	2 µl
<i>BsmAI</i> Enzimi	1 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl

Toplam master mix 10 µl

PCR ürünü 10 µl

Toplam hacim: 20 µl

Restriksiyon endonükleaz enzimi *BsmAI* ile PCR ürünlerinin inkübasyon süreleri, optimum sıcaklık değeri olan 55 °C'de 16 saat olmak üzere Eppendorf ThermoMixer C cihazı ile gerçekleştirildi.

### **m.1555A>G Mutasyonu için RFLP Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi**

m.1555A>G mutasyonu, 248 bç'lik PCR ürününün *BsmAI* enzimi ile inkübe edilmesinin ardından %3'lük agaroz jel hazırlanarak analiz edildi. %3'lük konsantrasyonda agaroz jeli hazırlarken agarozdan 3 gram tartıldı ve 100 ml 1xTBE tamponu içerisinde çözdürüldü. Mutasyon, *BsmAI* enzimi ile kesilen bantların boylarına göre tespit edildi (Şekil 4.2).

10 µl RFLP ürünü alınıp, 7 µl yükleme boyası (*orange G*) ile karıştırılarak %3'lük agaroz jelde 120V, 130 miliamperde yaklaşık 40 dakika elektroforez edildi. Süre sonunda jel UV transluminatör yardımı ile kontrol edildi.

Mutasyon yokluğunda beklenen bant boyutu, kesim sonrası 197 bç ve 51 bç'dir. Mutasyon ile adenin nükleotidinin 1555. pozisyonda guanin nükleotidine dönüşmesi durumunda GTCTC (1/5) enzim kesim bölgesi ortadan kalkar ve 248 bç'lik PCR ürünü kesilmeyerek başlangıç boyutunda kalır.

- m.1555A → 197 bç, 51 bç
- m.1555A>G → 248 bç

### 3.2.2. m.1494C>T Mutasyon Taraması

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Primerlerin Hazırlanması

m.1494C>T mutasyonunu içeren MTRNR1 gen bölgesi (GenBank: NC\_001807), m.1494C>T mutasyonunun tespiti için literatür referans alınarak liyofilize haldeki mtDNA'daki 1414-1434 pozisyonuna karşılık gelen *forward* (F) ve mtDNA'daki 1854-1873 pozisyonuna karşılık gelen *reverse* (R) primerler satın alındı (46). Primerler DNaz RNaz içermeyen steril saf su ile çözdürülerek 100 pmol (pikomol)/ $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l'lik ara stoklar olarak hazırlanarak -20°C koşullarında saklandı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 3.4.** m.1494C>T Mutasyon Taraması PCR için kullanılan Primer Dizileri (46)

<b>F sentetik oligonükleotid primer dizisi</b>	5' GTCGAAGGTGGATTTAGCAGT'3
<b>R sentetik oligonükleotid primer dizisi</b>	5' GCAGAAGGTATAGGGGTTAG'3

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

m.1494C>T mutasyonunun tespiti için, tüp başına reaksiyon hacmi toplam 30  $\mu$ l olacak şekilde, aşağıda verilen deney koşullarında PCR karışımı hazırlandı.

PCR reaksiyonu	1 rxn ( $\mu$ l)
Buffer 10X	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	2 $\mu$ l
<i>Forward</i> Primer	1 $\mu$ l
<i>Reverse</i> Primer	1 $\mu$ l
Taq DNA Polimeraz	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	19 $\mu$ l

Toplam master mix	28 $\mu$ l
DNA (100 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Toplam hacim:	30 $\mu$ l

### Reaksiyon Koşulları

- 94° C →3 dk
  - 94° C →30 sn
  - 57° C →45 sn
  - 72° C →30 sn
  - 72° C →3 dk
- } 35 döngü

### Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik konsantrasyonda agaroz jeli hazırlarken agarozdan 2 gram tartıldı ve 100 ml 1xTBE tamponu içerisinde çözdürülerek mikrodalga fırın içerisinde maksimum sıcaklıkta kaynatıldı. Daha sonra soğuk suda 50-60°C olana kadar soğutulmuş içerisine 7 µl etidyum bromür (EtBr) eklendi ve elektroforez kasetine tarak yerleştirilerek içerisine agaroz jel döküldü. Yaklaşık 25 dakika jelin soğuyup polimerleşmesi beklendi ve kaset içerisindeki tarak çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

### PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen PCR ürünlerinden 5 µl örnek alınıp, 5 µl yükleme boyası (*orange G*) ile karıştırılarak %2'lik agaroz jeldeki kuyucuklara çökmesi sağlandı, ardından 50 bç'lik DNA belirteç (*ladder*) 2 µl olacak şekilde ilk kuyucuğa yüklendi. Elektroforez tankının elektrotları güç kaynağına takılarak 120V, 130 miliamperde yaklaşık 40 dakika elektroforez edildi. Süre sonunda örnek yüklü jel UV transluminatör yardımı ile kontrol edildi ve m.1494C>T mutasyonu için 441 bç'lik PCR ürünü tespit edildi (Şekil 4.3).

### m.1494C>T Mutasyonu için Restriksiyon Enzim Kesimi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen 441 bç'lik PCR ürünündeki mutasyon analizi bu bölgeye spesifik restriksiyon endonükleaz enzimi olan *HphI* (*New England Bio Labs* ®) kesim enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. *HphI* restriksiyon enzimi ile ampikonun kesilmesi için tanıma dizisi GGTGA(8/7) bölgesidir. Aşağıda verilen

miktarlar ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı. Analiz için her bir reaksiyon tüpü başına 10 ünite *HphI* kesim enzimi kullanıldı.

PCR reaksiyonu	1 rxn (µl)
<i>HphI</i> Enzim Buffer 10X	2 µl
<i>HphI</i> Enzimi	1 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl

Toplam master mix 10 µl

PCR ürünü 10 µl

Toplam hacim: 20 µl

Restriksiyon endonükleaz enzimi *HphI* ile PCR ürünlerinin inkübasyon süreleri, enzimin çalıştığı optimum sıcaklık değeri olan 37 °C’de 18 saat olmak üzere etüvde gerçekleştirildi.

#### **m.1494C>T Mutasyonu için RFLP Ürününün Agaroz Jel**

##### **Elektroforezinde Analizi**

m.1494C>T mutasyonu, 441 bç’lik PCR ürününün *HphI* enzimi ile inkübe edilmesinin ardından %3’lük agaroz jel hazırlanarak analiz edildi. %3’lük konsantrasyonda agaroz jeli hazırlarken agarozdan 3 gram tartıldı ve 100 ml 1xTBE tamponu içerisinde çözdürüldü. Mutasyon, *HphI* enzimi ile kesilen bantların boylarına göre tespit edildi (Şekil 4.4).

10 µl RFLP ürünü alınıp, 7 µl yükleme boyası (*orange G*) ile karıştırılarak %3’lük agaroz jelde 120V, 130 miliamperde yaklaşık 40 dakika elektroforez edildi. Süre sonunda jel UV transluminatör yardımı ile kontrol edildi.

Mutasyon yokluğunda beklenen bant boyutu *HphI* enzimi ile kesim sonrası 370 bç ve 71 bç’dir. Mutasyon ile sitozin nükleotidinin 1494. pozisyonda timin nükleotidine dönüşmesi durumunda *HphI* enzim kesim bölgesi GGTGA(8/7) ortadan kalkar ve 441 bç’lik PCR ürünü kesilmeyerek başlangıç boyutunda kalır.

- m.1494C → 370 bç, 71 bç
- m.1494C>T → 441 bç

### 3.2.3. m.1095T>C Mutasyon Taraması

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Primerlerin Hazırlanması

m.1095T>C mutasyonunu içeren MTRNR1 gen bölgesi (GenBank: NC\_001807), m.1095T>C mutasyonunun tespiti için literatür referans alınarak liyofilize haldeki mtDNA'daki 917-936 pozisyonuna karşılık gelen *forward* (F) ve mtDNA'daki 1098-1118 pozisyonuna karşılık gelen *reverse* (R) primerler satın alındı (52). Primerler DNaz RNaz içermeyen steril saf su ile çözdürülerek 100 pmol (pikomol)/ $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l'lik ara stoklar olarak hazırlanarak -20°C koşullarında saklandı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3.5.** m.1095T>C Mutasyon Taraması PCR için kullanılan Primer Dizileri (52)

<b>F sentetik oligonükleotid primer dizisi</b>	5'CTCAAGTCAATAGAAGCCGG'3
<b>R sentetik oligonükleotid primer dizisi</b>	5'GGCTGTTGAGGTTTAGGGGT'3

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

m.1095T>C mutasyonunun tespiti için, tüp başına reaksiyon hacmi toplam 30  $\mu$ l olacak şekilde, aşağıda verilen deney koşullarında PCR karışımı hazırlandı.

PCR reaksiyonu	1 rxn ( $\mu$ l)
Buffer 10X	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	2 $\mu$ l
<i>Forward</i> Primer	1 $\mu$ l
<i>Reverse</i> Primer	1 $\mu$ l
Taq DNA Polimeraz	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	19 $\mu$ l

Toplam master mix	28 $\mu$ l
DNA (100 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Toplam hacim:	30 $\mu$ l

### Reaksiyon Koşulları

- 94° C →3 dk
  - 94° C →30 sn
  - 58° C →45 sn
  - 72° C →30 sn
  - 72° C →3 dk
- } 35 döngü

### Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik konsantrasyonda agaroz jeli hazırlarken agarozdan 2 gram tartıldı ve 100 ml 1xTBE tamponu içerisinde çözdürülerek mikrodalga fırın içerisinde maksimum sıcaklıkta kaynatıldı. Daha sonra soğuk suda 50-60°C olana kadar soğutulmuş içerisine 7 µl etidyum bromür (EtBr) eklendi ve elektroforez kasetine tarak yerleştirilerek içerisine agaroz jel döküldü. Yaklaşık 25 dakika jelin soğuyup polimerleşmesi beklendi ve kaset içerisindeki tarak çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

### PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen PCR ürünlerinden 5 µl örnek alınıp, 5 µl yükleme boyası (*orange G*) ile karıştırılarak %2'lik agaroz jeldeki kuyucuklara çökmesi sağlandı, ardından 50 bç'lik DNA belirteç (*ladder*) 2 µl olacak şekilde ilk kuyucuğa yüklendi. Elektroforez tankının elektrotları güç kaynağına takılarak 120V, 130 miliamperde yaklaşık 40 dakika elektroforez edildi. Süre sonunda örnek yüklü jel UV transluminatör yardımı ile kontrol edildi ve m.1095T>C mutasyonu için 201 bç'lik PCR ürünü tespit edildi (Şekil 4.5).

### m.1095T>C Mutasyonu için Restriksiyon Enzim Kesimi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen 201 bç'lik PCR ürünündeki mutasyon analizi bu bölgeye spesifik restriksiyon endonükleaz enzimi olan *HphI* (*New England Bio Labs* ®) kesim enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. *HphI* restriksiyon enzimi ile ampikonun kesilmesi için tanıma dizisi GGTGA(8/7) bölgesidir. Aşağıda verilen

miktarlar ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı. Analiz için her bir reaksiyon tüpü başına 10 ünite *BsmAI* kesim enzimi kullanıldı.

PCR reaksiyonu	1 rxn (µl)
<i>HphI</i> Enzim Buffer 10X	2 µl
<i>HphI</i> Enzimi	1 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl

Toplam master mix 10 µl

PCR ürünü 10 µl

Toplam hacim: 20 µl

Restriksiyon endonükleaz enzimi *HphI* ile PCR ürünlerinin inkübasyon süreleri, enzimin çalıştığı optimum sıcaklık değeri olan 37 °C’de 18 saat olmak üzere etüvde gerçekleştirildi.

#### **m.1095T>C Mutasyonu için RFLP Ürününün Agaroz Jel**

##### **Elektroforezinde Analizi**

m.1095T>C mutasyonu, 201 bç’lik PCR ürününün *HphI* enzimi ile inkübe edilmesinin ardından %3’lük agaroz jel hazırlanarak analiz edildi. %3’lük konsantrasyonda agaroz jeli hazırlarken agarozdan 3 gram tartıldı ve 100 ml 1xTBE tamponu içerisinde çözdürüldü. Mutasyon, *HphI* enzimi ile kesilen bantların boylarına göre tespit edildi (Şekil 4.6).

10 µl RFLP ürünü alınıp, 7 µl yükleme boyası (*orange G*) ile karıştırılarak %3’lük agaroz jelde 120V, 130 miliamperde yaklaşık 40 dakika ve %12’lik poliakrilamid jelde 6 saat olmak üzere elektroforez edildi. Süre sonunda jel UV transluminatör yardımı ile kontrol edildi.

Mutasyon yokluğunda *HphI* enzimi 201 bç’lik ampikonu sırasıyla 143, 31 ve 27 bç boyutlarında üç parçaya böler. m.1095T>C mutasyonunun varlığı ile, timin nükleotidinin 1095. pozisyonunda sitozin nükleotidine dönüşmesi durumunda, *HphI* enziminin ampikonu kesebileceği fazladan bir bölünme bölgesi ortaya çıkar ve 114, 31, 29 ve 27 bç boyutlarında fragmanlar üretilir.

- m.1095T → 143, 31 ve 27 bç
- m.1095T>C → 114, 31, 29 ve 27 bç

#### **3.2.4. Etik Kurul İzni**

Bu tez çalışmasında mutasyon taraması yapılan bireyler, Hacettepe Üniversitesi Biyobanka Onamları alınarak Hacettepe Üniversitesi Nadir Hastalık Biyobankası'nda saklanan örnekler arasından retrospektif olarak seçilmiş, ebeveynlerden ve çocuklardan bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak onay alınmıştır.

Tez araştırması Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulları ve Komisyonları tarafından onaylanarak kabul edilmiştir.

#### **3.2.5. İstatistiksel Analiz**

Tüm veriler SPSS yazılımı (*IBM SPSS Statistics 27.0*) kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin analizinde, çalışmada yer alan hastaların odyoloji sonuçları, aminoglikozit kullanıp kullanmama durumu, cinsiyet, yaş, CFTR mutasyonları, FEV1 değer düşüklüğü, kolonizasyon durumu, nazal polip bulundurup bulundurmama gibi değişkenler değerlendirildi. Kategorik verilerde iki veya daha fazla grup arasında anlamlı bir fark olup olmadığının karşılaştırılmasında ki-kare testleri yapıldı ve istatistiksel anlamlılık değeri  $p<0,05$  olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda yer alan ve mutasyon taraması yapılan bireyler, 2013 yılı ocak ayı - 2023 yılı ocak ayı tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından takip edilen, ter testi ve mutasyon analizi gibi yöntemlerle kistik fibrozis tanısı konulan ve Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından kistik fibrozis olduğu moleküler analizlerle doğrulanan, 3-17 yaşları arasında bulunan 68 kız (%57.1) ve 51 (%42.9) erkekten oluşan 119 hastadan meydana gelmektedir. Çalışma grubunun yaş ortalaması ise 11'dir.

Hastaların odyolojik sonuçları, aminoglikozit kullanıp kullanmama durumu, cinsiyet, yaş, CFTR mutasyonları, FEV1 değer düşüklüğü, enfeksiyon/kolonizasyon durumu, nazal polip bulundurup bulundurmama gibi klinik veriler kaydedilmiştir.

Çalışmamızda yer alan kistik fibrozis tanılı 119 hastanın CFTR mutasyonları: F508del/F508del mutasyonlu ve F508del/heterozigot mutasyonlu 40 kişi (%33.7) ve diğer mutasyonlara sahip 79 kişi (%66.3) olarak tespit edilmiştir. SPSS yazılım analizi sırasında ise F508del/F508del mutasyonlu ve F508del/heterozigot mutasyonlu hastalar ve diğer mutasyonlara sahip hastalar olmak üzere iki grup şeklinde değerlendirilmiştir. Tez çalışmasında bulunan hastalar, geri ödemeleri onaylanmadığı için modülatör tedaviye erişim sağlayamayan pediatrik kistik fibrozis hastalarından oluşmaktadır.

FEV1 değer düşüklüğü kullanılarak hastalar z-skoru  $>-1.645$  ise normal, z-skoru  $-1.65$  ve  $-2.5$  arasında ise hafif, z-skoru  $-2.51$  ve  $-4$  arasında ise orta ve z-skoru  $<-4.1$  ise ağır şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmada bulunan 119 hastanın FEV1 değer düşüklüğü: hastaların 77'si normal (%64.7), 19'u hafif (%15.9), 16'sı orta (%13.4) ve 7'si ağır (%5.8) olarak bulunmuştur. SPSS yazılım analizi sırasında ise normal FEV1 değer düşüklüğüne sahip hastalar ve diğer hastalar (hafif, orta ve ağır) olmak üzere iki grup şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yer alan kistik fibrozis tanılı 119 hasta, bronşektazi bulundurup bulundurmama bakımından değerlendirilmiştir. 119 hastanın 54'ünde (%45.37) bronşektazi görülürken ve kalan 65'inin (%54.62) bronşektazi bulundurmadığı analiz edilmiştir.

Çalışmada yer alan kistik fibrozis tanılı 119 hasta, pankreatik yetmezlik bulundurup bulundurmama bakımından değerlendirilmiştir. 119 hastanın 113'ünde

(%94.9) pankreatik yetmezlik bulunurken, kalan 6'sının (%5.1) pankreatik yetmezlik bulundurmadığı analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında kontrol grubunu inhaler veya intravenöz (IV) aminoglikozit (AG) kullanım öyküsü bulunmayan 22 kişiden (%18.4) oluşan hasta grubu oluşturmaktadır.

119 hastanın 28'inde (%23.5) nazal polip gözlemlenirken 91'inde (%76.4) rastlanmamıştır.

KBB muayeneleri gerçekleştirilen çocuklara sırasıyla yapılan işitme testleri: işitme seviyesi (dB-ISO-1964), frekanslar (Hz), saf ses ortalaması (dB-SSO), konuşmayı anlama eşiği (dB-KAE), konuşmayı fark etme eşiği (dB-KFE), konuşmayı ayırt etme (%), tedirgin edici ses yüksekliği (dB) ve timpanometridir.

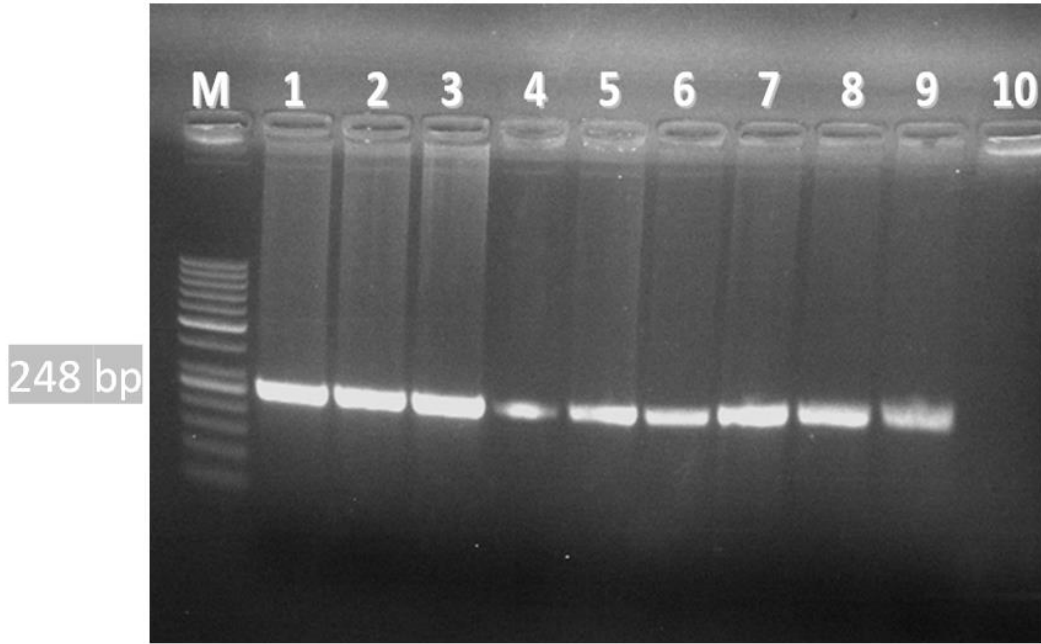
Sensörinöral işitme kaybı şu şekilde sınıflandırıldı: yok (0-15 dBHL), minimal (16-25 dBHL), hafif (26-40 dBHL), orta (41-60 dBHL), şiddetli (61-90 dBHL) ve derin (91 dBHL'den yüksek)

Çalışmaya katılan 119 hastanın 13'ünde (%10.9) sensörinöral işitme kaybı tespit edildi. 106 hastanın (%89.0) işitme testi sonucu normaldi.

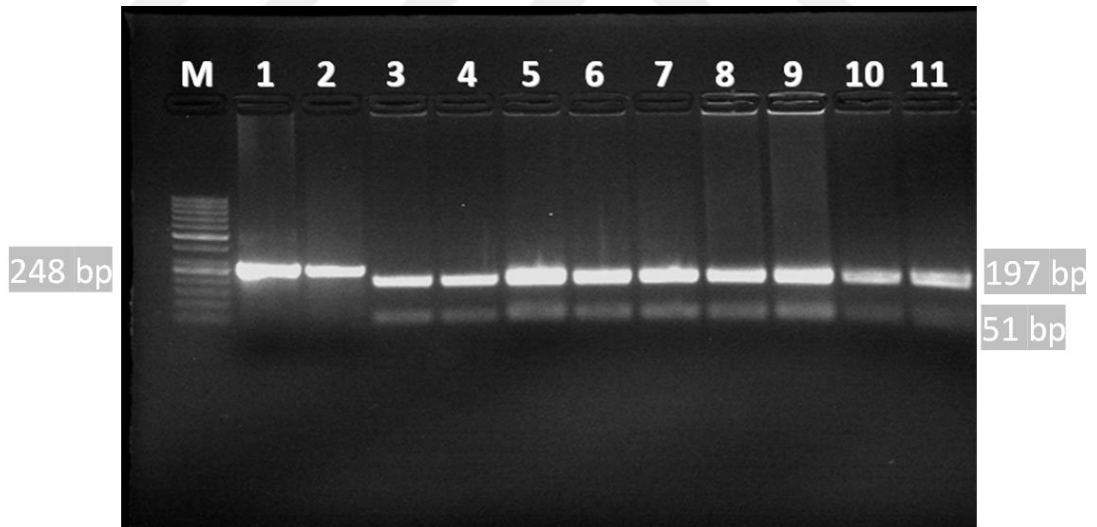
Çalışmada, hastaların aminoglikozit kullanım öyküsüne göre iki grup belirlendi: inhaler veya intravenöz (IV) AG tedavisi alanlar ve hiç AG tedavisi almayanlar.

119 hastanın 97'sinde (%81.5) AG alma öyküsü vardı. 97 hastanın 32'si (%26.8) intravenöz, 20'si (%16.8) inhaler ve 45'i (%37.8) intravenöz ve inhaler aminoglikozit kullanma öyküsü olduğu bilinmektedir. 22 hasta (%18.4) AG kullanım öyküsü olmayan hastalardı. AG alan 97 hastanın 13'ünde (%13.4) sensörinöral işitme kaybı ve bu hastaların 5'inde yüksek frekanslı işitme kaybı (> 91 dB) vardı.

1. Tez çalışmasında 119 kistik fibrozis hastasının MTRNR1 geni **m.1555A>G** mutasyon bölgesi PCR-RFLP yöntemi ile mutasyon açısından taranmış ve hiçbir hastada mutasyon saptanmamıştır.

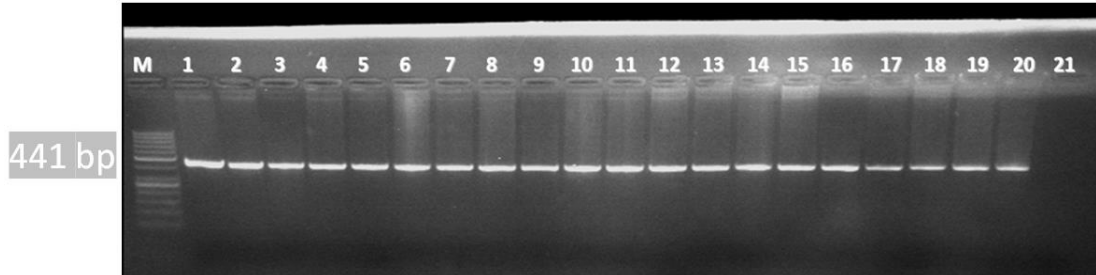


**Şekil 4.1.** MTRNR1 geni m.1555A>G mutasyon bölgesini içeren 248 bç PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 50 bç marker, 2-9: 248 bç PCR ürünü, 10: Negatif kontrol (NTC).

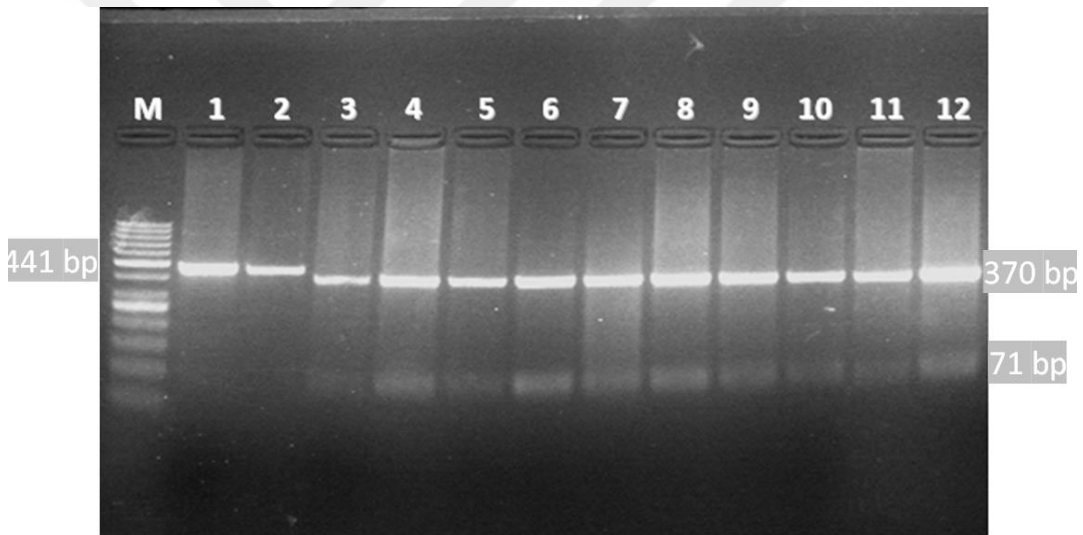


**Şekil 4.2.** MTRNR1 geni m.1555A>G mutasyonu *BsmAI* restriksiyon endonükleaz ile PCR-RFLP sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 50 bç marker, 1: *BsmAI* enzimi ile inkübe edilmemiş undigest PCR ürünü, 2: m.1555A>G mutasyonu taşıyan 248 bç'de gözlemlenen kontrol DNA'sı, 2-11: mutasyon taşımayan 197 bç ve 51 bç'de gözlemlenen hasta DNA'larının PCR-RFLP sonuçları.

2. Tez çalışmasında 119 kistik fibrozis hastasının MTRNR1 geni **m.1494C>T** mutasyon bölgesi PCR-RFLP yöntemi ile mutasyon açısından taranmış ve hiçbir hastada mutasyon saptanmamıştır.

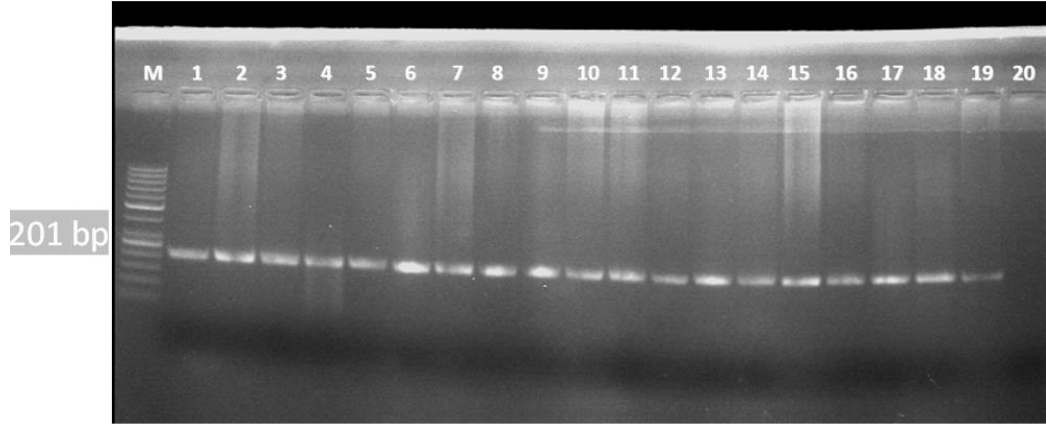


**Şekil 4.3.** MTRNR1 geni m.1494C>T mutasyon bölgesini içeren 441 bç PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 50 bç marker, 1-20: 441 bç PCR ürünü, 21: Negatif kontrol (NTC).

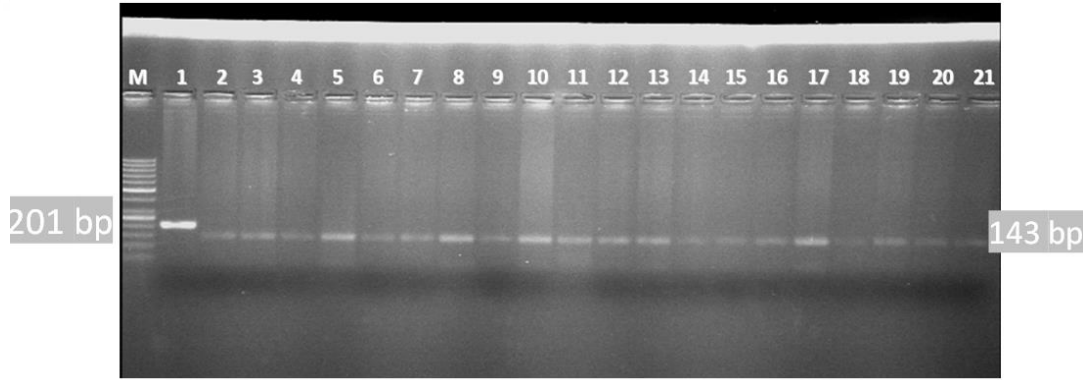


**Şekil 4.4.** MTRNR1 geni m.1494C>T mutasyonu *HphI* restriksiyon endonükleaz ile PCR-RFLP sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 50 bç marker, 1: *HphI* enzimi ile inkübe edilmemiş 441 bç undigest PCR ürünü, 2: m.1494C>T mutasyonu taşıyan 441 bç'de gözlemlenen kontrol DNA'sı PCR-RFLP sonucu, 3-12: mutasyon taşımayan 370 bç ve 71 bç'de gözlemlenen hasta DNA'larının PCR-RFLP sonuçları.

3. Tez çalışmasında 119 kistik fibrozis hastasının MTRNR1 geni **m.1095T>C** mutasyon bölgesi PCR-RFLP yöntemi ile mutasyon açısından taranmış ve hiçbir hastada mutasyon saptanmamıştır.



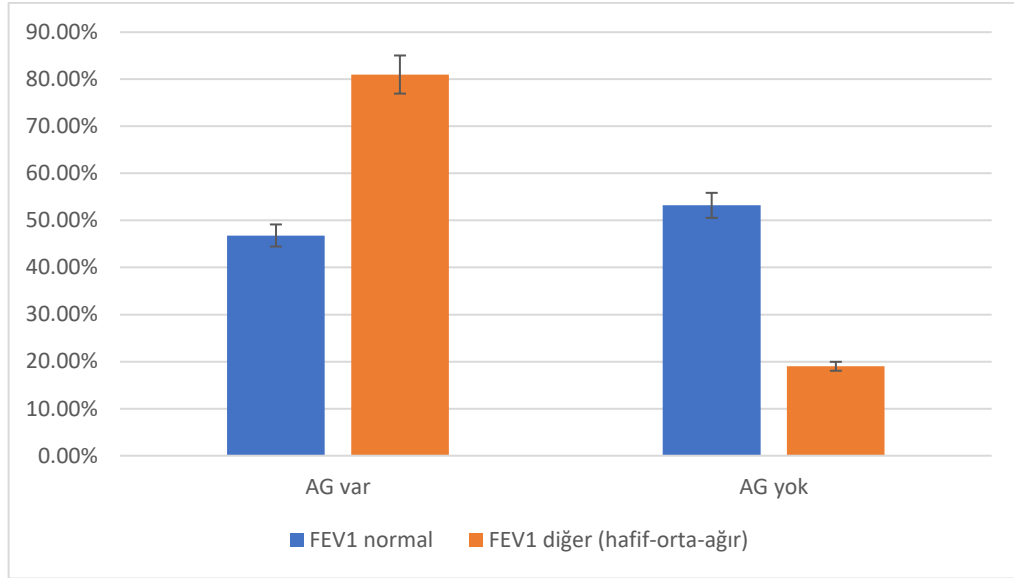
**Şekil 4.5** MTRNR1 geni m.1095T>C mutasyon bölgesini içeren 201 bç PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 50 bç marker, 1-19: 201 bç PCR ürünleri, 20: Negatif kontrol (NTC).



**Şekil 4.6.** MTRNR1 geni m.1095T>C mutasyonu *HphI* restriksiyon endonükleaz ile PCR-RFLP sonucunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 50 bç marker, 1: *HphI* enzimi ile inkübe edilmemiş 201 bç undigest PCR ürünü, 1-21: mutasyon taşımayan 143 bç, 31 ve 27 bç'de gözlemlenen hasta DNA'larının PCR-RFLP sonuçları. (31 bç ve 27 bç jelde görünmemektedir.)

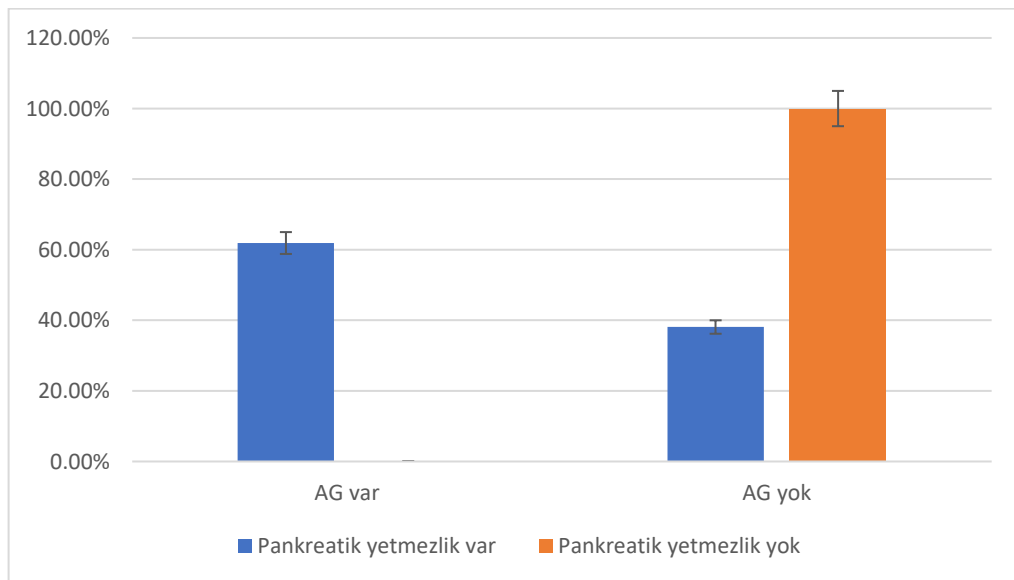
Aminoglikozit alan işitme kaybı olan 13 hasta da dahil olmak üzere 119 pediatrik kistik fibrozis hastası m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonları açısından tarandı ve hiçbir hastada mutasyon saptanmadı.

4. Çalışmamızdaki 119 hasta, FEV1 değer düşüklüğü ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %81'inin hafif-orta-ağır FEV1 değer düşüklüğüne sahip olduğu istatistiksel olarak  $p=0,001$  değeri ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** 119 hastanın FEV1 değer düşüklüğü ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarının istatistiksel analiz grafikleri.

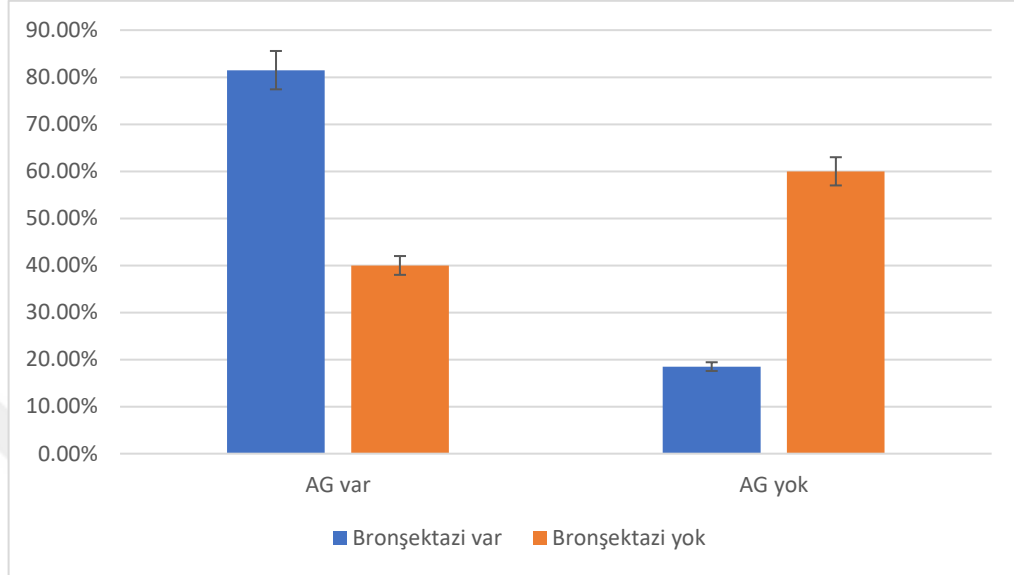
5. Çalışmamızdaki 119 hasta, pankreatik yetmezlik ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %61,9’unda pankreatik yetmezlik olduğu istatistiksel olarak  $p=0,004$  değeri ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** 119 hastanın pankreatik yetmezlik ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarının istatistiksel analiz grafikleri.

6. Çalışmamızdaki 119 hasta, bronşektazi bulundurup bulundurmama ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarına göre

değerlendirilmiş ve aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %81,5'inde bronşektazi görüldüğü istatistiksel olarak  $p=0,001$  değeri ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** 119 hastanın bronşektazi bulundurup bulundurmama ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarının istatistiksel analiz grafikleri.

## 5. TARTIŞMA

Kistik fibrozis (OMIM 219700); genellikle beyaz ırkta görülen, *kistik fibrozis transmembran regülatör* (CFTR) genindeki mutasyonların sebep olduğu otozomal resesif kalıtılan genetik bir hastalıktır (1).

Kistik fibrozis hastalığının görülme sıklığı farklı popülasyonlarda değişkenlik göstermekle beraber, 3.500 kişide 1 olmak üzere en sık Kuzey Amerika'da ve 2.000-4.500 kişide 1 olmak üzere Avrupa'da görülmektedir. Genetik açıdan oldukça heterojen olan ülkemizde ise kistik fibrozis hastalığının görülme sıklığı her 3.000 doğumda 1'dir (3). Özellikle akciğerlerde meydana gelen fonksiyonel bozukluklarla ilişkilendirilen fakat aslında multisistemik bir hastalık olan kistik fibroziste akciğerler dışında; pankreas, kalp, böbrek, bağırsak, üreme sistemi, ter bezleri, karaciğer gibi farklı doku ve organlar da etkilenmektedir (3).

CFTR proteini, sağlıklı bireylerde epitel hücrelerin klor ve bikarbonat iyon sekresyonunda görevlidir ve epitellerde, hücre içi ve hücre dışında bulunan iyonların dengesinin korunmasında önemli rol oynar.

Akciğerlerde yer alan ve sil hareketi sayesinde klorür iyonlarının hücre içine alınıp suyun hücrelerden atılmasını sağlayan silli epitel hücreler, bu sayede hücre dışı matriste bulunan mukozanın da patojenler ile vücuttan atımını sağlar (4). Fakat kistik fibrozis hastalarında CFTR proteininin yapısında meydana gelen mutasyonlar sebebiyle, silli epitel hücreler görevini yerine getiremez ve klorür iyonlarının hücre içinde kalması, suyun hücre dışına atılmasını engelleyerek hücre içi ve dışı iyon dengesinin bozulmasına yol açar. İyon geçişindeki bu bozulma ile su Emilimi artar, solunum yolundaki sıvının azalmasıyla ise mukus daha katı bir hal almaktadır. Mukusun daha katı bir hal almasıyla silyalar temizleme işlemini gerçekleştiremez ve mukosilyer klirens olarak tanımlanan mukusun solunum yolundaki mikroorganizma ve bakterilerden temizlenme mekanizması da bozulur (3,4).

Solunum yolunda mukus birikimi kistik fibrozis hastalarında nefes almayı güçleştirmektedir. Hastalık ilerledikçe hava yolu tıkanmakta ve nefes alışverişi daha da zorlaşmaktadır. Mukosilyer klirens mekanizmasının bozulması epitel hücreleri enfeksiyona açık hale getirir ve bakterilerin hava yollarına yerleşmesine uygun ortam sağlanmasıyla hastalarda inflamasyon gelişimine sebep olur (4).

Kistik fibrozis hastalarında inflamasyon gelişimine ve kronik akciğer enfeksiyonuna yol açan başlıca bakteriler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* bakterileridir, bununla birlikte *Aspergillus fumigatus* hastalarda alerjik reaksiyonlara, sinüzit ve nazal polip oluşumuna sebebiyet verebilmektedir.

Günümüzde CFTR geninde çeşitli veritabanlarında (<https://www.CFTR2.org> , <http://genet.sickkids.on.ca/app>) 2114 mutasyon tanımlanmıştır. CFTR protein varyantları <https://www.CFTR2.org> veritabanına göre listenmiş ve kistik fibrozise neden olan 719, değişken klinik sonuçlara göre değişen 49, kistik fibrozise neden olmayan 25 ve bilinmeyen 11 varyant tanımlanmıştır (9).

CFTR gen mutasyonları, mutasyon sınıflarına göre gruplandırıldığında, *Cystic Fibrosis Mutation* veritabanına (<http://genet.sickkids.on.ca/app>) göre en çok rastlanan ve 816 adet olan yanlış anlamlı mutasyon (missense) tipidir. İkinci sırada 342 adet olarak çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları görülürken, üçüncü sırada ise 231 adet olmak üzere uç birleştirme mekanizması (*splicing*) mutasyon tipi yer alır. Devamında yer alan mutasyon tipleri ise anlamsız (*nonsense*), insersiyonlar, delesyonlar ve CFTR'in kodlanmayan bölgesi olan promotör mutasyonlarıdır (10).

Kuzey Avrupa ve Amerika'da %70-80, ülkemizde ise %28,06 oranıyla en sık görülen mutasyon, üç nükleotitlik bir delesyon olan F508del mutasyonudur (11).

CFTR protein mutasyonları; CFTR sentezinden, proteinin katlanması, epitel hücre membranına taşınması, membrana yerleşmesi ve doğru fonksiyon göstermesi gibi çeşitli basamaklarda meydana gelebilecek hatalara göre 7 sınıf altında toplanmaktadır (8).

Kistik fibrozis hastalarında, CFTR sentezinden, proteinin katlanması, epitel hücre membranına taşınması, membrana yerleşmesi ve doğru fonksiyon göstermesi gibi çeşitli basamaklarda meydana gelebilen CFTR protein hatalarına göre kullanılan düzeltici tedaviler (*corrective therapy*), *read-through* bileşikler, Lumacaftor ve Tezacaftor düzelticileri (*correctors*), yükselticiler (*amplifiers*), Ivacaftor güçlendiricileri (*potentiators*) gibi modülatör ilaçların dışında hastaların tedavisinin temel parçalarından biri de antibiyotiklerdir.

Kistik fibrozis hastalarında CFTR proteininin yapısında meydana gelen mutasyonlar sebebiyle, silli epitel hücreler görevini yerine getiremez ve klorür iyonlarının hücre içinde kalması, suyun hücre dışına atılmasını engelleyerek hücre içi

ve dışı iyon dengesinin bozulmasına yol açar (4). İyon geçişindeki bu bozulma ile su emilimi artar, solunum yolundaki sıvının azalmasıyla ise mukus daha katı bir hal almaktadır. Mukusun daha katı bir hal almasıyla silyalar temizleme işlemini gerçekleştiremez ve mukosilyer klirens olarak tanımlanan mukusun solunum yolundaki mikroorganizma ve bakterilerden temizlenme mekanizması da bozulur (3,4).

Solunum yolunda mukus birikimi kistik fibrozis hastalarında nefes almayı güçleştirmektedir. Hastalık ilerledikçe hava yolu tıkanmakta ve nefes alışverişi daha da zorlaşmaktadır. Mukosilyer klirens mekanizmasının bozulması epitel hücreleri enfeksiyona açık hale getirir ve bakterilerin hava yollarına yerleşmesine uygun ortam sağlanmasıyla hastalarda inflamasyon gelişimine sebep olur (4).

Kistik fibrozis'te tedavinin temel parçasından biri olan antibiyotikler, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakterilerin solunum yolunda kolonize olmasıyla meydana gelen enfeksiyonlarda ve hastalarda meydana gelen akut pulmoner alevlenme tedavisinde genellikle kullanılır (13).

Başlıca hedefi solunum yolunu enfeksiyonlardan arındırmak olan antibiyotik tedavisi kistik fibrozis hastalarına dört genel endikasyonla verilmektedir. Bunlardan ilki: hastadaki akciğer akut alevlenmenin tedavi edilmesi, ikincisi: belli bir mikroorganizmadan dolayı gelişen enfeksiyonun önlenmesi, üçüncüsü: mikroorganizmaların enfeksiyonun erken aşamalarında yok edilmesi ve sonuncusu solunum yolunda kronik bulunan mikroorganizmaların üremesinin inhibe edilmesidir (13,14).

Kistik fibrozis tedavisinde amikasin, tobramisin, kanamisin gibi aminoglikozit antibiyotikler hastalarda yaygın olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Hastaya başlanacak tedavide antibiyotik seçimi yapılırken, hastada akut pulmoner alevlenme ve kronik kolonizasyon varsa hastadan balgam örneği alınarak kültürde üreyen mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığı analiz edilir (14).

Kistik fibrozis hastalarında, *Pseudomonas aeruginosa* kolonizasyonu ile gelişen enfeksiyon tedavisinde yaygın kullanılan yöntemlerden biri bakteriyi yok etmek için sinerjistik etki yaratmak amacıyla ikili antibiyotik kullanımınıdır (14).

Antibiyotiklerin bakterilere etki mekanizması bakteri gelişiminin durdurulmasını hedefleyen bakteriyostatik ve bakterinin öldürülmesini hedefleyen

bakterisidal etki olmak üzere iki şekildedir. Bakteri hücrelerinin içerisine girerek inaktif forma dönüşmeden ve metabolize edilmeden bakteri hücrelerinin inhibisyonunu hedefleyen antibiyotikler; bakterinin hücre membranını, hücre duvarını veya protein sentezi ve replikasyon gibi çeşitli fonksiyonlarını engelleyerek bakteriye etki etmeyi hedefler. (22, 23). Aminoglikozit antibiyotikler bakterinin 30S ribozomal alt biriminin 16S ribozomal RNA'sına bağlanıp bakteriyel kod okuma hatalarına neden olarak bakteriyel protein sentezinin engellenmesi yoluyla bakteriye etki etmekte ve bakteriyel ölüme neden olmaktadır (24).

Ototoksisite ise kullanılan bir ilaç veya kimyasalın iç kulakta fonksiyon bozukluğu ve hasara neden olması şeklinde tanımlanmakta ve sendromik olmayan, sensörinöral tip işitme kaybı olarak sınıflandırılmaktadır (27). Sensörinöral işitme kaybı ise yok (0– 15 dBHL), minimal (16-25 dBHL), hafif (26-40 dBHL), orta (41-60 dBHL), şiddetli (61-90 dBHL) ve derin (91 dBHL'den yüksek) olarak sınıflandırılmaktadır (28).

*Pseudomonas* enfeksiyonu bulunan kistik fibrozis hastalarının tedavisinde inhaler veya intravenöz olarak kürler halinde uygulanan aminoglikozitler, geniş spektrumlu olması, kişilerde nadiren alerjik reaksiyonlara sebep olması, direnç gösteren enfeksiyonlarda oldukça etkili olması gibi nedenlerle sıklıkla kullanılmaktadır (14).

Aminoglikozit tedavisinin kistik fibrozis hastaları üzerinde hayat kalitesini artırdığı, atak sıklığını azalttığı ve akciğer fonksiyonlarında iyileşmeler sağladığı belirlense de anti-pseudomonal etkili bu antibiyotiklerin en büyük dezavantajı kişilerde ototoksisiteye neden olmasıdır. Streptomisin ve gentamisin dışındaki aminoglikozitlerin neden olduğu ototoksisite oranı %33 olarak bilinmekte ve genellikle işitme kaybı ile beraber baş dönmesi de bu bulgulara eşlik etmektedir (29).

Aminoglikozit antibiyotik kullanımı sonucu karşılaşılan ototoksisite sıklığı yetişkinlerde %2-45 ve yeni doğanlarda %0-2 olarak bilinmekte ve hastalarda ototoksisitenin kabul edilmesi için aminoglikozit kullanım sonrasında kişilerde 10 desibellik (dB) işitme kaybı beklenmektedir (30).

Mitokondrinin bakterilerden türediği ‘‘endosimbiyotik teori’’ ökaryotlar tarafından bakterilerin hücre içine alınmasıyla, konakçı ile simbiyotik bir ilişki kurulduğu ve bu süreç boyunca evrimleşerek mitokondriyi oluşturduğu teoridir, bu

nedenle ökaryotik mitokondriyal ribozomların prokaryot 70S ribozomlarına daha benzer olduğu tespit edilmiştir (23, 24).

MTRNR1 gen mutasyonları, 12S rRNA'nın ikincil yapısını değiştirip bakteriye benzer hale getirerek aminoglikozitlere daha duyarlı hale getirir ve aminoglikozitler 16S rRNA bakteri ribozomal RNA'sını hedefledikleri gibi, insan 12S rRNA'sını hedefleyip kolayca bağlanır ve insan mitokondriyal protein sentezinde hatalara neden olur (22, 24).

Mitokondriyal DNA'da MTRNR1 (12S ribozomal RNA) geninde bulunan m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının aminoglikozit ilişkili ototoksiste riskini artırdığı bilinmektedir.

Aminoglikozit antibiyotiklerin iç kulakta reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğu bu mekanizmayı anlamak, hastalarda işitme kaybının önlenmesi ve yeni terapötik tedavilerin geliştirilmesi için yarar sağlayacaktır.

Mutant kopyaların %20'sinden azını taşıyan heteroplazmik hastalarda mutasyonun işitme kaybına neden olmadığı ve bu hastaların asemptomatik veya hafif işitme kaybına sahip olduğu bilinmektedir. %52'den fazla mutant kopya sayısına sahip heteroplazmik hastalarda ise bu durum, orta ile şiddetli işitme kaybı ile ortaya çıkmaktadır (34).

Mutasyon varlığında insan MTRNR1 gen yapısında bir aminoglikozit bağlanma bölgesi oluşmasıyla, mitokondriyal protein sentezi azalır, serbest radikal oluşumu ve ardından hücrenin ölümü gerçekleşir (35). Bunun sonucunda aminoglikozitler tarafından indüklenen işitme kaybı gözlenmektedir. Aminoglikozit maruziyetiyle ilişkili işitme kaybı, tek bir dozdan sonra bile ortaya çıkabildiği gibi; bilateral, geri dönüşümsüz veya koklear implantasyon gerektirebilecek kadar şiddetli olarak ortaya çıkabilmektedir (36).

MTRNR1 geni, insan mitokondriyal 12S rRNA'sını kodlamaktadır. Özellikle, 12S rRNA geninin farklı popülasyonlarda aminoglikozit kaynaklı sendromik olmayan sensörinöral işitme kaybında hot spot bir gen olduğu bulunmuştur (40,41,42). MTRNR1 gen mutasyonları anneden aktarılarak maternal kalıtım ile işitme kaybına neden olabileceği gibi, işitme kaybı öyküsü bulunmayan bir ailelerde de karşımıza çıkabilmektedir.

MTRNR1 genindeki m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonları, aminoglikozit kaynaklı ototoksosite ile ilişkili en yaygın üç mutasyondur. MTRNR1 geninde en sık rastlanan ve işitme kaybına yol açan mutasyon m.1555A>G mutasyonudur ve klinik tedavilerde, hastalarda aminoglikozit antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilmesi nedeniyle oldukça önem arz etmektedir. m.1555A>G mutasyonundan sonra, daha nadir rastlanan m.1491C>T mutasyonu ise yine aminoglikozit kaynaklı işitme kaybıyla ilişkili bulunmuştur. Bu iki mutasyon dışında ise m.1095T>C mutasyonu diğerlerine kıyasla en nadir rastlanan aminoglikozit ototoksitesiyile ilişkili mutasyondur ve esas olarak mitokondriyal ribozomların küçük alt birimlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır.

m.1555A>G mutasyonu, aminoglikozit kaynaklı işitme kaybında en yaygın görülen (%0.8) mitokondriyal 12S rRNA mutasyonudur ve homoplazmik m.1555A>G mutasyonunun dünya çapında sendromik olmayan birçok işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir (43).

m.1555A>G mutasyonundan sonra en sık görülen ikinci mutasyon (%0.64-7) mitokondriyal 12S rRNA geni m.1494C>T mutasyonudur (44). Mitokondriyal 12S rRNA'da *helix* 44'te yer alan ve 1494. pozisyonda bulunan nükleotit yüksek oranda korunmuştur ve 1555. pozisyona karşılık gelmektedir. İnsan mitokondrisinde yabancı tipte 1555 pozisyonundaki nükleotit yüksek oranda korunmuş A'dır. (*E. coli* 16S rRNA'da 1491. pozisyona karşılık gelir) (43,45). Bunun 1494. pozisyonda bulunan C ile eşleşmesi beklenir fakat mutasyon sonucu G'ye dönüşür ve 12S rRNA'nın ikincil yapısını *E.coli* 16S rRNA'ya karşılık gelen bölgesine daha benzer hale getirir ve bakterilerde olduğu gibi bir aminoglikozit bağlanma bölgeleri oluşur (43,46). Böylece m.1555A>G ve m.1494C>T mutasyonu, 12S rRNA'nın ikincil yapısını değiştirip bakteriye benzer hale getirerek aminoglikozitlere daha duyarlı hale getirir ve aminoglikozitler 16S rRNA bakteri ribozomal RNA'sını hedefledikleri gibi, insan 12S rRNA'sını hedefleyip kolayca bağlanır ve insan mitokondriyal protein sentezinde hatalara neden olur (45,46) (Şekil 2).

MTRNR1 (12S rRNA) genindeki m.1095T>C mutasyonu, m.1555A>G ve m.1494C>T mutasyonlarından sonra en sık görülen üçüncü (%0.6) mutasyondur. 12S rRNA'nın evrensel olarak korunan mitokondriyal ribozomun peptidil bölgesinde, 25. *loop (helix)*'ta meydana gelmektedir. Bu nedenle m.1095T>C mutasyonu ile birlikte

korunmuş *loop* yapısının konfigürasyonunda meydana gelen değişimler sonucunda translasyon sırasında aminoasitlerin aminoasit bağlanma bölgesinden peptidil bağlanma bölgesine transloke olamadığı bilinmektedir. Mitokondriyal protein sentezinin bozulduğu ve sitokrom c oksidaz aktivitesinde önemli bir azalmanın olduğu literatürde belirtilmiştir (47). m.1095T>C mutasyonu olan bireylerde, kontrol grubuna oranla apoptotik hücre sayısında on kat artış olduğu böylece bu mutasyonun patojenik bir mutasyon olduğu bulunmuştur.

Yapılan araştırmalar ile m.1555A>G mutasyon varlığının işitme kaybına neden olan bir faktör olduğu bilinse de m.1555A>G ile m.1095T>C mutasyonunun co-segregasyonunun görüldüğü bireylerde işitme kaybının daha da şiddetlendiği belirtilmektedir (48).

Conrad ve arkadaşları tarafından MTRNR1 geni m.1555A>G mutasyon sıklığı, 157 kişiden oluşan erişkin kistik fibrozis hasta grubunda %1.3 (2/157) olarak bildirilmiştir (41). Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan *Mayo Clinic*'te yapılan başka bir çalışmada ise bu mutasyon, 154 pediatrik kistik fibrozis hasta grubunda 2 kişide tespit edilerek mutasyon sıklığı %1.3 olarak belirlenmiştir (49). İngiltere'de UCL Çocuk Sağlığı Enstitüsü'nde 66 kişiden oluşan pediatrik kistik fibrozis hastalarında ise bu mutasyon %3 (2/66) bulunmuştur (50).

Daha nadir m.1494C>T mutasyonu ise sendromik olmayan işitme kaybına sahip 157 kişiden oluşan Amerika'daki kistik fibrozis hasta grubunda 1 kişide bu mutasyona rastlanmasıyla sıklık %0.6 olarak belirlenmiştir.(41) Sendromik olmayan işitme kaybına sahip 3133 kişiden oluşan Çin popülasyonunda 13 kişide bu mutasyona rastlanmasıyla sıklık %0.41 olarak belirlenmiştir (51).

m.1095T>C mutasyonu ise Çin'de yapılan çalışmada 449 kontrolde 1 kişide görülmesiyle sıklık %0.2, işitme kaybı olan 1642 hastada 10 görülmesiyle sıklığı %0.6 olarak belirtilmiştir (52). İtalya'da ise sendromik olmayan işitme kaybına sahip 80 hasta ile yapılan bir çalışmada, m.1095T>C mutasyon sıklığı 1/80 olarak analiz edilmiştir (53).

Aminoglikozit antibiyotik kullanımına bağlı ototoksisitenin ortaya çıkmasına rağmen MTRNR1 gen mutasyon taramaları ülkemizde rutin olarak yapılmamaktadır. Aminoglikozit kullanmadan önce kistik fibrozis hastalarında mutasyon taramalarının

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu ile birlikte oluşturulan Kistik Fibrozis Yenidoğan Tarama Testi ile Tanı Alan Hastaları İzleme Rehberi'nde (<https://hsgm.saglik.gov.tr>) yer alması planlanmaktadır.

Tez çalışmasında, aminoglikozit antibiyotik kullanan ve işitme kaybı olan 13 hasta dahil olmak üzere 119 pediatrik kistik fibrozis hastası m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonları açısından tarandı ve hiçbir hastada mutasyon saptanmadı.

Çalışmamızdaki 119 hasta, FEV1 değer düşüklüğü ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %81'inin hafif-orta-ağır FEV1 değer düşüklüğüne sahip olduğu istatistiksel olarak  $p=0,001$  değeri ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.7).

Çalışmamızdaki 119 hasta, pankreatik yetmezlik ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %61,9'unda pankreatik yetmezlik olduğu istatistiksel olarak  $p=0,004$  değeri ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.8).

Çalışmamızdaki 119 hasta, bronşektazi bulundurup bulundurmama ve aminoglikozit antibiyotik kullanıp kullanmama durumlarına göre değerlendirilmiş ve aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %81,5'inde bronşektazi görüldüğü istatistiksel olarak  $p=0,001$  değeri ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.9).

Mutasyon sıklıklarının az görülmesine rağmen *The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*, (<https://www.acmg.net/>) rehberine göre, aminoglikozitlere maruz kalan risk altındaki bireyler için rutin MTRNR1 m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının genetik taraması önerilmektedir (47). Ayrıca yakın zamanda güncellenen *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC®)*, MTRNR1 genotip bazlı aminoglikozit kullanımına ilişkin terapötik öneriler sunmaktadır (54). Bu nedenle hastalara aminoglikozit verilmeden önce hastaların mutasyonlar açısından taranması önem taşımaktadır (55). Aynı zamanda hastaların tedavilerinde ototoksisitesi düşük netilmisin gibi aminoglikozitler kullanılabilir veya ototoksisiteyi azaltmak amacıyla yeni alternatif ilaçlar geliştirilebilir.

Bu tez çalışmasında, kistik fibrozis hastalarında aminoglikozit ototoksisitesi ile ilişkili mutasyonların yer aldığı MTRNR1 geninde en sık görülen ve patoloji ile ilişkili

oldukları fonksiyonel deneylerle kanıtlanmış m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının sıklığını araştırmayı amaçladık.

Mutasyon sıklıkları ile aminoglikozit kullanım doz/sıklıkları, işitme kaybı parametrelerinin birlikte değerlendirilmesi ile kistik fibrozis hastalarında kişiye özgü tedavi yaklaşımı geliştirilmiş olacaktır.

Aminoglikozit antibiyotiklerin kistik fibrozis hastalarında yan etki olarak neden olduğu işitme kaybı, göz ardı edilmemeli ve ototoksisitenin önlenmesi için yeni terapötik ve alternatif tedaviler geliştirilmelidir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### Sonuçlar

1. Aminoglikozit alan sensörinöral işitme kaybı olan 13 hasta da dahil olmak üzere 119 pediatrik kistik fibrozis hastası m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonları açısından tarandı ve hiçbir hastada mutasyon saptanmadı.
2. Çalışmamızda yer alan 119 kistik fibrozis hastası FEV1 değer düşüklüğü ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak  $p=0,001$  değeri ile anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %81'i hafif-orta-ağır FEV1 değer düşüklüğüne sahip olduğu analiz edilmiştir.
3. Çalışmamızda yer alan 119 kistik fibrozis hastası pankreatik yetmezlik ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak  $p=0,004$  değeri ile anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %61,9'unda pankreatik yetmezlik olduğu analiz edilmiştir.
4. Çalışmamızda yer alan 119 kistik fibrozis hastası bronşektazi ve aminoglikozit antibiyotik kullanma durumlarına göre değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak  $p=0,001$  değeri ile anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Aminoglikozit antibiyotik kullanan hastaların %81,5'inde bronşektazi görüldüğü analiz edilmiştir.

### Öneriler

1. Kistik fibrozis hastalarına aminoglikozit antibiyotik verilmeden önce hastaların mutasyonlar açısından taranması oldukça önem taşımaktadır.
2. Kistik fibrozis hastalarının tedavilerinde ototoksisitesi düşük netilmisin gibi aminoglikozitler kullanılabilir veya ototoksisiteyi azaltmak amacıyla yeni alternatif ilaçlar geliştirilebilir.
3. Aminoglikozit antibiyotik kullanımına bağlı ototoksisitenin ortaya çıkmasına rağmen MTRNR1 gen mutasyon taramaları ülkemizde rutin olarak yapılmamaktadır, bu nedenle aminoglikozit kullanmadan önce kistik fibrozis

hastalarında mutasyon taramalarının T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu ile birlikte oluşturulan Kistik Fibrozis Yenidoğan Tarama Testi ile Tanı Alan Hastaları İzleme Rehberi'nde (<https://hsgm.saglik.gov.tr>) yer alması planlanmaktadır.

4. Tüm kistik fibrozis hastaları özellikle işitme kaybı ile ilgili semptomların varlığında, kulak burun boğaz ve odyoloji uzmanı tarafından oldukça kapsamlı bir şekilde muayene edilmeli ve kistik fibrozis hastalarının ototoksisitesinin erken tespitinde esas olan odyolojik tetkiklerini düzenli aralıklarla gerçekleştirmeli ve hastalar yakından izlenmelidir.
5. Aminoglikozit tedavisi alması gereken bir hastanın ailesinde doğuştan veya sonradan ortaya çıkmış işitme kaybı öyküsü olup olmadığı öğrenilmeli, öyküsünde bulunmasa bile bireylerde ototoksisite için yatkınlığa neden olabilecek m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonlarının analizi sağlanmalıdır.
6. 119 kişilik hasta grubunda tespit edilemeyen m.1555A>G, m.1494C>T ve m.1095T>C mutasyonları, çalışma grubuna daha fazla hastanın dahil edilmesiyle yeniden değerlendirilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Cutting, G. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.* 2015; 16, 45–56.
2. Radlović N. Cystic fibrosis. *Srp Arh Celok Lek.* 2012 Mar-Apr;140(3-4):244-9.
3. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998 Apr;132(4):589-95.
4. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2017.2016 Annual Data Report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Found.
5. Brooke JS. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Jan;25(1):2-41.
6. Rey MM, Bonk MP, Hadjiliadis D. Cystic Fibrosis: Emerging Understanding and Therapies. *Annu Rev Med.* 2019 Jan 27;70:197-210.
7. Robert J. Mason, Arthur Slutsky, John F. Murray, Jay A. Nadel, Michael B. Gotway. Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book. *Elsevier Health Sciences.* 2015 Mar 17; p. 2208.
8. Ahner A, Gong X, Frizzell RA. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation: cross-talk between the ubiquitylation and SUMOylation pathways. *FEBS J.* 2013 Sep;280(18):4430-8.
9. Clinical and Functional Translation of CFTR Erişim Adresi: <https://www.cftr2.org>
10. Cystic Fibrosis Mutation Database. Erişim adresi: <http://www.genet.sickkids.on.ca/>
11. Erden- Dayangac D, Eskici, N, Esref S, Ozcelik U, Günes-Yalcin E, Doğru-Ersoz D ve ark. Molecular genetic analysis of CFTR gene in 952 Turkish cystic fibrosis patients and identification of novel mutations: 25 years experience. *FEBS OPEN BIO.* 2018;8(Suppl.1):382-83.
12. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016 Aug;4(8):662-674.
13. Eberl L, Tümmler B. Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol.* 2004 Sep;294(2-3):123-31.
14. Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi. *Turk Thorac J.* 2011;12(2):1-140.
15. W Flint P. Vestibular and Auditory Ototoxicity. In: J.Brenner LPRaM, editor. Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery, Sixth Edition. 1. *Sixth ed. Canad: Elsevier Saunders;* 2010. p. 2369-84.
16. Arya DP, Coffee RL Jr, Willis B, Abramovitch AI. Aminoglycoside-nucleic acid interactions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin. *J Am Chem Soc.* 2001 Jun 13;123(23):5385-95.

17. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ve ark. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. *Nobel Tıp Kitabevleri*. 2008;3:1137.
18. Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 1998 May;10(2):95-105.
19. Aktuğlu, Y, Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. Pratikte Antibiyotik Kullanımı. *Sempozyum Dizisi Yayın No: 1*. 1997; s;11–53.
20. Chen Y, Huang WG, Zha DJ, Qiu JH, Wang JL, Sha SH. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: from the laboratory to the clinic. *Hear Res*. 2007;226(1-2): 178-82.
21. Aynalı G. Aminoglikozit ototoksitesini önleme. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*. 2009;16(2).
22. Burns T, MacDonald L, Sibbald B, Gask L, Roberts G. Educational assessment of general practice experience for psychiatric trainees. *Medical Education*. 1995; 29: 159-164.
23. Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am*. 1995 Sep;9(3):497-530. PMID: 7490430.
24. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 2000 Sep 21;407(6802):340-8.
25. Goodman, A. Reference Zero Levels for Pure-Tone Audiometers. *ASHA*. 1965; 7, 262-273.
26. Michele B. Martin S, Barry E. Hirsch. Imaging of Hearing Loss. *Otolaryngol Clin North Am*. 2008; 41: pp. 157-178
27. Arslan E, Orzan E, Santarelli R. Global problem of drug-induced hearing loss. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 884: 1.14.
28. Garretsen AJTM, Cremers WRJ, Huygen PLM. Hearing Loss (In Nonoperated Ears) in Relation to Age in Osteogenesis Imperfecta Type I. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. 1997;106(7):575-582.
29. Leblebicioğlu H. Aminoglikozid Antibiyotiklerin Klinik Kullanımı. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics* 2004; 2(2): 148-53.
30. Aynalı G. Aminoglikozit ototoksitesini önleme. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*. 2009;16(2)/ 39-44.
31. Çırçır Y, İncesulu A, Tekin M. Sensörinöral işitme kaybı olan kişilerde mitokondriyal 12S rRNA MTRNR1 geninin taranması. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2007;17(2):75-80.
32. Zimmerman, E., Lahav, A. Ototoxicity in preterm infants: effects of genetics, aminoglycosides, and loud environmental noise. *J Perinatol*. 2013; 33, 3–8.

33. Fu X, Wan P, Li P, Wang J, Guo S, Zhang Y, An Y, Ye C, Liu Z, Gao J, Yang J, Fan J, Chai R. Mechanism and Prevention of Ototoxicity Induced by Aminoglycosides. *Front Cell Neurosci*. 2021 Jun 15;15:692762.
34. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Martín Y, Arellano B, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Ramírez-Camacho R, Cruz Tapia M, Solanellas J, Martínez-Conde A, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I. Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*. 2003 Aug;40(8):632-6.
35. Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 13: 343–348.
36. Tono T, Ushisako Y, Kiyomizu K, et al. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the A1555G mitochondrial mutation. *Am J Otol*. 1998;19(6):754-757.
37. Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am J Hum Genet*. 1996 Sep;59(3):501-9.
38. E Collatz, I G Wool, A Lin, G Stöffler. The isolation of eukaryotic ribosomal proteins. The purification and characterization of the 40 S ribosomal subunit proteins S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S13, S23/S24, S27, and S28. *Journal of Biological Chemistry*. 1976; 4666-4672.
39. Öztaş S, Yakan B. Mitochondrial DNA and Related Diseases. *J Clin Pract Res*. 1999; 21(1): 63-71.
40. Xin L et al. Mitochondrial DNA A1555G mutation screening using a testing kit method and its significance in preventing aminoglycoside-related hearing. *J. of Otolology*, 2006; 61-64.
41. Conrad DJ, Stenbit AE, Zettner EM, Wick I, Eckhardt C, Hardiman G. Frequency of mitochondrial 12S ribosomal RNA variants in an adult cystic fibrosis population. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(12):1095-1102.
42. Soini HK, Karjalainen MK, Hinttala R, Rautio A, Hallman M, Uusimaa J. Mitochondrial hearing loss mutations among Finnish preterm and term-born infants. *Audiol Res*. 2017 Nov 3;7(2):189.
43. Guan MX. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*. 2011 Mar;11(2)237-45.
44. Lopes J, Vidal-Folch N, Lundquist P, Schimmenti LA, Demirel N, Dean V, Olson J, Auth T, Butz M, Reed K, Wylam M, Balcom J, Boczek NJ, Hasadsri L. Aminoglycoside induced ototoxicity risk in the cystic fibrosis population: The utility of large-scale screening. *Pediatr Pulmonol*. 2023 Mar;58(3):819-824.
45. Recht MI, Fourmy D, Blanchard SC, Dahlquist KD, Puglisi JD. RNA sequence determinants for aminoglycoside bind to an A-siter RNA model oligonucleotide. *J.Mol.Biol*. 1996; 262,421–436.
46. Postal M, Palodeto B, Sartorato EL, Oliveira CA. C1494T mitochondrial DNA mutation, hearing loss, and aminoglycosides antibiotics. *Braz J*

- Otorhinolaryngol. 2009 Nov-Dec;75(6):884-7. doi: 10.1016/s1808-8694(15)30554-1. PMID: 20209292; PMCID: PMC9446014.
47. Alford RL, Arnos KS, Fox M, et al. American college of medical genetics and genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genet Med*. 2014;16(4):347-355.
  48. Thyagarajan D et al. A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Annals of neurology*. 2000;48(5), 730–736
  49. Lopes J et al. Aminoglycoside induced ototoxicity risk in the cystic fibrosis population: The utility of large-scale screening. *Pediatr Pulmonol*. 2022; Nov 27.
  50. Al-Malky G, Suri R, Sirimanna T, Dawson SJ. Normal hearing in a child with the m.1555A>G mutation despite repeated exposure to aminoglycosides. Has the penetrance of this pharmacogenetic interaction been overestimated? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014;78(6):969-973.
  51. Zhu Y, Li Q et al. Mitochondrial haplotype and phenotype of 13 Chinese families may suggest multi-original evolution of mitochondrial C1494T mutation. *Mitochondrion*. 2009; Nov;9(6):418-28.
  52. Tessa A, Giannotti A, Tieri L et al. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA. *Eur J Hum Genet*. 2001 Feb;9(2):147-9
  53. Prezant TR et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*. 1993;Jul;4(3):289-94.
  54. McDermott JH, Wolf J, Hoshitsuki K, Huddart R, Caudle KE, WhirlCarrillo M, Steyger PS, Smith RJH, Cody N, Rodriguez-Antona C, Klein TE, Newman WG. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for the Use of Aminoglycosides Based on MT-RNR1 Genotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2022; Feb;111(2):366-372.
  55. Clinical Guidelines: Care of Children with Cystic Fibrosis. Royal Brompton Hospital. Part of Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust. 2023; 9<sup>th</sup> edition.

## 8. EKLER

### EK-1: Tez Orijinallik Ekran Görüntüsü

**Tezin Tam Başlığı:** Kistik Fibrozis Hastalarında Mitokondriyal DNA Mutasyonları ile Aminoglikozit Ototoksitesisi Arasındaki İlişkinin Araştırılması

**Öğrencinin Adı Soyadı:** Zülal İlayda GÖKIRMAK

Kistik Fibrozis Hastalarında Mitokondriyal DNA Mutasyonları ile Aminoglikozit Ototoksitesisi Arasındaki İlişkinin Araştırılması

#### ORJİNALLİK RAPORU

%6	%5	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Wei, Qinjun, Shuai Wang, Jun Yao, Yajie Lu, Zhibin Chen, Guangqian Xing, and Xin Cao. "Genetic mutations of GJB2 and mitochondrial 12S rRNA in nonsyndromic hearing loss in Jiangsu Province of China", Journal of Translational Medicine, 2013. Yayın	%1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	earsiv.odu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Istanbul Gelisim University Öğrenci Ödevi	<%1
6	acikerisim.balikesir.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

Submitted to University of Queensland

## EK-2: Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: ilayda gökirmak  
 Ödev başlığı: Tez  
 Gönderi Başlığı: Kistik Fibrozis Hastalarında Mitokondriyal DNA Mutasyonları...  
 Dosya adı: TEZ\_ILAYDA\_GOKIRMAK\_turnitin.docx  
 Dosya boyutu: 2.66M  
 Sayfa sayısı: 54  
 Kelime sayısı: 11,030  
 Karakter sayısı: 78,178  
 Gönderim Tarihi: 15-Ara-2023 11:42ÖÖ (UTC+0300)  
 Gönderim Numarası: 2259737683

#### 1. GİRİŞ

Kistik fibrozis transmembran epiteliyi (CFTR) gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan kistik fibrozis (KF), otozomal resesif kalıtıla ve akciğer ve sindirimdeki tipik fibrozis morbiditesinde yer alan ve ileri kısımlı gliserol CFTR protein, protein-konak A ve cAMP bağlayıcı

Üniversitede CFTR geninde 1000'den fazla mutasyon bulunurken; Mutasyon frekansı gen CFTR proteinine ilişkin diğer yapıya yönelik mutasyonlarda birinci bir kata olduğunda sıklıkla yavaş, parçalanmış, sıkı, sıkı ve yüksek pH'ya göre epitel dokularında (örneğin bronşlarda) iyon geçirirliği ile birlikte de bu enzimde azalma şeklinde sonuçlanmaktadır. Bu durumun bir sonucu olarak bu enfeksiyonun ilerlemesi beklenmektedir.

Mutasyon daha az bir hızla ortaya çıkar ve bu nedenle tanımlama mutasyon sıklıkla yavaş ilerlerken ve bu nedenle tanımlama mutasyonları da bronşlarda. Solunum yollarında enzim birikimi ve mukus için diğer enzimler enzimlerin keskinliği belirtilenlere göre yerleşim yerlerine göre farklı olabilir ve enfeksiyon gelişimine sebep olur.

Antibiyotik tedavisiyle, Prostatinazı enzimlerle ilgili genetik hastalıklarda solunum yollarında koloniler oluşurken diğer enfeksiyonlara tedavi için kistik fibrozis hastalarında uygun tedavi tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Kistik fibrozis hastalarında tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler, hastalarda yan etki olarak tedavi kaybetme riski olmaktadır. Mitokondriyal DNA'da 16789 (125 ribozomal RNA) pozitiflik, 1555A-G, a.1494C-T ve a.3955T-C mutasyonları antibiyotikler (hücre) tedavi kaybetme riski oluşturabilmektedir. Bu serepte hastalara antibiyotikler tedavi uygulanmadan önce hastaların enzimlerle sıklıkla sonuçları kistik fibrozis hastalarında büyük önem taşımaktadır.

Üniversitede bu mutasyonları sıklıkla bilimsel olarak yapılabilmektedir. Hastalardan önce kistik fibrozis hastalarında mutasyon oranları hasta tan ve diğer enfeksiyonları yer alan hastalardadır. Bu nedenle tez çalışmamda

### EK-3: Tez Çalışmasında Yer Alan 119 Kistik Fibrozis Hastasına Ait Klinik Parametreler

Hastaların DNA Numarası	Odyoloji Sonucu	AG Kullanımı	CFTR Mutasyonu	Kolonizasyon	Pankreatik Yetmezlik	Bronşektazi	FEV1	Nazal polip
1	normal	var	F508del/F508del	yok	var	yok	normal	yok
2	normal	yok	F508del / 3130delA	var	var	yok	normal	yok
3	normal	yok	2789+5G-A / 2789+5G-A	yok	var	yok	normal	yok
4	normal	yok	R117C/1677delTA	var	yok	yok	normal	yok
5	normal	yok	F508del/N1303K	var	var	yok	normal	yok
6	normal	yok	Y109D/D110H	yok	var	yok	normal	yok
7	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
8	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	yok
9	normal	yok	2789+5G-A/4375-2A-C	yok	var	yok	normal	yok
10	normal	var	2789+5G-A/3130delA	yok	var	yok	normal	yok
11	normal	yok	F508del/621+1G-T	var	var	yok	normal	yok
12	normal	yok	F508del / N1303K	yok	var	yok	normal	yok
13	normal	yok	2183AA-G / 2183AA-G	yok	var	yok	normal	yok
14	normal	yok	2789+5G-A / 4375-2A-C	yok	yok	yok	normal	yok
15	normal	yok	G314R / G314R	var	var	var	ağır	yok
16	normal	var	W1282X/W1282X	var	var	var	ağır	yok
17	normal	var	G542X/2184insA	var	var	var	ağır	yok
18	normal	var	3750delA / 3750delA	var	var	var	ağır	yok
19	normal	var	G542X/G542X	var	var	var	ağır	yok
20	işitme kaybı	var	F508del/F508del	var	var	var	ağır	yok
21	normal	var	CFTR dele2/F508del	var	var	var	ağır	yok
22	normal	var	delTA/I148T/3199del6	var	var	var	orta	yok
23	normal	var	CFTR dele2,3/CFTR dele2,3	var	var	var	orta	yok
24	normal	var	G551R/G551R	var	var	var	orta	yok
25	normal	var	F508del / 3090del4	var	var	var	orta	yok
26	normal	var	3130delA/3130delA	var	var	var	orta	yok
27	normal	var	F508del/F508del	yok	var	var	orta	yok
28	normal	var	N1303K/N1303K	var	var	var	orta	yok
29	normal	var	3120+1G-A/-	var	var	var	orta	var
30	normal	yok	CFTRdele2 / CFTRdele2	var	var	yok	orta	yok
31	normal	var	G178R / 2183AA-G	var	var	var	orta	yok
32	normal	var	F508del / G85E	var	var	yok	orta	yok
33	normal	var	G542X/Q1411X	var	var	yok	orta	yok
34	normal	var	3120+1G-A / G85E	var	var	var	orta	yok
35	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	orta	yok
36	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	orta	yok

37	normal	var	I248+1G-A/R764X	var	var	var	orta	yok
38	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	hafif düşük	yok
39	normal	var	delTA / delTA	var	var	yok	hafif düşük	yok
40	normal	var	G542X/Q1411X	var	var	yok	hafif düşük	yok
41	işitme kaybı	var	4096-3C>G/-	var	var	yok	hafif düşük	yok
42	işitme kaybı	yok	F508del / R1066C	var	var	var	hafif düşük	var
43	normal	yok	I175V / I175V	var	var	var	hafif düşük	var
44	normal	var	C.2658-1G> C/C.2658-1G> C	yok	var	yok	hafif düşük	yok
45	normal	var	2183AA-G / 2183AA-G	var	var	var	hafif düşük	yok
46	işitme kaybı	var	F508del/F508del	var	var	var	hafif düşük	yok
47	normal	var	1677delTA / 1677delTA	var	var	yok	hafif düşük	yok
48	işitme kaybı	yok	CFTR dele2,3 / L571S	var	var	var	hafif düşük	var
49	normal	var	2183AA-G / 2183AA-G	var	var	yok	hafif düşük	yok
50	normal	yok	L732X / L732X	var	var	var	hafif düşük	yok
51	normal	yok	G542X / G542X	var	var	var	hafif düşük	var
52	normal	var	I175V/I175V	var	var	var	hafif düşük	var
53	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	hafif düşük	var
54	normal	var	G542X / R347P	yok	var	var	hafif düşük	yok
55	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	hafif düşük	yok
56	normal	var	2183AA-G/2183AA-G	var	var	var	hafif düşük	yok
57	normal	var	1525-1G-A/S1159F	var	var	yok	normal	yok
58	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	var
59	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
60	işitme kaybı	yok	R1066C / R1066C	var	var	var	normal	var
61	normal	yok	1677delta/1677delta	var	var	yok	normal	yok
62	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	yok
63	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	var
64	normal	var	M1101R/M1101R	var	var	var	normal	yok
65	normal	var	CFTR dele2/CFTR dele2	var	var	yok	normal	var
66	normal	var	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
67	normal	var	711+9A-G / R1162X	var	var	yok	normal	yok
68	normal	yok	N1303K / N1303K	var	yok	yok	normal	var
69	normal	yok	G85E / G85E	yok	var	yok	normal	yok
70	normal	yok	711+9A-G / R1162X	var	var	yok	normal	yok
71	normal	yok	F508del / 2185insC	var	var	yok	normal	yok
72	normal	yok	Q220X / Q220X	var	var	yok	normal	var
73	normal	var	F508del / -	var	var	var	normal	var
74	normal	yok	F508del/S945L	var	var	yok	normal	yok
75	normal	var	E92K / W1282X	var	var	yok	normal	yok
76	normal	var	182delT/F508del	var	var	var	normal	yok

77	normal	yok	W1282X/W1282X	var	var	yok	normal	yok
78	normal	var	R347P / 2789+5G-A	var	var	yok	normal	yok
79	normal	var	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
80	normal	var	F508del / R1070Q-S466X	var	var	yok	normal	var
81	normal	yok	2183AA-G / -	var	var	yok	normal	var
82	normal	yok	W1282X/W1282X	var	var	yok	normal	yok
83	normal	var	F508del/F508del	yok	var	var	normal	var
84	işitme kaybı	yok	F508del/F508del	var	var	var	normal	var
85	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	normal	var
86	normal	var	F508del/G85E	var	var	var	normal	yok
87	normal	yok	G178R / G178R	var	var	yok	normal	yok
88	normal	yok	A46D / 1677delTA	var	var	yok	normal	yok
89	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	yok
90	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	var
91	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
92	işitme kaybı	var	F508del/delTA	var	var	yok	normal	yok
93	normal	yok	R347P / G58E	var	var	yok	normal	yok
94	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	yok
95	normal	var	R347H / F508del	var	var	yok	normal	yok
96	normal	var	F508del / 2789+5G-A	var	var	yok	normal	yok
97	normal	var	G85E/G85E	var	var	yok	normal	var
98	normal	var	CFTR dele2/CFTR dele2	var	var	var	normal	yok
99	işitme kaybı	yok	F508del / 2789+5G-A	yok	var	yok	normal	var
100	normal	var	G178R/2183AA-G	var	var	var	normal	yok
101	normal	var	N1303K/S945L	yok	var	var	normal	yok
102	normal	var	S1196X/W1282X	var	var	yok	normal	var
103	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
104	normal	yok	F508del/F508del	var	var	yok	normal	yok
105	işitme kaybı	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	yok
106	normal	var	R1066C/R1066C	var	var	yok	normal	yok
107	normal	yok	D110H/W1282X	var	yok	yok	normal	yok
108	normal	yok	G85E/G85E	var	yok	var	normal	yok
109	normal	yok	W1282X/W1282X	var	var	yok	normal	yok
110	normal	var	F508del/W1282X	var	var	yok	normal	var
111	normal	yok	1677delTA/F1052V	var	var	yok	normal	yok
112	normal	yok	F508del/F508del	var	var	var	normal	var
113	normal	var	F508del/F508del	var	var	var	normal	yok
114	işitme kaybı	yok	1248+1G-A / 1248+1G-A	var	var	yok	normal	var
115	normal	var	1677delTA / 546insCTA	var	var	yok	normal	yok
116	işitme kaybı	yok	R1066C/R1066C	var	yok	yok	normal	yok

117	normal	var	F508del / L570X	var	var	var	normal	var
118	işitme kaybı	yok	2183AA-G / 2183AA-G	yok	var	yok	normal	yok
119	normal	yok	F508/1677delta	var	var	yok	normal	var

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Zülal İlayda GÖKIRMAK**

