



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMLU PRETERM
YENİDOĞANLARDA NKX2.1 GENİNİN YENİ NESİL DİZİ
ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI

DR. BETÜL TÜREN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DÜZCE-2022



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMLU PRETERM
YENİDOĞANLARDA NKX2.1 GENİNİN YENİ NESİL DİZİ
ANALİZİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. BETÜL TÜREN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

PROF. DR. SELMİN KARADEMİR
Tez Danışmanı

I. ÖNSÖZ

İhtisasım boyunca iyi bir pediatri eğitimi dışında, engin bilgilerinden istifade ettiğim, her türlü fedakarlık ve özveriyi sabırla bize aşıl原因an başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Kenan KOCABAY'a

Bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemde emeği olan, her alanda bana yol gösteren ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Prof.Dr.Selmin KARADEMİR'e

Naif kişiliği ,bilimselliği ve hastalarına karşı hep güleryüzü olmasıyla hayranlık uyandıran, bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemde emeği olan saygıdeğer hocam Prof.Dr.İlknur ARSLANOĞLU'na

Eğitimimde bilgi ve emeğini esirgemeyen , birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof.Dr.Müferet ERGÜVEN'e

Uzmanlık tezi hazırlama süresince genetik aşamada çalışma fırsatı bulduğum ,tüm içtenlik ve samimiyetiyle her türlü desteği sunan saygıdeğer hocam

Prof.Dr.Recep Eröz'le

Uzmanlık eğitimimde emekleri ve katkıları olan değerli hocalarım Doç.Dr.Öğr.Üyesi Sevim TÜRAY, Dr.Öğr.Üyesi Ramazan Cahit TEMİZKAN, Dr.Öğr.Üyesi Nadide Melike SAV ve Dr.Öğr.Üyesi Şükriye ÖZDE'ye sonsuz şükranlarımı sunarım.

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve ileride de beraber çalışmayı umut ettiğim çok değerli mesai arkadaşlarım ve can dostlarım Uzm.Dr.Nurcan ÜNAL, Dr.Cansu TAMTÜRK, Uzm.Dr.M.Neslihan ÇOLAK ve Uzm.Dr.Meltem Küçükdağ'a

Uzmanlık sürecimde beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma, klinik hemşireleri ve personeline bütün desteklerinden dolayı

Her türlü zorlu sürecimde bana en büyük motivasyonu sağlayan, her zaman pozitif anlamda beni destekleyen, hep yanımda olduklarını hissettiren biricik aileme

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dr. Betül TÜREN

2022

II. İÇİNDEKİLER

I.ÖNSÖZ.....	I
II. İÇİNDEKİLER.....	II
III.ÖZET.....	IV
IV.ABSTRACT.....	VI
V.KISALTMALAR.....	VIII
VI.TABLO LİSTESİ.....	X
VII.ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	12
2.GENEL BİLGİLER.....	15
2.1.Akciğer gelişimi.....	15
2.2.Sümfaktan.....	18
2.2.1.Sümfaktan protein A.....	22
2.2.2.Sümfaktan protein B.....	23
2.2.3.Sümfaktan protein C.....	24
2.2.4.Sümfaktan protein D.....	24
2.3.Respiratuvar distres sendromu.....	24
2.3.1.İnsidans.....	24
2.3.2.Patofizyoloji.....	25
2.3.3.Risk Faktörleri.....	26
2.3.4.Respiratuvar distres sendromunda klinik bulgular ve tanı.....	26
2.3.5.Respiratuvar distres sendromunda ayırıcı tanı.....	27
2.3.6.Respiratuvar distres sendromunda prognoz.....	28
2.3.7.Respiratuvar distres sendromunda komplikasyonlar.....	28
2.3.8.Respiratuvar distres sendromunun yönetimi ve tedavisi.....	28

2.4. Respiratuvar distres sendromu ve genetik.....	34
2.4.1.ABCA3 gen mutasyonları.....	35
2.4.2.Sürfaktan protein B gen mutasyonları.....	36
2.4.3.Sürfaktan protein C gen mutasyonları.....	36
2.4.4.NKX 2.1 gen mutasyonları.....	36
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Araştırmanın tipi, yeri ve hastaların seçimi.....	38
3.2. Araştırmaya dahil olma kriterleri.....	38
3.3. Araştırmanın genel planı.....	38
3.4. Genetik çalışmalar.....	39
3.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	39
3.4.2.DNA izolasyonu.....	40
3.4.3.Primerlerin tasarımı.....	41
3.4.4.Çalışma stratejisi.....	42
3.4.5. PCR optimizasyonu.....	42
3.4.6. Yeni nesil dizi analizi (next-generation sequencing) (NGS).....	43
3.5. Çalışma prensibi.....	43
3.6. İstatistiksel analiz.....	44
4.BULGULAR.....	46
5.TARTIŞMA.....	60
6.SONUÇLAR.....	65
7.KAYNAKLAR.....	67
8.EKLER.....	78

III. ÖZET

Giriş-Amaç: Respiratuvar distres sendromu (RDS), tedavisinde ciddi gelişmeler elde edilmesine rağmen, erken doğan bebeklerde solunum sıkıntısının en sık rastlanan nedenidir ve preterm doğum ile ilişkili en önemli mortalite ve morbidite sebebidir. RDS insidansı 28 hafta ve daha küçük prematürlerde %93 olup, görülme sıklığı bebeğin gebelik yaşı ile ters orantılı olarak artmaktadır. Patofizyolojisinde prematüre bebeklerdeki yetersiz pulmoner sürfaktan üretiminin neden olduğu gösterildikten sonra, 1959 yılında hastalığın eski adı olan "hiyalen membran hastalığı" RDS ile değiştirildi. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda; ailevi eğilimin ve ırksal farklılıkların RDS riskini arttırdığının görülmesi üzerine genetik araştırmalara eğilim artmıştır. Aynı gebelik haftasında doğan tüm bebekler için; antenatal steroid uygulamasına, postnatal sürfaktan tedavisine ve optimal ventilatör bakımına rağmen tedaviye eşit yanıtın alınmadığı görülmüştür. Pulmoner sürfaktan proteinlerinin homeostazında rol oynayan NKX2.1 (NK2 homeobox 1) geni ayrıca akciğer farklılaşmasının erken bir belirteci olarak ve akciğerin yapısal gelişimi ile yüzey aktif madde proteinleri SP-B, SP-C ve ABCA3'ün ekspresyonu için önemlidir. NKX2.1'deki mutasyonlar, yenidoğan bebeklerde RDS ve büyük çocuklarda interstisyel akciğer hastalığı, ve solunum yetmezliğine neden olur. Çalışmamızda RDS 'li preterm yenidoğanlarda NKX2.1 geninde yeni nesil dizi analizi yöntemiyle etiolojiden sorumlu genetik değişimi ortaya koymayı hedefledik. Böylece hastalığın oluşumundan sorumlu tutulan genlerden olan NKX2.1 geninde meydana gelen mutasyonlar göz önünde bulundurularak uygulanılacak olan terapötik yaklaşımlar ile tedavi maliyetinin azaltılmasının yanı sıra hastalar için yan etkilerin daha az olduğu yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamayı amaçladık.

Gereç-Yöntem: Çalışmaya Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde prematüre doğum ve RDS nedeni ile izlenen 32 hasta ve RDS dışı başka nedenlerle takip edilen 18 prematüre yenidoğan kontrol grubu olarak alındı. Olguların hedeflenen moleküler genetik tanısı için ilk olarak rutin amaçlı istenilen tam kan örneklerinden geriye kalan atık kanlardan DNA izolasyon işlemi yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinden hedeflenen gen bölgeleri, spesifik primerler kullanılarak çoğaltılıp saflaştırma işlemi uygulandıktan sonra hedefe yönelik yeni nesil dizi analizi

yöntemiyle bu mutasyonlar incelendi. Çalışmada yer alan preterm yenidoğanlarda c.-61C>T heterozigot, c.-85G>T heterozigot, c.446A>C heterozigot, c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot varyasyonları ve NKX2.1 geninde bileşik heterozigot mutasyonları saptandı.

Bulgular: RDS tanılı 32 hastanın 20'si (%62,5), erkek 12'si (%37,5) kız olup erkek/kız oranı 1,66 idi. Kontrol grubundaki 18 hastanın 8'i (%44,4) erkek, 10'u (%55,6) kız olup erkek/kız oranı 0,8 olarak bulundu. Hasta grubunun gestasyonel yaşı (hafta) ortalama $32,71 \pm 2.03$ hafta, Kontrol grubunun $33,05 \pm 7.05$ hafta olduğu saptandı. Antropometrik değerler incelendiğinde iki grup arasında doğum ağırlığı, boy ve baş çevresi değerleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu. Hastanede yatış süresi ve entübe takip süresi Hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Kontrol grubundan fazlaydı. Anneye ait parametreler incelendiğinde anne yaşı, gravite, parite, abortus sayısı ve antenatal steroid uygulanması açısından Hasta ve Kontrol Grubunda anlamlı bir fark tespit edilmedi. Çalışmaya dahil edilen preterm yenidoğanlarda c.-61C>T heterozigot, c.-85G>T heterozigot, c.446A>C heterozigot, c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot varyasyonları ve NKX2.1 geninde bileşik heterozigot mutasyonu saptandı.

Sonuç: NKX2.1 genindeki c.1031G>A p.Gly344Asp varyasyonu literatürde RDS'li hastalarda daha önce hiç tanımlanmamış olup, bu Çalışmamızda ilk defa tespit edilmiş olması ve bileşik heterozigot mutasyonu gibi yalnızca RDS'li gruptaki yenidoğanlarda rastlanılmış olmaları nedeniyle tespit edilen bu değişikliklerin RDS için belirteç olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Respiratuar distres sendromu, prematüre, yeni nesil dizi analizi, NK2 homeobox 1 geni

IV.ABSTRACT

Screening of the NKX2.1 gene in Preterm Newborns with Respiratory Distress Syndrome by Next Generation Sequencing

Introduction-Aim: Respiratory distress syndrome (RDS) is the most common cause of respiratory distress in preterm infants and the most important cause of mortality and morbidity associated with preterm birth, despite significant advances in its treatment. The incidence of RDS is 93% in preterms at gestational age of 28 weeks and younger, and its incidence increases inversely with the gestational age of the baby. After its pathophysiology was shown to be caused by insufficient pulmonary surfactant production in premature infants, the old name of the disease "hyaline membrane disease" was replaced by RDS in 1959. In recent epidemiological studies; While familial and racial differences were seen to increase the risk of RDS, the tendency to genetic research has increased. For all babies born in the same gestational week; it was observed that there was no equal response to treatment, despite antenatal steroid administration, postnatal surfactant treatment and optimal ventilator care,. The NKX2.1 (NK2 homeobox 1) gene, which plays a role in homeostasis of pulmonary surfactant proteins, is also important as an early marker of lung differentiation and structural development of the lung and expression of surfactant proteins SP-B, SP-C and ABCA3. Mutations in NKX2.1 gene cause RDS in newborn infants and interstitial lung disease and respiratory failure in older children. In our study, we aimed to reveal the genetic change responsible for the etiology in the NKX2.1 gene in preterm newborns with RDS by next generation sequencing method. Thus, we aimed to contribute to the development of new treatment strategies with less side effects for patients, as well as reducing the cost of treatment with the therapeutic approaches to be applied by considering the mutations in the NKX2.1 gene, which is one of the genes responsible for the formation of the disease.

Material-Method: 32 patients of premature newborns with RDS followed up in Düzce University Medical Faculty Training and Research Hospital, Department Pediatrics, Neonatal Intensive Care Unit, and 18 premature newborns followed up for other reasons of RDS were included in the study. In order to perform the targeted molecular genetic diagnosis of the cases, first of all, DNA isolations were performed from the remaining waste blood from the whole blood samples requested for routine purposes. After the targeted gene regions from the isolated DNA samples were

amplified by using specific primers and purified, these mutations were examined by the next generation sequencing method. C.-61C>T heterozygous, c.-85G>T heterozygous, c.446A>C heterozygous, c.1031G>A p.Gly344Asp heterozygous variations and compound heterozygous mutations in the NKX2.1 gene were found in the preterm newborns included in the Study groups.

Results: Twenty (62.5%) of 32 patients with RDS were male and 12 (37.5%) were female. The male/female ratio was calculated as 1.66. While the mean week of gestational age at delivery in the Patient group was $32,719 \pm 2.03$ weeks, it was calculated as $33,056 \pm 7.058$ weeks in the Control group. When the anthropometric values were examined, there was no significant differences between the two groups in terms of birth weight, height and head circumference. Length of hospital stay and intubated follow-up time were statistically significantly higher in the Patient group than the Control group. When the maternal parameters were examined, no significant differences were found in the Patient and Control groups in terms of maternal age, gravity, parity abortion number and antenatal steroid administration. c.-61C>T heterozygous, c.-85G>T heterozygous, c.446A>C heterozygous, c.1031G>A p.Gly344Asp heterozygous variations and compound heterozygous mutation in the NKX2.1 gene were detected in the newborns included in the Study group.

Conclusion: The c.1031G>A p.Gly344Asp variations in the NKX2.1 gene have never been described in the literature in patients with RDS, and these changes, such as compound heterozygous mutation, were detected only in newborns in the RDS group, we found that these mutations were detected for the first time in our study. We think it may be used as a marker for RSD.

Key Words: Respiratory distress syndrome, premature, next generation sequencing analysis, NK2 homeobox 1 gene

V. KISALTMALAR

ABCA3: ATP bağlayıcı kaset, sınıf A3 (ATP binding cassette, class A3)

APGAR: Görünüm-nabız-refleks-tonus-solunum (activity - pulse - grimace - appearance – respiration)

ASD: Atrial septal defekt

BPD: Bronkopulmoner displazi

CPAP: Sürekli pozitif hava yolu basıncı

CPR: Kardiyopulmoner resüsitasyon

C/S: Sezaryen doğum

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilkolin

EMR: Erken membran rüptürü

FiO2: Fraksiyone inspiratuar oksijen yüzdesi

HFOV: Yüksek frekanslı osilatuar ventilasyon (High frequency oscillatory ventilation)

INSURE: Intubation-surfactant- reextubation (Entübasyon-sürfaktan- ekstübasyon)

İTP: İmmün trombositopenik purpura

İUGR: İntrauterin gelişme geriliği

İVK: İntraventriküler kanama

İYE: İdrar yolu enfeksiyonu

KAH : Kronik akciğer hastalığı

LISA: Daha az invaziv sürfaktan uygulaması (Less invasive surfactant administration)

MAP: Ortalama hava yolu basıncı (mean airway pressure)

MAS: Mekonyum aspirasyon sendromu

MİST: Minimal invaziv sürfaktan tedavisi

MV: Mekanik ventilasyon

N-CPAP: Nazal sürekli pozitif hava yolu basıncı

NEK: Nekrotizan enterokolit

NGS: Yeni nesil dizi analizi (next generation sequencing)

NIMV: Nazal aralıklı zorunlu ventilasyon

NIPPV: Nazal aralıklı pozitif basınçlı ventilasyon

NKX2.1: NK2 homeobox 1

NSVY: Normal spontan vajinal yol

OD: Otozomal dominant

PBV: Pozitif basınçlı ventilasyon

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDA: Patent duktus arteriozus

PEEP: Ekspirasyon sonu pozitif basınç (positive end-expiratory pressure)

PEV: Pes ekinovarus

PIP: İspiratuvar tepe basıncı (peak inspiratory pressure)

PS: Pulmoner surfaktan

PVK: Periventriküler kanama

RDS: Respiratuar distres sendromu

ROP: Prematüre retinopatisi

SD: Standart sapma

SIMV: Senkronize aralıklı zorunlu ventilasyon

SP-A(SFTPA): Sürfaktan protein A

SP-B (SFTPB): Sürfaktan protein B

SP-C(SFTPC) : Sürfaktan protein C

SP-D(SFTPD) : Sürfaktan protein D

TTF-1: Tiroid transkripsiyon faktörü -1

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İnsan akciğer morfogenezinin evreleri ve buna bağlı bozukluklar

Tablo 2: Ülkemizde bulunan sürfaktan preperatları ve özellikleri

Tablo 3: Sürfaktan proteinlerinin genel özellikleri ve genetik eksikliklerinin karşılaştırılması

Tablo 4: Genetik sürfaktan disfonksiyonlarında klinik bulgular, prognoz ve tedavi

Tablo 5: PCR reaksiyon miks içeriği

Tablo 6: Yapılacak PCR işlemi için belirlenen döngüleri ve sürelerini gösteren protokol

Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunun antropometrik değerleri ve klinik bulguları

Tablo 8: Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri ve klinik durumları

Tablo 9: Hasta ve kontrol grubunun apgar skoru karşılaştırması

Tablo 10: Hasta ve kontrol grubunun anne hastalığı karşılaştırması

Tablo 11: Hasta ve kontrol grubunun bebek ek hastalığı karşılaştırması

Tablo 12: Hasta ve kontrol gruplarındaki NKX2.1 genindeki genetik varyasyonlar

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Sürfaktanın yapısı

Şekil-2: Sürfaktanın sentezi

Şekil-3: Sürfaktan etki mekanizması

Şekil-4: A: Normal akciğer grafisi **B:** RDS'li akciğer grafisi

Şekil 5: Respiratuvar distres sendromunda solunum desteği ve sürfaktan tedavisi algoritması

Şekil 6: c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 7: c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 8: c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 9: c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 10: Bileşik heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 11: NKX2.1 geninde en az bir varyasyon taşıma açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğan solunum sıkıntısı sendromu [Respiratuvar distres sendromu(RDS)] yeni doğmuş bir bebekte solunum sıkıntısının önde gelen nedenlerinden biridir ve çoğunlukla doğumdan hemen sonra ortaya çıksa da doğumdan sonra saatler içinde de görülebilir. Respiratuvar distres sendromu esas olarak prematüre yenidoğanları ve nadiren zamanında doğmuş bebekleri etkiler. Prematüre doğum ve düşük doğum ağırlığı RDS'nin en önemli risk faktörleridir. Diğer risk faktörleri arasında ise maternal diyabet, erkek cinsiyet, beyaz ırk, genetik yatkınlık, geç preterm doğum, perinatal hipoksi, enfeksiyon ve iskemi yer alır.¹

Avery ve Mead'in ² 1959'da, yenidoğan respiratuvar distres sendromunun patofizyolojisinde prematüre bebeklerdeki yetersiz pulmoner sürfaktan (PS) üretiminin neden olduğunu gösterdikten sonra, hastalığın eski adı olan "hiyalen membran hastalığı" RDS ile değiştirilmiştir. RDS insidansı 28 hafta ve daha küçük prematürelere %93 iken, görülme sıklığı bebeğin gebelik yaşı ile ters orantılı olarak artmaktadır. Daha küçük ve daha erken doğan yenidoğanlarda daha sık görülür ve hastalık şiddeti artar.³

Antenatal kortikosteroidler, sürfaktanlar ve yenidoğanın ileri solunum bakımını içeren tedavi modaliteleri, RDS'den etkilenen hastalar için sonuçları iyileştirirken, prematüre bebekte morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir.⁴

Respiratuvar distres sendromunda; yetersiz ve immatür sürfaktan nedeniyle gaz değişiminin bozulması sonucu, azalmış statik kompliyans ve alveolo-kapiller membranın bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak akciğerlerde ilerleyici atelektaziler ve solunum yetmezliği oluşur. Bu değişiklikler alveollerde kollabe olma eğilimini arttırır ve hidrostatik olmayan pulmoner ödem gelişir.⁵ Tipik klinik ve radyolojik bulguları olan RDS'nin tanısını koymak için; subkostal çekilme, takipne (solunum sayısı >60 /dk), oda havasında siyanoz oluşması ve yaygın retikülo-granüler görünüm ve periferde hava bronkogramları gibi karakteristik akciğer grafisi görüntüsü gereklidir.⁶

Klinik seyir bebeğin büyüklüğüne, hastalığın şiddetine, sürfaktan tedavisi uygulanıp uygulanmamasına, enfeksiyon varlığına, patent duktus arteriozus (PDA) aracılığı ile oluşan şantın derecesine ve ventilatör tedavisinin başlanıp başlanmamasına göre değişiklik gösterirken kronik akciğer hastalığı (KAH), intraventriküler kanama

(İVK), prematüre retinopatisi (ROP) ve ölüm RDS'de görülen başlıca komplikasyonları oluşturur.⁷

Respiratuvar distres sendromunun tedavisinde genel prensipler hastanın metabolik ve kardiyorespiratuvar dengesinin oluşturulması, yeterli oksijenizasyon ile ventilasyonunun sağlanması, sürfaktan replasman tedavisinin yapılmasıdır. Bunlara ek olarak; prematüre doğum eylemi olan kadınlara antenatal steroid verilmesi doğacak bebekte RDS riskini yaklaşık %50 azaltmaktadır.⁸ Sürfaktanın 1980 yılında Fujiwara ve ark.⁹ tarafından kullanılmaya başlanması RDS'li yenidoğanların yoğun bakım ünitelerindeki bakım ve tedavisinde devrim yaratmıştır.

Alveol yüzeylerinde bulunan sürfaktan, yüzey gerilimini azaltarak atelektazi oluşumunu önlemektedir. Sürfaktan tedavisi ile akciğer esnekliği artmakta, alveoller stabilize olmakta, pulmoner vasküler direnç azalmakta, ventilasyon perfüzyon uyumsuzluğu düzelmekte ve ventilatör ilişkili akciğer hasarı azalmaktadır.^{10,11}

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda; ırksal farklılıkların ve ailevi eğilimin RDS riskini arttırdığının görülmesi üzerine, genetik araştırmalara eğilim artmıştır. Aynı gebelik haftasında doğan tüm bebekler için; antenatal steroid uygulamasına, postnatal yüzey aktif madde tedavisine ve optimal ventilatör bakımına rağmen tedaviye eşit yanıtın alınmadığı görülmüştür.

Sürfaktan eksikliklerinin genetiği çok karmaşıktır. Bazı mutasyonlar yenidoğan döneminde öldürücüdür, diğerleri ise bebeklikten yetişkinliğe kadar çok çeşitli hastalıklara neden olur. Yüzey aktif madde eksikliğine neden olan genler arasında SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC ve SFTPD (sırasıyla yüzey aktif madde proteinleri A, B, C ve D için kodlayan genler-pulmoner sürfaktan protein genleri), ABCA3 (ATP binding cassette, class A3) ve NKX2.1 (NK2 homeobox 1) genleri yer alır.¹²⁻¹³

NKX2.1, 14. kromozomun üzerinde bulunan, homeobox (homeodomain: 180 baz çifti uzunluğunda bir DNA dizisi) içeren ve transkripsiyon faktörü ailesi tarafından kodlanan küçük bir gendir. NKX2.1 ile ilişkili bozukluklar otozomal dominant kalıtılır. NKX2.1 ile ilişkili bir bozukluğu olan bireylerin çoğunun etkilenen bir ebeveyni vardır. Tiroid transkripsiyon faktörü 1 (TTF-1) tarafından kodlanan NKX2.1 geni, tiroid bezi, beyin ve akciğerde eksprese edilir. NKX2.1 geni; akciğer, tiroid ve beyinin embriyogenezi sırasında organ ve doku farklılaşmasında anahtar rol oynar.

Homeodomain içeren proteinler, homeodomain yoluyla spesifik DNA sekanslarına bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu kontrol eder. ^{13,14}

NKX2.1 geni ayrıca pulmoner sürfaktan proteinlerinin homeostazında rol oynar. NKX2.1 geni; akciğer farklılaşmasının erken bir belirteci olarak ve akciğerin yapısal gelişimi ile yüzey aktif madde proteini SP-B (sürfaktan protein B), SP-C (sürfaktan protein C) ve ABCA3'ün ekspresyonu için önemlidir. NKX2.1'deki mutasyonlar, yenidoğan bebeklerde RDS ve büyük çocuklarda interstisyel akciğer hastalığı ve solunum yetmezliğine neden olur. ¹⁴

Çalışmamızda RDS tanılı prematür yenidoğanlarda NKX2.1 geninde yeni nesil dizi analizi yöntemiyle etiyolojiden sorumlu genetik değişimi ortaya koymayı amaçladık. Böylece hastalığın oluşumundan sorumlu tutulan genlerden olan NKX2.1 geninde meydana gelen mutasyonlar göz önünde bulundurularak uygulanılacak olan terapötik yaklaşımlar ile tedavi maliyetinin azaltılmasının yanı sıra hastalar için yan etkilerin daha az olduğu yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

Neonatolojideki gelişmelerle birlikte prematüre bebeklerin daha büyük bir yüzdesinin artık hayatta kalıyor olması, bu bebeklerin solunum sistemi ve hastalıklarını daha iyi anlayabilmemizi gerektirmektedir. Bunun için de öncelikle akciğerlerin embriyolojisi ve fetal gelişim basamaklarının bilinmesi gerekir.

2.1.Akciğer Gelişimi

Omurgalıların hava solunumuna adaptasyonunu sağlayan akciğerin oluşması, olağan üstü evrimsel bir adımın sonucunda meydana gelir. Akciğer hücrelerinin embriyolojik olarak farklılaşması, hücrelerin ön bağırsak (foregut) endoderminden splanknik mezenşime doğru kese oluşturması ile başlar. Gebeliğin 3.haftasında gelişmeye başlayan akciğer bu gelişimini beş evrede tamamlar.

Trakea ve ana bronşları oluşturmak için dallanan akciğer tomurcukları, stereotipik dallanma ve tomurcuklanma sonucunda iletken hava yollarını üreterek, akciğerin periferinde yer alan alveolar bölgeyi meydana getirir. Prenatal dönemde amniyon sıvı ile dolu olan akciğerler, doğumdan hemen sonra solunan gazlarla doldurulur. Akciğerlerin perinatal adaptasyonu perfüzyonun ve ventilasyonun hassas şekilde düzenlenmesine, akciğer yapısının normal oluşumuna ve alveollerde gaz-sıvı ara yüzeyinde oluşan yüzey kuvvetlerinin azaltılması için gerekli pulmoner sürfaktan üretimine bağlıdır. Akciğer morfogenezisi sırasında meydana gelen gen fonksiyonlarının bozulmasının zamanlaması ve boyutu, pulmoner malformasyonlarla ilişkili akciğer anomalilerine yol açar (Tablo.1).¹⁵

a. Embriyojenik dönem (3-7 hafta)

Orta trakeal-laringeal sulkustan oluşan pulmoner divertikül, embriyonik dönemde trakeal-bronşiyal tübüleri meydana getirir. Akciğerin lobar anatomisini tanımlayan trakea; solda iki, sağda üç lobar bronşa dallanır. Bu dönemde özofagus (yemek borusu) ve trakea ayrılır. Bronşiyal tübüller bronkopulmoner segmentleri oluşturmak için farklılaşır. Destekleyici yapılar olan kan damarları, lenfatikler, trakeal-bronşiyal kıkırdaklar ve düz kas bu evrede splanknik mezenşimden gelişir. Embriyonik

dönemde meydana gelen kusurlar arasında trakeal-özofagus atrezisi/fistül ve pulmoner agenezi yer alır.¹⁵

b. Pseudoglandüler dönem (7-17 hafta)

Bu gelişim döneminde, asiner tübüllerini oluşturmak üzere dallanmaya ve tomurcuklanmaya devam eden iletkin hava yolları ve periferik akciğer tübülleri hızlı bir şekilde genişler. Akciğerin periferinde yer alan bu küçük tübüllerin genişlemesi glandüler bir görünüm oluşmasını sağlar. Periferik akciğer mezenşimi inceler ve giderek vaskülerize olur. Hava yollarında sinirler, nöroendokrin cisimler ve organize düz kaslar görülmeye başlar. Plevra-periton boşluğu kapanır, diyafram giderek kaslı hale gelerek kalınlaşmaya başlar. Diyaframın kapanmasındaki kusurlar diyafram hernisi ile birlikte aynı tarafta pulmoner hipoplaziye neden olur.¹⁵

c. Kanaliküler dönem (16-26 hafta)

Kesecikler oluşturmak için genişleyen sıvı dolu tübüller, kılcak/vasküler kanallar ve hava boşlukları ile birlikte periferik akciğerin ilkel gaz değişim bölgesini oluşturmak üzere giderek yakın bir konuma gelir. Daha fazla periferik akciğer tübülü oluştuğça pulmoner mezenkim incelmeye başlar. Bu da solunum epitelinin farklılaşmasını başlatır. Bu dönemde doğumda yüzey aktif madde fonksiyonu için gerekli olan lipidlerin ve proteinlerin üretimi de dahil olmak üzere yüzey aktif madde sisteminin bileşenleri ilk defa gözlemlenir.

Periferik akciğer keselerinde yer alan küboidal tip II hücreler sürfaktan proteinleri ve lipidleri sentezlemeye başlar. Skuamöz tip I hücreleri farklılaşır ve asinüslerin periferik gaz değişim bölgesindeki pulmoner kılcak damarlarla etkileşime girer. 23-24 haftalık gebelikten sonra doğan preterm bebekler pulmoner olgunlaşma ve RDS etkilerine maruz kaldığından ancak yeterli yoğun bakım koşulları sağlandığı takdirde hayatta kalabilirler. Bu dönemde oluşan oligohidramniyos, böbrek anomalileri veya amniyotik sıvı kaybı sıklıkla akciğer hipoplazisi ile ilişkilidir.¹⁵

d. Sakküler dönem (22-36 hafta)

Sakküler dönem asinüslerin sürekli olarak proliferde olduğu ve genişlediği bir dönemdir. Distal kesecikler incelmıştır. Skuamoz epitel hücreleri ve pulmoner kılcal damarlar gaz değişim bölgesini meydana getirir. İletken hava yollarının epiteli giderek farklılaşır. Doğuma hazırlanırken gaz değişim bölgesinin yüzey alanı büyük ölçüde artış gösterir. Bu aşamayı tamamlayan, periferik keseler doğumdan sonra genellikle solunum işlevini yerine getirebilir. Hava yolu mukozal bezlerinin belirginleştiği bu dönemde ek alveol septaları oluşmaya başlar. Kanaliküler dönemde olduğu gibi, ister böbrek anomalileri (Potter sendromu) ister amniyotik membranların yırtılması ile ilgili olsun, amniyotik sıvı eksikliği bu dönemde akciğer hipoplazisine neden olabilir. Yüzey aktif madde eksikliğinin neden olduğu RDS, bu dönemde preterm doğumun sık görülen bir komplikasyonudur.¹⁵

e. Alveolar dönem (36 hafta- maturasyon)

Bu dönem doğum zamanına yakın başlar ve alveolar septasyonun tamamlandığı olgunluğa kadar devam eder. Erişkin akciğeri $\sim 10 \text{ m}^2$ 'lık bir gaz değişim yüzey alanı oluşturan yaklaşık 300 milyon alveolden oluşur.¹⁶ Alveolar gelişim sırasında, artan septasyon ve stromal vasküler elemanların devam eden incilmesi matür akciğerin karakteristik alveoler-kapiller yapılarını oluşturur. Bu dönemde meydana gelen anormallikler, doğum sonrası dönemde genişlemiş alveoller ile alveolar basitleşmeye neden olur.¹⁵

Tablo-1 :İnsan akciğer morfogenezinin evreleri ve buna bağlı bozukluklar.¹⁵

Dönem	Malformasyonlar/bozukluklar
Embriyonik (3-7 hafta)	Laringeal/özofagus atrezisi/darlığı Trakeal/bronş atrezisi/darlık Bronkojenik kistler Trakeaözofageal fistül Ekstralober sekestrasyon
	Pulmoner hipoplazi (oligohidraminos)

Psödoglandular (7-17 hafta)	İntralobar sekestrasyon Kistler, kistadenomatoid malformasyonlar Trakeal-bronşiyal malazi Diyafraam hernisi
Kanaliküler (16-26 hafta)	Pulmoner hipoplazi/oligohidraminos Alveolar kılcal displazi Pulmoner olgunlaşmamışlık ve yüzey aktiflik yetersizliği
Sakküler (22-36 hafta)	Pulmoner hiperplazi/oligohidraminos Yüzey aktif madde eksikliği, solunum sıkıntısı sendromu (RDS) Pulmoner hipertansiyon Geçici takipne Bronkopulmoner displazi
Alveolar (36 hafta -Maturasyon)	Lobar amfizem Plevral efüzyonlar Lenfatik anormallikler Pulmoner hipertansiyon Mekonyum aspirasyonu

2.2.Sürfaktan

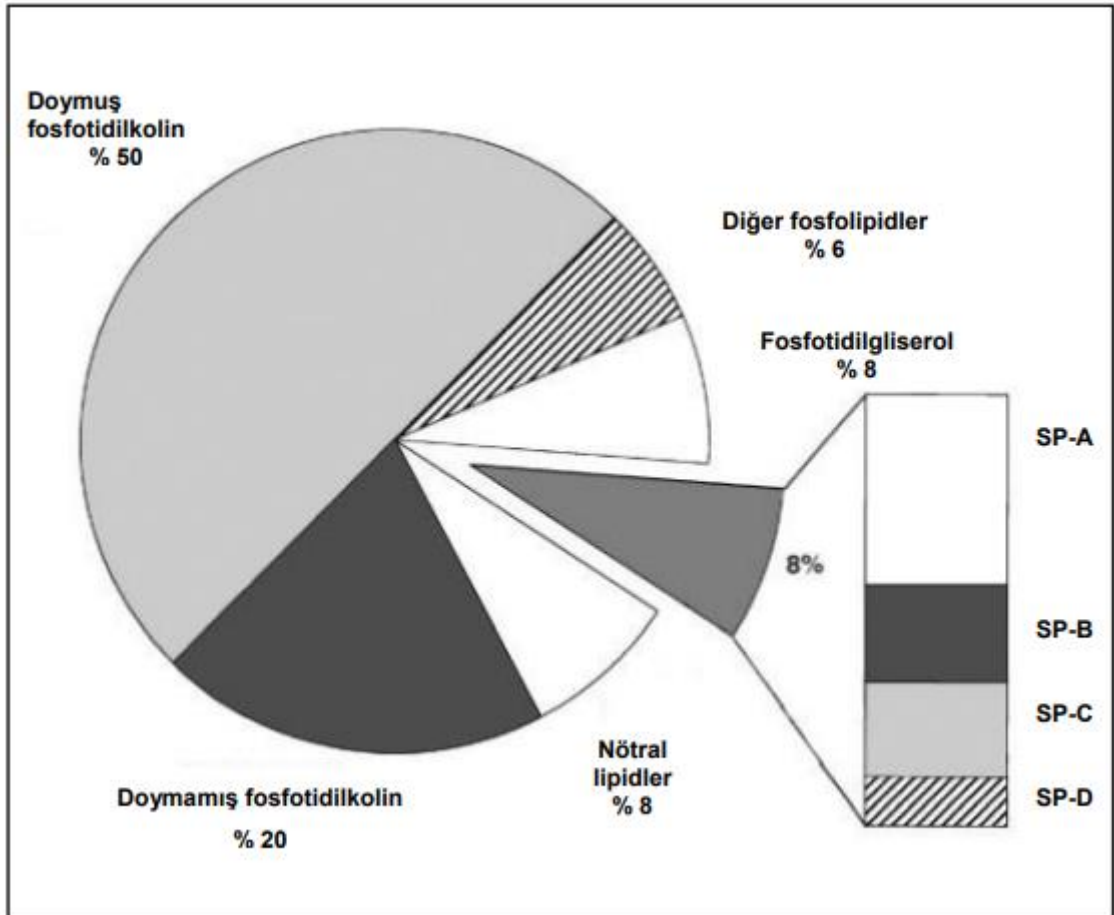
Alman bir fizyolog olan Kurt Von Neergaard ¹⁷ tarafından ilk defa 1929 yılında tanımlanan yüzey aktif maddenin (sürfaktan), akciğerlerdeki yüzey gerilimini azaltarak solunum fizyolojisinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir.¹⁸ Bundan 20 yıl sonra, Peter Gruenwald ¹⁹ ölü doğmuş bebeklerle yaptığı deneylerde akciğerlerin havalandırılması için gereken direnci azaltmak üzere kullanılabilecek bir yüzey aktif maddenin varlığını göstermiştir.

Mary Avery ve Jere Mead ²⁰ 1959'da, alveolar yüzey geriliminin artmasına bağlı oluşan hiyalen membran hastalığından ölen çocuklarla ilgili bir makale yayınlamıştır.

Bu makalede hiyalen membran hastalığının, normal kişilerde de akciğer yüzey gerilimini düşüren bir maddenin yokluğu veya geç üretilmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmalardan 5 yıl sonra, Amerika Başkanı John Fitzgerald Kennedy ve eşi Jackie Kennedy'nin 34.gebelik haftasında dünyaya gelen ve 2 gün sonra ölen üçüncü çocuğu Parick Bouvier Kennedy'nin ölümünün ardından doğal sürfaktan ve sentetik sürfaktanların gelişimi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.²¹

Richard Pattle'in²² 1950'lerde yaptığı bir araştırma sonrasında, akciğer sıvısının esas olarak protein, lesitin ve jelatinden oluştuğunu tespit etmiştir. Ayrıca pankreatin ve tripsine maruziyeti sonrası yüzey aktif maddenin yüzey gerilimini düşürme özelliğinin kaybolduğunu farketmiştir.

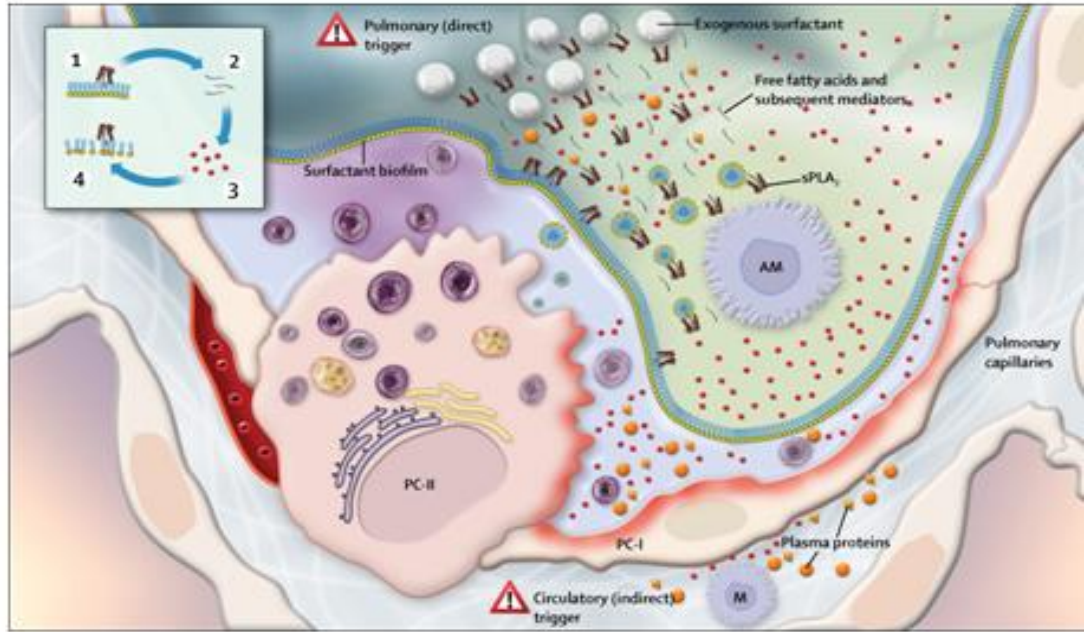
Clements ve ark.¹⁸ sürfaktanın bileşenlerini 3 ayrı kategoriye ayırır: doymamış fosfolipidler, fosforile edilmemiş lipidler ve proteinler. Sonraki yıllarda sürfaktan tabakasını elektron mikroskobu altında inceleyebilen ilk kişiler olan Weibel ve Gil, sürfaktan ve sürfaktan proteinleri ile ilgili araştırmaların yolunu daha da açmışlardır.^{23,24} Sürfaktan %70-80 oranında fosfolipid, %10 protein ve %10 nötral lipitten oluşur (Şekil-1).¹¹



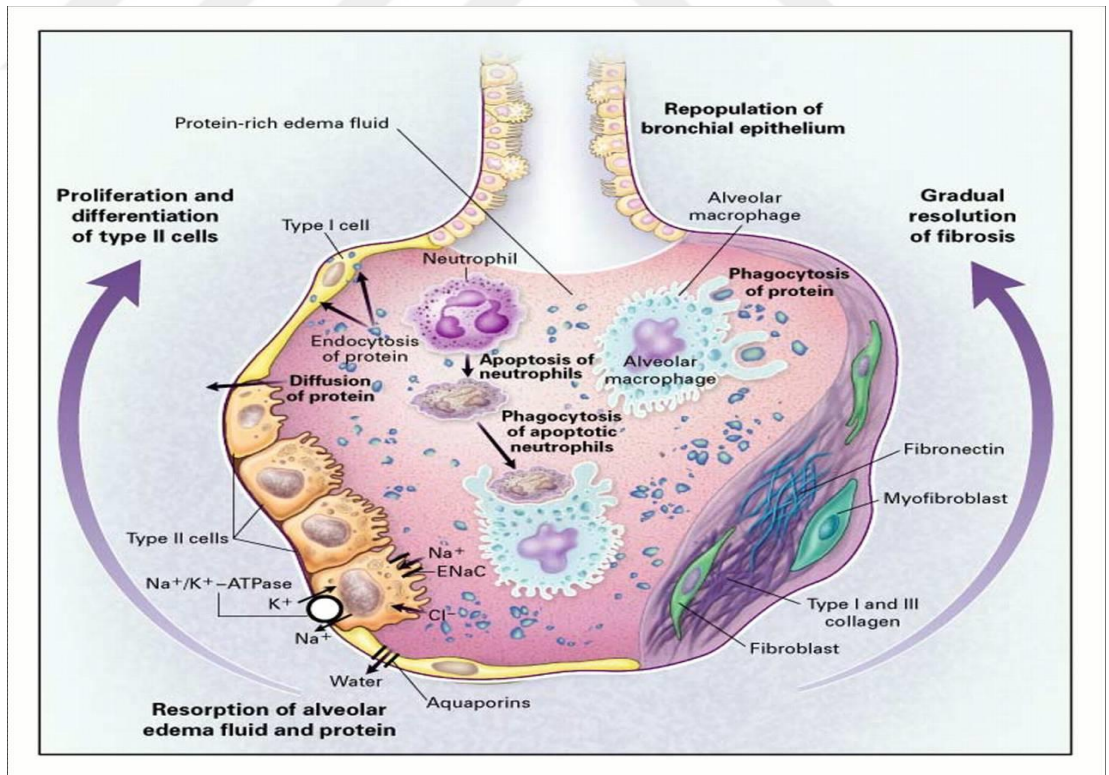
Şekil-1: Sürfaktanın yapısı.¹¹

Yüzey aktif madde fosfolipidlerinin ana bileşeni olan fosfatidilkolin'in %80'ini dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) oluşturur.²⁵ Yüzey gerilimini düşürmede ikincil bir rol oynayan fosfatidilgliserol, fosfolipidlerin diğer ana bileşenidir. Yapılan bazı çalışmalarda fosfatidilgliserolün doğuştan gelen bağışıklıkta rol oynadığı ve viral enfeksiyonlara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.²⁶ Fosfolipid bileşenlerinin geri kalanı fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomyelin ve nötr lipidlerden (kolesterol ve diaçilgliserol) oluşur ve bu bileşenlerin tam işlevi henüz net olarak belirlenememiştir.²⁷

Sümfaktan esas olarak alveoller tip II epitel hücreleri tarafından gebeliğin 24. haftasından itibaren salgılanmaya başlar (Şekil-2).²⁸ Tip II pnömositlerin endoplazmik retikulumunda sentezlenen sümfaktan fosfolipidleri daha sonra glikozilasyon ve modifikasyona uğramak üzere golgi cisimciğine aktarılır.²⁹ Sümfaktan ekzositoz öncesi lamellar gövdede küçük veziküller halinde paketlenir. Alveolar yüzeye taşınmasından sonra, hidrofobik proteinler hava/sıvı ara yüzünde tek katlı lipid tabakasını oluşturur. Bu tek katlı lipid tabaka hava/sıvı ara yüzündeki yüzey gerilimini düşürmekten esas sorumlu olan dipalmitoilfosfatidilkolin ile zenginleştirilmiştir.³⁰ Tübüler miyelin fosfolipid kompleksi olarak da adlandırılan bu form, alveolde hava ile sıvının karşılaştığı yüzeyde, tek katlı bir tabaka oluşturur ve yüzey gerilimini düzenler (Şekil-3).³¹



Şekil-2: Sürfactanın sentezi.²⁸



Şekil-3: Sürfactan etki mekanizması.³¹

Ana görevi alveollerdeki yüzey gerilimini düşürmek ve atelektaziyi önlemek olan sürfaktan; düşük akciğer hacimlerinde hava/sıvı ara yüzündeki yüzey gerilimini yaklaşık 70 mN/m'lik basınçtan 1 mN/m'lik basınca kadar düşürür.³² Bu sayede sürfaktan sadece solunum işini kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda ekspiratuar alveolar kollapsı da önleyerek atelektazi gelişimini engellemiş olur.²⁴

Sürfaktan eksikliğinde küçük hava yolları kapanır, ilerleyici atelektazi ve proteinöz materyalin alveollere dolmasıyla ventilasyon ve perfüzyon bozulur. Erken tanısı konup tedavi edilmediği takdirde hasta genellikle solunum yetmezliği nedeni ile ölür.¹⁰⁻¹¹

Sürfaktan üretimi esas olarak tip II alveol hücrelerinin yapısal ve biyokimyasal olarak farklılaşmasıyla ilişkilidir. Parakrin ve endokrin faktörler bu farklılaşmayı etkiler. İn vivo çalışmalarda özellikle glukokortikoidlerin yapısal farklılaşma ve sürfaktan sentezinde rol aldıkları gösterilmiştir. Östrojen, prolaktin, tiroid hormonları, epidermal büyüme faktörü ve β -adrenerjik ajanların da akciğer olgunlaşmasında rol oynadıkları tespit edilmiştir. Doğum şekli, ventilasyon durumu ve katekolaminler sürfaktan salınımını artırırken, hiperglisemi ve hiperinsülinemi sürfaktan fosfolipidlerinin salınımını azaltmaktadır. Salgılanan sürfaktanın çoğunluğu tip II epitel hücrelerince tekrar alınır ve döngüye katılır. Çok az bir kısım ise alveoler makrofajlarca yıkılır.³³⁻³⁴

Sürfaktan protein (SP)'leri, SP-A (sürfaktan protein-A), SP-B (sürfaktan protein-B), SP-C (sürfaktan protein-C) ve SP-D (sürfaktan protein-D) olmak üzere dörde ayrılır.

Kimyasal özelliklerine göre iki gruba ayrılan bu proteinlerden SP-B ve SP-C iki küçük hidrofobik protein iken, SP-A ve SP-D hidrofildir. ABCA3'e ek olarak , tiroid transkripsiyon faktörü-1 (TTF-1) de pulmoner sürfaktanın normal yapısı ve işleyişi için gerekli olan önemli proteinlerdendir.³⁵

2.2.1.Sürfaktan protein A

Yüzey aktif maddenin bir bileşeni olarak ilk keşfedilen SF-A 10.kromozomda kodlanan (10q22-q23.1), suda eriyebilen kollajen tip lektin (kollektin) yapısında ve 248 aminoasitten oluşan büyük bir proteindir.³⁶ Bu protein lameller cisimcik yapısında ve fonksiyonunda görev alır. Ayrıca membran geçirgenliğini artırarak veya fagositlerin bağlanmasını kolaylaştıran opsoninler olarak doğuştan gelen bağışıklık sisteminin

bir parçası olarak görev yapar.³⁷ Nötrofil fonksiyonlarını inhibe ederek akciğerin abartılı inflamatuvar cevap vermesine engel olur. Sürfaktan protein A'sı çıkarılmış fareler Grup B Streptokok tarafından oluşturulan pulmoner enfeksiyonlara yatkındırlar.³⁸ Sürfaktan protein A'nın en önemli özelliklerinden biri de kollajen-karbonhidrat bağlayan uçlarıdır ve bu özelliği sayesinde lokal pulmoner immünolojik fonksiyonları düzenlemede görev alır.^{39,40}

Sürfaktan protein A için iki fonksiyonel gen tanımlanmıştır; SFTP-A1 ve SFTP-A2. Bu genler SP-A'nın stabilitesi, fonksiyonu ve olgunlaşması için önemlidir. SP-A, SP-B ve SP-C polimorfizmi RDS ile ilişkilidir. Prematürite derecesi, çoğul gebelik, uterus boyutu ve cinsiyet farklılığının da içinde olduğu çeşitli risk faktörleriyle bu genlerin spesifik allelleri etkileşime girer. Sürfaktan protein A'nın major tipleri prematüre infantlarda RDS için herediter risk faktörü şeklinde davranırken, aynı haplotip terme yakın bebeklerde RDS'den koruyucu faktör olarak görev yapar.⁴¹ Sonuç olarak SP-A proteini olmayan hiçbir yenidoğan bulunmamaktadır. İnsanlarda SP-A alleli değişkenlik gösterebilir.³⁸

2.2.2.Sürfaktan protein B

Küçük bir peptit olan SP-B, 2. kromozomda kodlanır, suda erimez ve 79 aminoasitten oluşur. Lameller cisimciikteki fosfolipidlerle beraber depolanan SP- B, alveollere salınarak buradaki yüzey gerilimini azaltmak için lipid tabakasını stabilize eder.³⁶

Sürfaktan protein B ve prekürsörü proSP-B, yine SP-C'nin prekürsörü olan proSP-C, aktif sürfaktan tabakasının yapımının, lameller cisimcik oluşumunun, tübüler miyelin yapımının ve sürfaktan lipid ve proteinlerinin tekrar döngüsünün gerçekleşebilmesi için gereklidir. Sürfaktan protein B gen delesyonu yenidoğan farelerde akciğer yapısını bozarak ölümcül RDS'ye neden olur. ⁴² Yine SP-B insan genini kodlayan birkaç mutasyon da, yenidoğan bebeklerde ölümcül respiratuvar distrese neden olur . ^{42,43}

Farelerde SP-B yokluğunda lipid protein kompleksleri tip II alveolar hücreler tarafından sentezlenir ve bu hücrelerde matür SP-C bulunmaz ve sürfaktan yüzey aktif değildir.⁴⁴ Glukokortikoid tedavisiyle insan SP-B geninin üretimi arttırılabilirken , SP-A geni üretimi azalır.³⁸

2.2.3.Sürfaktan protein C

Sürfaktan protein C 35 aminoasitten oluşan, 8.kromozomda kodlanan ve suda erimeyen küçük bir proteindir.³⁶ SF-C alveolar lümenine salgılanması öncesinde lamellar cisimciklerde depolanır. İntegral membran proteini olarak sentezlenen tek peptid olarak bilinir, salınımı luminal protein şeklinde olur. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda interstisyel akciğer hastalığına neden olan 12'den fazla mutasyonu bildirmiştir .⁴⁵

Olgun SP-C hem lameller cisimciklerde hem de hava yollarında bulunabilir. Tubuler miyelin yapısında majör rol oynamaz. Düşük akciğer volümünde akciğer stabilizasyonunda ve hücre içi sürfaktan kompleks işleyişinde görev alır. SP-B, SP-C'nin hücre içi işleyişinde ve üretiminde rol oynar.⁴⁵ SP-C, sürfaktan parçalarının tekrar kullanılması görevinin dışında bağışıklık sisteminde de görev almaktadır.⁴⁷

2.2.4.Sürfaktan protein D

Sürfaktan protein D 10.kromozomda, 355 aminoasiti olan, kollektin yapısında, hidrofilik bir proteindir.³⁶ Klara hücrelerinde ve tip II pnömositlerde bulunan SP-D, patojen mikroorganizmalara bağlanarak konakçı savunmasında görev alır ve klirensi artırır. Farelerde yapılan çalışmalarda SP-D eksikliğinde sürfaktan lipid havuzu artarak, amfizemin hakim olduğu bir klinik tablonun geliştiği ve akciğer infeksiyonlarına yatkınlığın arttığı görülmüştür.⁴⁸

Sürfaktan Protein D, SP-A ile beraber mikroorganizmalara karşı konak savunmasının önemli bir parçasıdır. Bu proteinler mikroorganizmanın membranına bağlanır ve lökosit fonksiyonunu düzenler, opsonizasyonu sağlayarak mikroorganizmanın öldürülmesini kolaylaştırır. Kalıtsal SP-D eksikliği insanlarda tanımlanmamıştır, ancak kistik fibrozlu hastalarda SP-A ve SP-D'de değişiklikler olduğu tespit edilmiştir.⁴⁹

2.3.Respiratuvar Distres Sendromu

2.3.1.İnsidans

Respiratuvar distres sendromu tedavisinde ciddi gelişmeler elde edilmesine rağmen, erken doğan bebeklerde solunum sıkıntısının en sık rastlanan nedenidir ve preterm doğum ile ilişkili en önemli mortalite ve morbidite sebebidir. Daha önceleri "hiyalen membran hastalığı" olarak da bilinen respiratuvar distres sendromunda yetersiz

ve immatür sürfaktan nedeniyle akciğerlerde ilerleyici atelektaziler ve fonksiyon bozukluğu gelişir.⁵⁰

Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsani Gelişme Enstitüsü (*National Institute of Child Health and Human Development –NICHD*)'nün *Neonatal Research Network* verilerine göre 28 hafta altı bebeklerde RDS görülme insidansı %93'tür.⁵¹ Gebelik yaşı arttıkça görülme sıklığı azalmaktadır. Sıklığı 28-32 hafta arasında %70, 32-36 hafta arasında ise %15-30 iken 37.haftada %1'den azdır.^{52,53}

2.3.2.Patofizyoloji

Respiratuvar distres sendromunun esas nedeni sürfaktan eksikliğidir. Sürfaktan eksikliği genel olarak sürfaktan komponentlerinin sentezi için gerekli enzimlerin olgunlaşmamasına veya sürfaktanı üreten tip II pnömositlerin işlevlerinin bozulmasına bağlıdır.⁵⁴ Bunun yanı sıra pulmoner ödem, alveoler epitelin yetersiz gelişimi, göğüs duvarının düşük kompliyansı gibi solunum sisteminin immatüritesi de katkıda bulunur.^{52,53}

Respiratuvar distres sendromunda, akciğerlerdeki yetersiz ve immatür sürfaktan nedeniyle ilerleyici solunum sıkıntısı gelişir. Alveoller, ekspirasyon sonunda kollabe olmaya yatkın olduğundan fonksiyonel rezidüel kapasite düşer. Akciğerleri havalandırmak için gereken basınç, fizyolojik ölü boşluk ve solunum işi artar, akciğer kompliyansı ve tidal hacim azalır. Alveoler havalanmayı devam ettirmek için solunum sayısı artar, fakat alveoler ventilasyon yetersiz kalır.

Özellikle mekanik ventilasyon uygulanan bebeklerde akciğerlerde atelektazi ile birlikte aşırı havalanan alanlar görülebilir ve sonuç olarak ventilasyon-perfüzyon dengesizliği, intrapulmoner sağdan-sola şantlar meydana gelir. Sonraki süreçte gaz değişiminin bozulmasına, oksijenasyonun ve karbondioksit atılımının azalması ile hipoksemi ve respiratuvar asidoz gelişmesine neden olur.

Persistan hipoksemi; kardiyak debinin azalmasına, metabolik asidoza ve hipotansiyona neden olur. Bu sebeple ağır RDS'de mikst metabolik ve respiratuvar asidoz görülür. Asidoz sürfaktan üretimini daha da azaltır, pulmoner hipertansiyon gelişme riski artar. Alveoler ventilasyonun devam edebilmesi için artan plevral basınç, interkostal ve subkostal retraksiyonlara neden olur ve bu klinik bulgular artmış solunum işinin en belirgin göstergesidir.⁵⁵

Açık olan alveollerin fazla gerilmesi ve kapanan alveollerin tekrarlayan açılıp kapanmaları neticesinde, zaten hassas olan akciğer yapısı hasara uğrar ve hava yollarına proteinöz debris (hiyalen membran) salınımı olur.⁵⁶

Az miktarda bulunan sürfaktan da bu debris ile inaktive olabilir. Destekleyici tedavinin başarılı olması durumunda hayatın ikinci gününde onarım fazı başlar. Makrofajlar ve polimorfonükleer lökositler belirir, debris fagosite edilir, hasarlı epitel rejenera olur. İnterstisyumdaki ödem sıvısı lenfatiklere hareket eder ve yüksek idrar çıkışının görüldüğü, RDS'nin "diüretik" fazı oluşur. Komplike olmamış RDS'de birinci haftanın sonunda hasta iyileşir, ancak 1250 gramdan küçük ve yüksek oksijen ile pozitif basınçlı ventilasyon (PBV) gerektiren ağır RDS'li daha büyük bebeklerde oluşabilecek inflamasyon ve onarım yetersizliği nedeniyle amfizem ve fibrozis gelişebilir.⁵⁷

2.3.3.Risk faktörleri

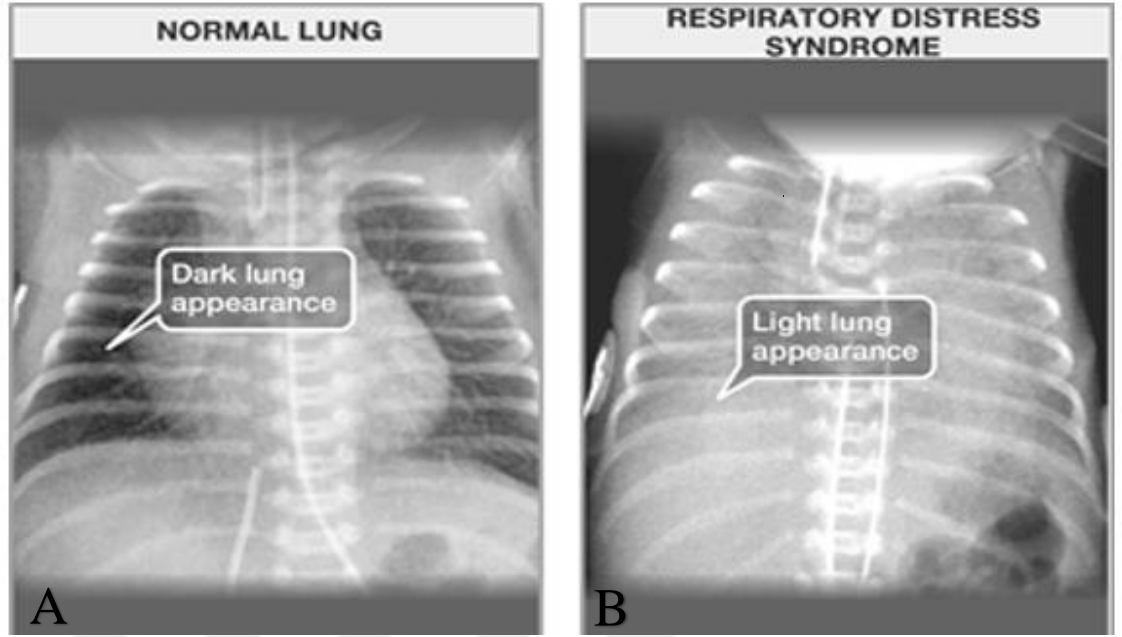
Prematür doğum RDS için en önemli risk faktörüdür. Erkek cinsiyette, çoğul gebelikte, beyaz ırkta, sürfaktan üretimini ve fonksiyonunu sağlayan proteinleri etkileyen genetik mutasyon varlığında, ikiz gebelikte ikinci ve doğum ağırlığı yüksek olarak doğan bebekte, sezaryen doğumda, diyabetik anne bebeklerinde, gebeliğin intrahepatik kolestazında ve aile öyküsünün olması durumlarında RDS gelişme riski artmaktadır.

Pulmoner hipoplazi, mekonyum aspirasyon sendromu, intrapartum asfiksi, pulmoner enfeksiyonlar, pulmoner hemoraji, konjenital diyafram hernisi olan hastalarda sürfaktan fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak sekonder sürfaktan eksikliği gelişebilir. Hipotermi, asidoz ve hipoksi gibi faktörler sürfaktan salınımını ve sentezini inhibe ederek RDS şiddetini artırır. Buna karşılık intrauterin büyüme geriliği, erken membran rüptürü ve maternal madde bağımlılığı hallerinde RDS riski azalır.⁵⁵⁻⁵⁷

2.3.4.Respiratuvar distres sendromunda klinik bulgular ve tanı

RDS tanısı klinik olarak, doğum sonrası erken dönemde takipne, interkostal ve subkostal retraksiyon, inlemeli solunum ve siyanozun eşlik ettiği solunum sıkıntısı bulgularıyla konur. Arteriyel kan gazı analizinde asidoz olmasıyla birlikte akciğer grafisinde klasik retikülo-granüler (buzlu cam) görünüm ile akciğer havalanması ve kompliyansında yetersizlik ve hava bronkogramları görülmesi RDS tanısını destekler (Şekil-4). Tanı konan hastalarda arteriyo-alveolar oksijen basınç oranı (a/A PO₂) 0,2'nin

altında ve fraksiyone oksijen (Fio2) ihtiyacı 0,4 ve üzerinde ise sürfaktan tedavi endikasyonu vardır.⁵⁸



Şekil-4 : A: Normal akciğer grafisi **B:** RDS'li akciğer grafisi

2.3.5. Respiratuvar distres sendromunda ayırıcı tanı

Ayırıcı tanıda yenidoğanın geçici takipnesi, neonatal pnömoni, pulmoner hava kaçağı bozuklukları (pnömotoraks, pnömomediastinum), mekonyum aspirasyonu, yenidoğanın persistan pulmoner hipertansiyonu, siyanotik konjenital kalp hastalıkları ve akciğer dışı diğer sistemik hastalıklar akla gelmelidir.⁵⁸

Yenidoğanın geçici takipnesi olan bebeklerde, fetal akciğer sıvısının rezorpsiyon bozukluğu nedeni ile doğumdan hemen sonra belirgin solunum sayısında artış görülür. Ancak semptomlar çoğunlukla 24 saat sonra düzelir. Akciğer grafisinde RDS'nin yaygın retikülo-granüler buzlu cam görünümünden ziyade, interstisyel ödemi temsil eden perihiler çizgilenmeler mevcuttur.

Pnömotoraks ve pnömomediastinum gibi pulmoner hava kaçağı sendromlarında da solunum sıkıntısı meydana gelir, ancak semptomların başlangıcı daha akuttur. Diğer klinik ipuçları arasında göğüs kafesinin asimetrik yükselmesi ve göğsün bir tarafında akciğer seslerinde azalma olması yer alır. Hava kaçağının derecesine göre, göğüs radyografisinde hiperlüsent alanlar görülür.

Perivasküler alanda sıkışan hava nedeni ile oluşan pulmoner interstisyel amfizem, çoğunlukla mekanik ventilatöre bağlı bebekleri etkiler. Klinik semptomların RDS'den daha geç oraya çıktığı bu tablonun karakteristik akciğer grafisi görüntüsü kistik lüsent alanlardır.

Yeni doğmuş bir bebekte özellikle grup B streptokok enfeksiyonuna bağlı gelişen bakteriyel pnömonin, klinik ve radyografik olarak RDS'den ayırt edilmesi zordur. Tercih edilen tedavi, solunum desteğine ek olarak ampirik antibiyotik tedavisidir.

Doğuştan siyanotik kalp hastalığı olan bebeklerde klinik olarak benzer semptomlara sahip olmakla birlikte radyolojik görüntü olarak yaygın retikülo-granüler görünüm yerine altta yatan anatomik anormalliğe ait bulgular görülmesi beklenir.⁵⁹

2.3.6.Respiratuvar distres sendromunda prognoz

Ekzojen sürfaktan tedavisi, antenatal steroid uygulanması ve yeterli solunum desteği ile tedavi edilen bebeklerin prognozu mükemmeldir. Tedavi yönetimi iyi yapılabilen RDS hastalarında mortalite oranı % 10'un altına düşerken, yapılan bazı çalışmalar ileri bakım ve destek tedavisi ile sağkalım oranının % 98'e kadar yükseltilebildiğini göstermiştir. Yaşamın ilk günlerinde şiddetli hipoksemiye neden olan tedavi edilmemiş RDS hastalarında, çoklu organ yetmezliği ve ölüm görülebilir.⁶⁰

2.3.7.Respiratuvar distres sendromunun komplikasyonları

Sürfaktan tedavisi RDS ile ilişkili morbiditeyi azaltmışken, diğer yandan birçok hasta RDS'nin akut seyri sırasında ve sonrasında komplikasyonlar yaşamaya devam etmektedir. İnvaziv mekanik ventilasyon veya pozitif basınçlı ventilasyona bağlı akut komplikasyonlar arasında pnömotoraks, pnömomediastinum ve pulmoner interstisyel amfizem gibi hava kaçağı sendromları yer alır.

RDS'li çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde intraventriküler-periventriküler kanama (İVK-PVK) ve patent duktus arteriosus (PDA) insidansında bir artış vardır. Ancak bunlar RDS 'den bağımsız olarak prematüriteyle de ilişkilidir. RDS'nin erken dönem komplikasyonları arasında sepsis, renal ve kardiyak yetmezlikler de yer alırken, kronik komplikasyonlar arasında en sık bronkopulmoner displazi (BPD) ve prematüre retinopatisi (ROP) görülür.

RDS'nin kronik bir komplikasyonu olan BPD'nin patofizyolojisinde bozulmuş akciğer gelişimi, akciğer hasarı ve enflamasyonu yer alır. Sürfaktan eksikliğinin yanı sıra, prematüre bebeğin olgunlaşmamış akciğeri, yaralanma ve iltihaplanmaya karşı daha hassastır. Ayrıca mekanik ventilasyona sekonder hiperoksidan kaynaklanan oksidatif stres ve akciğerin azalmış antioksidan yetenekleri yüzünden artan proinflamatuvar sitokinler ve transforming growth factor -1 (dönüştürücü büyüme faktörü-1, TGF-1) akciğerde daha fazla hasara yol açar.⁶¹

Nörogelişimsel gecikme, özellikle uzun süreli mekanik ventilasyon uygulanan bebeklerde santral sinir sisteminin bir başka komplikasyonudur. Serebral palsi insidansı RDS'li bebeklerde artmışken, gebelik yaşı arttıkça insidans azalmıştır. Mekanik ventilasyonda kalma süresi arttıkça, hem serebral palsi hem de nörogelişimsel gecikme oranları artmaktadır.⁶²

2.3.8.Respiratuvar distres sendromunun yönetimi ve tedavisi

RDS'ye yönelik ilk müdahale doğum öncesinde başlar. Kadın hastalıkları ve doğum uzmanı ile çocuk sağlığı ve hastalıkları uzmanı perinatal takımın birer parçasını oluşturur ve ortak hareket ederek anne ve bebek sağlığına yönelik yararlı olabilecek kararları verirler.⁶³

Riskli olan prematüre bebeklerin doğumu, stabilizasyonu ve gerekebilecek solunum destek tedavisi (non-invaziv ventilasyon, sürfaktan tedavisi, entübasyon, mekanik ventilasyon) olanakları sunabilen merkezlerde gerçekleştirilmelidir. Şartlar uygunsa in-utero (maternal) nakil düşünülmelidir. Antenatal uygulanan steroidin etkisini görebilmek ve nakil için zaman kazanabilmek amacıyla erken doğum eylemini durdurmak için tokolitik ajanlar ve endikasyonlar dahilinde (erken membran rüptürü) antibiyotikler başlanabilir.^{64,65}

Antenatal steroid kullanımı ile neonatal mortalite ve RDS riskinin azalmasına ek olarak nekrotizan enterokolit (NEK), intraventriküler kanama , mekanik ventilasyon (MV) gereksinimi ve ilk 48 saatte sepsis gelişme riski de azalır. Antenatal steroid erken doğum tehdidi olan 23^{1/7} hafta ile 34^{6/7} hafta arasındaki tüm gebelere önerilir. Önerilen tedavi şemaları öncelikle 24 saat arayla 12 mg betametazon intramüsküler (toplam 2 doz), yok ise 12 saat arayla 6 mg deksametazon intramüsküler (toplam 4 doz) uygulanmasıdır. Steroid tedavisinin başlangıcından sonraki 24 saat ile 7. gün aralığındaki zaman tedavinin en etkili olduğu dönemdir.⁶⁶

ILCOR-2015 (*International Liaison Committee on Resuscitation-Uluslararası Resüsitasyon İrtibat Komitesi*) canlandırma gerektirmeyen tüm term ve preterm bebeklerde göbeğin en erken 30 sn sonra klemplenmesini önermektedir. Resüsitasyon işlemi gerektirenlerde ise kordonun klemplenme zamanı henüz netlik kazanmamıştır. Plasental transfüzyon, RDS riski olan prematüre bebeklerde resüsitasyonun ilk basamağını oluşturur. Kordun geç klemplenmesi daha yüksek hematokrit değerine, daha yüksek kan basıncına, daha az transfüzyon gereksinimine, daha az oranda NEK ve İVK gelişmesine imkan sağladığı için mümkün olduğu durumlarda bebek en az 30 sn (120 sn'ye kadar uzatılabilir) anne seviyesinde ya da altında tutularak plasento-fetal transfüzyona izin verilmelidir.^{67,68}

Erken doğan bebeklerde hipotermi morbidite ve mortalite riskini artırır. Hipotermide oksijen tüketimi artar, asidoz gelişir, canlandırma zorlaşır, koagülasyon değişkenleri olumsuz etkilenir ve fetal dolaşımdan neonatal dolaşıma geçiş gecikir. Prematüre bebeğe yapılacak tüm müdahaleler, mümkünse en az 25 -26 °C oda ısısında ve radyant ısıtıcı altında yapılmalıdır.⁶⁷

Çoğu çok düşük doğum ağırlıklı prematüre bebekte %21-30 oksijen kullanıldığında hedef satürasyon değerlerine ulaşılır. Canlandırmada kullanılacak oksijen, karıştırıcı ile kontrol edilerek verilmelidir. Spontan solunumu olan ileri pretermilerin önemli bir kısmında nazal kanül ya da maske ile doğum salonunda uygulanacak en az 5 cmH₂ O sürekli pozitif hava yolu basıncı (CPAP), oksijen ihtiyacı olmaksızın normal satürasyon düzeyine ulaşmayı sağlar.^{67,69}

Gebelik yaşı ≤32 hafta ve spontan solunumu olan prematüre bebeklerde doğum salonunda erken dönemde kontrollü CPAP uygulanması; hastayı stabilize ederek mekanik ventilatör ve sürfaktan gereksinimini azaltır. Doğum salonunda erken CPAP uygulamasının en az 5 cmH₂ O ile başlanması uygundur. Mümkün oldukça pozitif basınçlı ventilasyondan uzak durulmalı, pozitif basınç uygulaması apne ve bradikardi durumunda tercih edilmelidir. İmmatür akciğere zarar verebilecek düşük veya yüksek tidal volümlere dikkat edilmeli ve ihtiyaç halinde kontrollü ventilasyon uygulanmalıdır.^{67,70}

Ekzojen sürfaktan tedavisinin RDS'li prematüre bebeklerde mortalite ve morbiditeyi azalttığı bilinmektedir. Sürfaktan tedavisinin plasebo ile karşılaştırıldığı çalışmalarda, RDS şiddeti, mortalite, BPD ve hava kaçağı gibi pulmoner morbidite riskinin sürfaktan tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir.⁷¹

Türkiye’de bulunan doğal sürfaktanlar 3 adet olup özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir. RDS’li bebeklerde daha etkili olduğu gösterilmiş olan doğal sürfaktanlar, sentetik sürfaktanlara tercih edilmelidir.⁷² Hayvan türevli (doğal) sürfaktanların sentetik sürfaktanlara göre hava kaçaklarını ve ölüm oranını önlemede daha etkili olduğu gösterilmiştir. Sürfaktanın mortalite azaltıcı etkisi en çok gebelik yaşı 30 haftadan küçük veya doğum ağırlığı 1250 g’dan az olan prematürelde belirgindir.⁷¹ Her klinik farklı sürfaktan preparatları için farklı sonuçlar bildirirse de her üç doğal sürfaktan da RDS tedavisinde etkilidir. BPD insidansı ve uzun dönem nörogelişimsel sonuçlar açısından sürfaktan tipleri arasında fark yoktur.⁷³

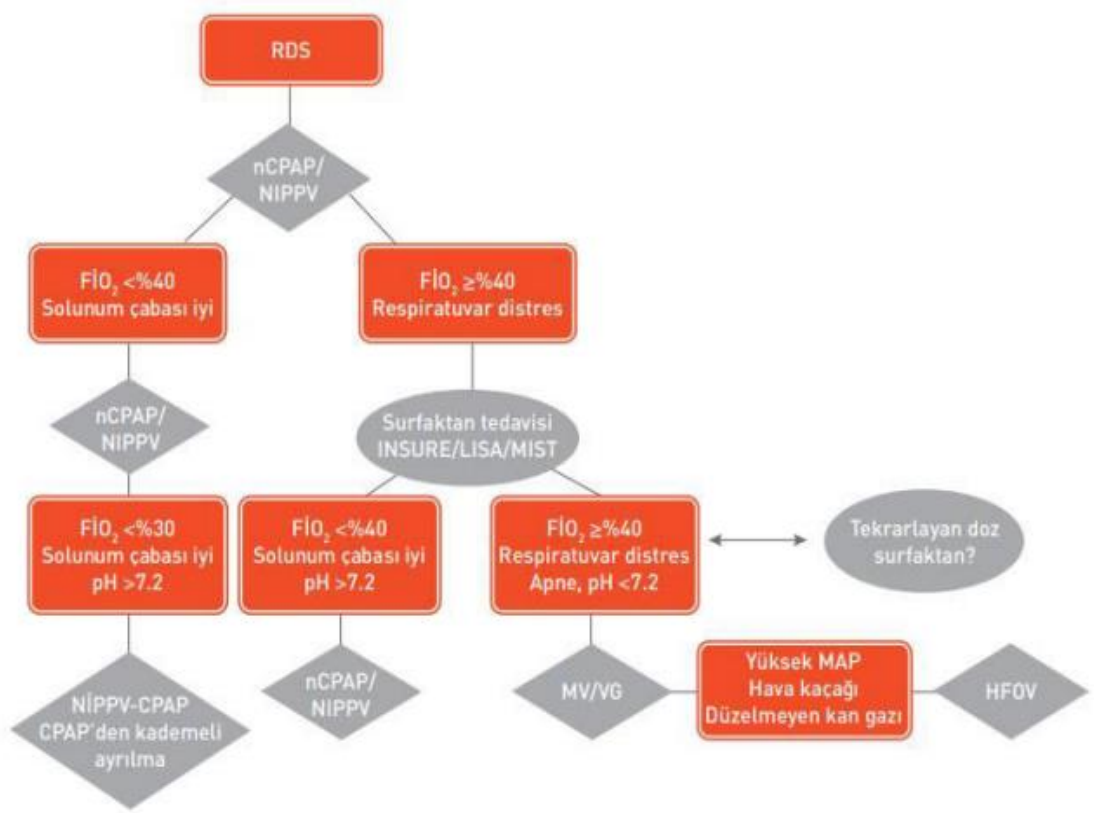
Tablo 2: Ülkemizde bulunan sürfaktan preparatları ve özellikleri.⁷²

Sürfaktan	Kaynak	Fosfolipid konsantrasyonu	Protein konsantrasyonu	Başlangıç dozu	Tekrarlayan doz şeması
Poraktant alfa	Kıyılmış domuz akciğeri, likit jel kromatografi ile lipid ayrıştırılma ve saflaştırılması	76 mg/mL	1 mg/mL (0,45 mg/mL Sürfaktan B proteini ve 0,55 mg/mL sürfaktan protein C)	1,25-2,5 mL/kg	1,25 mL/kg 12 saatte bir, en fazla 2 tekrar, toplam 3 doz Toplam önerilen doz başlangıç ile birlikte 5 mL/kg
Beraktant	Kıyılmış sığır akciğeri, lipid ayrıştırılması. DPPC, palmitik asit ve tripalmitin takviyesi	25 mg/mL	<1 mg/mL (sürfaktan protein B ve C)	4 ml/kg	4 ml/kg , en erken 6 saatte bir, en fazla 3 tekrar. İlk 48 saatte, toplam 4 doz
Kalfaktant	Buzağı akciğeri lavajı, lipid ayrıştırma	35 mg/mL	0,7 mg/mL (0,26 mg/mL sürfaktan protein B ve 0,44 mg/mL sürfaktan protein C)	3 mL/kg	3 mL/kg , 12 saatte bir, en fazla 2 tekrar Toplam 3 doz

Sürfaktan verilme işlemi sırasında ve sonrasında hasta monitörize edilmelidir. Endotrakeal tüpte obstrüksiyon, apne, desatürasyon, bradikardi, taşikardi, sürfaktan reflüsü, volüt travma, hiperventilasyon riski, pulmoner hemoraji, sürfaktanın tek akciğere gitmesi ve patent duktus arteriozus (PDA) tedavi gereksiniminde artış açısından hasta yakından izlenmelidir. Sürfaktan tedavisinden sonra hastanın klinik durumu izin veriyorsa 1-6 saat trakeal aspirasyon uygulanmamalıdır.

Hastanın tedaviye yanıtı; FiO₂ gereksiniminde azalma, solunum sıkıntısının klinik belirtilerinde düzelme, solunum iş yükünde azalma, pulmoner mekaniklerde düzelme, solunum destek tedavisinde [“Peak inspiratory pressure” (PIP), “positive end-expiratory pressure” (PEEP), “mean airway pressure” (ortalama hava yolu basıncı-MAP)] azalma, kan gazında ve radyolojik incelemelerde (akciğer grafisi, ultrasonografi) düzelme ile değerlendirilir.⁶³

Respiratuvar distres sendromu bulguları gelişen ve sürfaktan gereksinimi ortaya çıkan bebeklerde tedavinin mümkün olan en kısa zamanda (doğum sonrası en geç 1-2 saat içinde) uygulanması akciğeri koruma yönünden önerilen güncel stratejidir.⁷⁴ Sürfaktan tedavisi ve non-invaziv solunum desteği uygulamaları ile ilgili olarak Şekil 2'deki algoritmanın izlenmesi önerilir.⁶³



Şekil 5: Respiratuvar distres sendromunda solunum desteği ve sürfaktan tedavisi algoritması.⁶³ CPAP: sürekli pozitif hava yolu basıncı; HFOV: yüksek frekanslı osilatör ventilasyon; MV: mekanik ventilasyon; nCPAP: nazal sürekli pozitif hava yolu basıncı; NIPPV: nazal aralıklı pozitif basınçlı ventilasyon; RDS: respiratuvar distres sendromu

RDS kliniğine yönelik non-invaziv solunum desteği tedavisi alan hastalarda, ortalama havayolu basıncı (MAP, PEEP) >7 cm H₂O olduğunda sürfaktan uygulanması düşünülmelidir. Respiratuvar distres sendromu klinik bulguları

gerilemeyen ve FiO₂ gereksinimi \geq %40 seyreden bebeklerin tekrarlayan surfaktan dozlarına gereksinimi vardır.⁷³

Sürfaktan tedavisi yenidoğanın entübasyonu ve MV konusunda deneyimli sağlık çalışanları tarafından yapılmalıdır. Prematüre bebeklerin çoğu sürfaktan uygulamasından sonra ekstübasyonu tolere edebilir ve CPAP veya nazal aralıklı pozitif basınçlı ventilasyon (NIPPV) ile takip edilebilir. Bu nedenle sürfaktan uygulama yöntemi olarak INSURE (entübe et, sürfaktan ver, ekstübe et) tercih edilebilir. INSURE yöntemi ile sürfaktan tedavisi alan aşırı prematüre bebeklerin kısa süreli de olsa pozitif basınçlı ventilasyona maruz kalmaları ve CPAP başarı oranlarında anlamlı bir artış olmaması gibi nedenlerden dolayı farklı sürfaktan uygulama yöntemleri geliştirme gereksinimi doğmuştur. Bu nedenle araştırmacılar, entübasyona gerek kalmadan sürfaktan uygulamak için daha az invaziv yollar aramaktadırlar.^{75,76}

Alternatif bir yöntem olarak endotrakeal tüp kullanılmadan daha ince bir kateter ile spontan solunum sırasında sürfaktan uygulanması düşünülmüştür. Kribs ve ark.⁷⁵ tarafından geliştirilen ve LISA (Less Invasive Surfactant Administration) diye adlandırılan yöntemde endotrakeal tüp yerine esnek bir kateter (beslenme sondası) magill forsepsi ile trakeaya yerleştirilip surfaktan uygulanmaktadır.

İkinci yöntem ise Dargaville ve ark.⁷⁶ tarafından geliştirilen, sürfaktan uygulama aracı olarak rijit bir 16G vasküler kateterin kullanıldığı “minimally invasive surfactant therapy” (MIST) adı verilen yöntemdir. Her iki yöntemde de sürfaktan uygulaması sırasında non-invaziv ventilasyon uygulamasına ara verilmemelidir. Daha az invaziv surfaktan uygulamaları ile ilgili meta-analizlerin tümünde ortak çıkan sonuç LISA/MIST yöntemlerinin ilk 72 saatte mekanik ventilasyona olan gereksinimi azalttığı yönündedir.⁷⁷ Laringeal maske ile faringeal damlatma ve aerosolizasyon gibi diğer non-invaziv yüzey aktif madde tedavisi yöntemleri ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Ancak bu yöntemlerin rutin kullanımını önermek için yeterli veri bulunmamaktadır.⁷⁸

RDS takibinde dikkat edilmesi gereken diğer medikal ve destekleyici tedaviler; antibiyotik kullanımı, kan basıncı-perfüzyon ve patent duktus arteriozus yönetimi, sıvı-ısı ve beslenme yönetimi ile kafein tedavisidir.^{79,80} Kafeinin prematüre apnesi tedavisindeki etkinliğinin yanı sıra ekstübasyon başarısını arttırdığı, BPD’yi önlediği, PDA tedavisine gereksinimi azalttığı ve 18. ayda nörolojik sekel olmaksızın sağ kalım oranını arttırdığı saptanmıştır.⁸¹

2.4. Respiratuvar distres sendromu ve genetik

Sümfaktan fonksiyon bozuklukları, sümfaktan üretimini ve fonksiyonunu sağlayan proteinleri etkileyen genetik mutasyonlar sonucunda meydana gelir. Sümfaktanın yapısında bulunan proteinler sümfaktan proteinleri A, B, C, D ve ayrıca sümfaktan fonksiyonu için gerekli olan ABCA3 ve TTF-1'dir.^{82,83}

Bunlardan ABCA3, SP-B, SP-C ve TTF-1 proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar yenidoğan dönemindeki solunum yetmezliğinden çocukluk ve erişkin yaş grubundaki interstisyel akciğer hastalıklarına kadar uzanan farklı klinik prezentasyonlarla giden, sporadik veya ailesel akciğer hastalıklarına yol açar.⁸⁴ Sümfaktan proteinlerinin ve genetik sümfaktan fonksiyon bozukluklarının genel özellikleri , klinik bulguları, pronoz ve tedavileri Tablo 3 ve Tablo 4'te özetlenmiştir.^{85,86}

Tablo 3: Sümfaktan proteinlerinin genel özellikleri ve genetik eksikliklerinin karşılaştırılması.^{85,86}

Gen/Protein	Fonksiyon	Genetik	Klinik bulgular	Başlangıç yaşı
SFTPA1 ve SFTPA2/SP-A	Patojen temizlenmesi Doğal bağışıklık İnflamatuvar regülasyon Tübüler myelin stabilizasyonu	Kromozom 10p22.3 Kalıtım bilinmiyor	İdiyopatik pulmoner fibrozis Adenokarsinom	Erişkin
SFTPB/SP-B	Yüzey gerilimini azaltmak Sümfaktan organizasyonu/ hemostazı	Kromozom 2p11.2 Otozomal resesif	Ağır RDS	Yenidoğan
SFTPC/SP-C	Yüzey gerilimini azaltmak Sümfaktan organizasyonu/hemostazı	Kromozom 8p21.3 Otozomal dominant	RDS Amfizem	Çocuk veya genç erişkin
SFTPD/SP-D	Patojen temizlenmesi Doğal bağışıklık İnflamatuvar regülasyon Sümfaktan metabolizması	Kromozom 10q22.3 Kalıtım bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
ABCA3/ABCA3	Sümfaktanın glikolizasyon, paketlenme ve sekresyonu	Kromozom 16p13.3 Otozomal resesif veya uniparental disomi	Ağır RDS	Yenidoğan
NKX2/TTF-1	Sümfaktan genlerinin regülasyonu (SFTPA, SFTPB, SFTPC, SFTPD)	Kromozom 14q13.3 Otozomal dominant	RDS Tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları Hipotiroidizm Nörolojik bozukluklar	Yenidoğan veya çocuk

RDS: Respiratuvar distres sendromu

Tablo 4: Genetik sürfaktan disfonksiyonlarında klinik bulgular, prognoz ve tedavi ^{85,86}

	Klinik bulgular	Prognoz	Tedavi
SFTPb	<ul style="list-style-type: none">Sürfaktan tedavisi dahil destek tedavilerine yanıt vermeyen term bebekte neonatal akut solunum distresi	<ul style="list-style-type: none">Genellikle ilk 6 ayda ölümNadiren hafif fenotipteki çok az sayıda hastada daha uzun yaşam süresi	<ul style="list-style-type: none">Destek tedavisiNutrisyonel destekAkciğer nakli (tek kesin tedavi)
ABCA3	<ul style="list-style-type: none">Değişken- SFTPb gibi akut prezentasyon, subakut kötüleşme veya erişkin dönemde orta-stabil fenotip	<ul style="list-style-type: none">Çocukluk döneminde yüksek mortalite ile giden akut prezentasyonBüyük çocuklarda daha iyi uzun dönem sonuçlar	<ul style="list-style-type: none">Destek tedavisiNutrisyonel destekHidroksiklorokinSteroidAkciğer nakli
SFTPC	<ul style="list-style-type: none">Değişken- akut prezentasyonGenelde erişkin dönemde asemptomatik veya minör semptomatik fenotip	<ul style="list-style-type: none">Hafif akciğer fonksiyon azalmasıyla giden nadir olarak ölümcül seyreden kronik akciğer hastalığı	<ul style="list-style-type: none">Destek tedavisiNutrisyonel destekHidroksiklorokinSteroidAkciğer nakli
NKX2-1	<ul style="list-style-type: none">Solunum ve sinir sistemi tutulumu ve hipotiroidi triadı%54 vakada solunum sistemi semptomları (sıklıkla neonatal solunum distresi, tekrarlayan pulmoner enfeksiyonlar ve kronik interstisyel akciğer hastalığı)	<ul style="list-style-type: none">Mortalite diğer mutasyonlara göre daha düşükAkciğer tutulumu ağırsa mortalite daha yüksek	<ul style="list-style-type: none">Destek tedavisiNutrisyonel destekTiroid hormon replasmanıHidroksiklorokinSteroidGenellikle akciğer nakli gerekmez

2.4.1.ABCA3 gen mutasyonları

İnsanlarda genetik sürfaktan disfonksiyonuna en sık yol açan mutasyondur. ^{87,88} ABCA3 mutasyonuna bağlı fosfolipid alımında bozukluk nedeni ile proSP-B'nin SP-B'ye dönüşümünde bozulma ve uygun SP-C miktarının azalması gibi çok farklı etkiler görülebilir. ^{89,90} Ağır ABCA3 ilişkili hastalığı olan bebeklerden izole edilen sürfaktanda lipid komponentlerinin miktarının azalmış olduğu ve yüzey gerilimini azaltma özelliklerinin de bozulmuş olduğu görülmüştür. ⁹¹

ABCA3'ün günümüze kadar 200'den fazla mutasyonu tanımlanmıştır ve mutasyonunun türlerine bağlı olarak hastalığın seyri ve şiddeti değişmektedir. En sık saptanan mutasyonlar Ortadoğu'da c.4545C>G (p.Tyr1515) ve Avrupa'da p.Glu292Val (p.E292V, c.875 A>T) mutasyonlarıdır. ⁹²⁻⁹³ Erken dönemde bulgu veren hastalarda ölümcül ilerleyici akciğer hastalığı, bebeklik veya çocukluk döneminde bulgu verenlerde ise takipne, öksürük, hipoksemi, gastro özofajial reflü, büyüme geriliği gibi durumlar görülebilir. ^{94,95}

2.4.2.SFTPb gen mutasyonları

SFTPb mutasyonuna neden olan hastalıkların çoğunda SP-B proteininde tam eksiklik vardır.^{96,97} Taşıyıcı olanlar asemptomatiktir. SP-B eksikliğinde proSP-C yeterli bölünemeyeceği için SP-C’de de eksiklik görülür.⁸² Sıklığı 1 000 000 canlı doğumda <1 ‘dir. Term bebeklerdeki diğer sebeplerin dışlandığı, tedaviye yanıtız solunum sıkıntısında SFTPb mutasyonu sıklığı %25’tir. Tanı alan hastaların yarısından fazlasında tespit edilmiş ve en sık saptanan SFTPb mutasyonu c.397delCinsGAA’dır (eski adı 121ins2).^{98,99}

Hastaların çoğunda doğumdan sonraki ilk birkaç günden 3-6 aya kadar görülebilen fatal solunum yetmezliği gelişebilir. Nadiren daha hafif semptomlara yol açan parsiyel SP-B eksikliği görülür.^{100,101} SFTPb mutasyonu, akciğer nakli yapılamayan hastalarda %100 ölümcül seyredir.⁹⁴

2.4.3.SFTPC gen mutasyonları

SFTPb mutasyonlarına göre daha hafif seyirlidir. Gen mutasyonu sonucunda fonksiyon kaybından ziyade, yanlış katlanmış proteinlerin birikimine bağlı bozulmuş endoplazmik retikulum fonksiyonu, proteozom disfonksiyonu ve tip II alveolar epitelyal hücre apoptozisi gibi etkiler görülür. Aile öyküsü olmayan de novo mutasyonlar da bildirilmiştir. Sıklığı henüz net olarak bilinmemektedir.^{87,102}

En sık saptanan SFTPC mutasyonu p.Ile173Thr (ve ya c.218T>C)’dir.^{103,104} Aynı aile bireylerinde bile akciğer hastalığının başlangıç zamanı ve şiddeti değişkenlik gösterebilir.^{102,103} Klinik semptomların başlama zamanı üç aydan erişkin dönemine kadar değişmektedir.^{104,105} Bazı hastalarda 50-60 yaşlara kadar hiçbir semptom olmayıp daha sonra pulmoner fibrozis şeklinde ortaya çıkabilir.¹⁰⁶

2.4.4.NKX 2.1 gen mutasyonları

NKX2.1geni 14. kromozomun üzerinde bulunur. Homeobox (homeodomain: 180 baz çifti uzunluğunda bir DNA dizisi) içeren bu gen 189-253. amino asitleri kodlar. Otozomal dominant kalıtılan bu gen ile ilişkili bir bozukluğu olan bireylerin çoğunun etkilenmiş bir ebeveyni vardır. NKX2.1 geni tiroid bezi, beyin ve akciğerde üretilir. NKX2.1 geni; akciğer, tiroid ve beyinin embriyogenezi sırasında organ ve doku

farklılaşmasında anahtar rol oynar. Homeodomain içeren proteinler, spesifik DNA sekanslarına bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu kontrol ederler.¹⁰⁷

NKX2.1 geni ayrıca pulmoner sürfaktan proteinlerinin homeostazında da rol oynar. NKX2.1 geni akciğerin yapısal gelişimi ile yüzey aktif madde proteini SP-B, SP-C ve ABCA3'ün fonksiyonel protein yapılarına dönüşmeleri için gereklidir. Bu gendeki mutasyonlar, yenidoğan bebeklerde ve büyük çocuklarda interstisyel akciğer hastalığı, RDS ve solunum yetmezliği gelişmesine neden olur. Etkilenen hastalarda solunum sıkıntısı yenidoğan döneminde başlayabilir ve hayatın erken dönemlerinde ölümle sonuçlanabilir.¹⁰⁸

NKX2.1'in tam gen mutasyonu veya fonksiyon kaybına neden olan mutasyonları, neonatal akciğer sorunları dışında hipotonisite, gelişimsel gerilik, kore, nöbet gibi nörolojik problemler veya hipotiroidizm ile de bulgu verebilir. Mutasyonlu bireylerin yaklaşık %40'ında her üç organ sisteminin belirtilerinin bir arada görüldüğü "Beyin-Tiroid-Akciğer" sendromu gelişir.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ İzole hipotiroidizm nadiren (<%2) görülürken, mutasyonu olan bireylerin yaklaşık %30'unda iki organ sistem belirtileri vardır. NKX2.1 gen mutasyonu olan hastaların %6'sında yalnızca pulmoner belirtiler mevcuttur.¹⁰⁹ NKX2.1 mutasyonları veya delesyonlarından kaynaklanan akciğer hastalığı, başlangıç zamanı ve hastalığın şiddeti açısından oldukça değişkendir.¹¹

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırmanın Tipi, Yeri ve Hastaların Seçimi

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde prematüre doğum ve RDS nedeni ile takip edilen hastalar ve RDS dışı başka nedenlerle başvurmuş, prematür doğan yenidoğanlar çalışmaya alınmıştır. Çalışmamız kesitsel ve genetik prospektif bir araştırmadır. Hasta ve yakınlarına, yaptığımız araştırma ile ilgili sözlü ve yazılı bilgi verildikten sonra, yazılı olarak sunulan bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu onaylayan gönüllüler çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri

Çalışmamıza Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde prematüre doğum ve RDS nedeni ile takip edilen 32 hasta ve RDS dışı başka nedenlerle başvurmuş, prematür doğan ve çalışmaya katılmaya gönüllü olan 18 prematüre yenidoğan kontrol grubu olarak alınmıştır.

Hasta grubu için aşağıdakilerden en az bir tanesi pozitif olanlar çalışma dışı bırakıldı.

- a) 37 haftadan sonra doğan yenidoğan bebekler
- b) 37 haftadan önce doğan yenidoğan ama RDS tanısı almayan bebekler
- c) Bilgilendirilmiş olur vermeyen hastalar

3.3.Araştırmanın Genel Planı

Çalışma için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Etik kurul onay tarihi:15.06.2020 ve Onay numarası:2020/116). Araştırmamız BAP 2021.04.03.11.55 numaralı proje ile Düzce Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir.

Hasta ve yakınlarına yaptığımız araştırmanın konusu ve amacıyla ilgili sözel olarak bilgi verildikten sonra çalışmaya dahil olmayı kabul eden katılımcı ve yakınlarından bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile onam alındı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların gestasyon yaşı, doğum ağırlığı, boyu, baş çevresi, 1.ve 5.dk APGAR skoru, sürfaktan verilir verilmemesi, verilen sürfaktan sayısı, yatış süresi, entübe takip süresi, anne kan grubu, bebek kan grubu, annenin gravite-parite-abortion-exitus sayısı, annede hastalık öyküsü, bebeklerde ek hastalık

öyküsü, antenatal steroid yapıp yapılmadığı, yapılan steroid sayısı, annenin yaşı retrospektif olarak incelenerek kaydedildi.

Çalışmaya dahil edilen hastalardan genetik analiz için ekstra kan alınmadı. Rutin amaçlı alınan kanlardan geriye kalan atık kanlar kullanıldı. Atık kanlardan EDTA'lı (Etilenediaminetetraasetik asit) tüpe 2'şer cc kan örneği alındı. Örnekler, örnek toplama işlemi bitinceye kadar -20°C'de saklandı.

3.4.Genetik Çalışmalar

DNA izolasyonu genetik çalışma için çalışmaya katılan tüm bireylerin periferik kan örneklerinden yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinden hedeflenen gen bölgeleri, bu bölgelere özel olarak tasarlanan primerler kullanılarak çoğaltıldı ve sonrasında saflaştırma işlemi yapıp hedefe yönelik yeni nesil dizi analizi [next generation sequencing (NGS)] tekniğiyle bu bölgelerin moleküler genetik analizi yapıldı. Yapılan işlemlerin detayları aşağıda sunulmuştur.

3.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Dizisi bilinen bir DNA bölgesinin çok kısa bir sürede milyonlarca kopyasını elde etmeyi sağlayan ve in vitro çoğaltılmasına olanak sunan bir yöntemdir.

Nükleik asit dizilerinin canlı dışında, kolay bulunabilen bir ekipman ile kısa zamanda ve fazla miktarda çoğaltılmasına olanak sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu keşfiyle bir çok uygulamanın önü açılmıştır. PCR, moleküler genetik için devrim niteliğinde bir buluş olup DNA'nın üstel olarak çoğaltılmasını sağlar. Teorikte sadece 20 siklуста 1 milyon kez çoğalma elde edilebilir. Ayrıca ısıya dayanıklı DNA polimeraz enziminin kullanılması da PCR için otomasyonun uygulanmasını kolaylaştırmıştır.

PCR yöntemi, çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA veya RNA'nın bir tüp içerisine gereken diğer maddelerle birlikte konularak üç farklı ısıda, bir siklus içerisinde tutulmasına ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır.

İşlem sırasında ortama konan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı veya bundan başka ısıya dayanıklı polimerazlar, uygun sentez sıcaklığı olarak kabul edilen 72-74°C'de hedef DNA'ya yapışmış primerlerin ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin kopyasını sentezler. Tekrarlayan sentezleme işlemi sonunda çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA/RNA molekülü, PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi bir yöntemle görüntülenebilir.

DNA'nın sarmal iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denatürasyon) polimeraz zincir reaksiyonu siklusunun ilk basamağıdır. Amplifiye edilecek olan kalıp DNA başlangıçta 95-100 °C'ye kadar ısıtılır ve sonra çift iplikçikli DNA, iki adet tek iplikçiğe bölünmüş olur.

Primerler 15-30 bazlık oligonükleotidlerdir. Siklusun ikinci basamağında sıcaklığın 50 °C'ye düşürülmesi ile primerler tek iplikçik halindeki kalıp DNA'ya özgül olarak bağlanırlar (annealing). Primerlerden biri kendine ait 5' ucu ile hedef DNA'lardan birinin 3' ucuna bağlanırken, diğer primerler de ikinci tek iplikçik DNA'nın anti paralel olarak diğer ucunda bulunan 3' ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5'-3') bağlanmış olurlar. Üçüncü basamakta 72-74 °C'de sentez veya zincir uzaması sağlanmış (polimerizasyon) olur. Taq polimeraz enzimi ile primerlerle sınırlandırılmış olan bölgenin amplifikasyonu yapılır. Yeni şekillenmiş olan sarmal, orijinal hedef DNA'dan denatürasyon yolu ile ayrılır. Bu üç basamak bir siklus anlamına gelmektedir ve her spesifik DNA parçası kopyalanarak iki katına çıkarılmış olur. Daha sonra yeni sentezlenen DNA da bir sonraki siklusta kalıp olarak kullanılır ve böylece bu DNA parçaları logaritmik (üssel) olarak çoğaltılmış olur. Burada çalışılacak DNA parçasının her iki ucunun nükleotid diziliminin bilinmesi esastır. Çünkü bu bilgi, ilgilenilen DNA parçasının her iki ucu için primer geliştirilmesine olanak sağlar. Primerler oluşturulduktan sonra iki uç arasındaki bölüm PCR kullanılarak çoğaltılabilir.

Uzama ve denatürasyon aşamalarındaki ısılar farklılık göstermezken, istenen DNA/RNA dizisindeki AT/GC içeriğine göre bağlanma ısıları farklılık gösterir. Bu üç aşamanın yaklaşık olarak 30-45 siklus kadar tekrarlanması sonucunda, hedef DNA/RNA parçasının milyonlarca kopyası elde edilmiş olur.

PCR için gerekli olanlar: DNA/RNA örneği, nükleotid bazlar (A,T,G,C), bir çift sentetik primer, uygun pH, DNA polimeraz enzimi ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımıdır.

3.4.2.DNA izolasyonu

Hastaya ait EDTA'lı periferik kan örneğinden spin kolon yöntemi ile DNA izole edildi. DNA izolasyonu için Alfagen Kandan DNA izolasyon kiti kullanıldı. DNA izolasyonu amacıyla geliştirilmiş bu kit için uygulanan basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. 1,5 ml'lik tüp içerisine 100 µl tam kan konuldu.
2. 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

3. 180 µl Tissue Lysis Buffer (REAL-E22) ve 20 µl proteinaz K (20 mg / ml) konuldu.
4. 55 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
5. 200 µl Lysis / Binding Buffer (REAL-REA01) konuldu.
6. 70 °C’de 10 dakika daha inkübe edildi.
7. 300 µl saf izopropanol (MP Biomedicals -No: 19400690) konuldu.
8. Karışım toplama tüpü (REAL-R30) içerisine yerleştirilen kolon (REAL-RSC01) içerisine konuldu.
9. 8000 rpm’de 60 saniye çevrildi (Eppendorf–Centrifuge 5415R).
10. Toplama tüpü atıldı, kolon yeni bir toplama tüpüne konuldu.
11. 500 µl Disinhibition Buffer (REAL-REA03) konuldu..
12. 8.000 rpm’de 60 saniye çevrildi (Eppendorf – Centrifuge 5415R). Toplama tüpü atık kabına boşaltıldı.
13. 500 µl Wash Buffer (REAL-REA04) konuldu.
14. 8.000 rpm’de 60 saniye çevrildi (Eppendorf – Centrifuge 5415R). Toplama tüpü atık kabına boşaltıldı.
15. 13. ve 14. basamaklar tekrar edildi.
16. En yüksek hızda 90 saniye çevrildi (Eppendorf – Centrifuge 5415R). Toplama tüpü atılarak kolon 1,5 ml’lik steril tüpe yerleştirildi.
17. 70°C’ye ısıtılmış 10 µl Elution Buffer (REAL-REA05) kolona eklendi. 70°C’de 60 saniye inkübe edildi.
18. En yüksek hızda 90 saniye çevrildi (Eppendorf–Centrifuge 5415R).
19. 17. ve 18. basamaklar iki defa tekrarlandı.
20. Kolon atıldı. 1,5 ml’lik tüpte izole edilen DNA vardır.

3.4.3.Primerlerin tasarımı

Çalışmaya dahil olan bireylerde NKX2.1 geninin yeni nesil dizi analizi yapılacağından, bu genlere özgü ileri ve geri primerlerin tasarımında “PRIMER© – Primer Designer v.2.0 (Scientific & Educational Software)” yazılımı kullanılarak primer sentezi yapıldı.

3.4.4.Çalışma stratejisi

Illumina-MISEQ yeni nesil dizileme cihazında havuzlama yöntemi ile DNA'lar eşit oranda karıştırılarak değerlendirildi, mutasyon olan ekzonlar yeni nesil dizileme tekniği kullanılarak her bir hasta için ayrı ayrı değerlendirildi.

3.4.5. PCR optimizasyonu

Hedeflenen gen bölgelerinin amplifikasyonları PCR reaksiyon karışımları kullanılarak yapıldı. PCR reaksiyon karışım içeriği aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5: PCR reaksiyon karışımı

İçerik	Her bir reaksiyon için miktar (µl)
Kalıp DNA (20-50 ng/µl)	2
dH ₂ O	15
5x Tampon (MgCl ₂ 'li)	5
dNTP karışımı, her biri 10mM (ThermoFisherScientificInc.)	0,5
İleri Primer (5 µM)	1
Geri Primer (5 µM)	1
Phire II Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.)	0,5
Toplam miktar	25

PCR reaksiyonu için hazırlanan bu karışım PCR tüplerine yerleştirilerek T100 (BioradInc.) termal döngü cihazlarına koyuldu ve aşağıdaki protokol uygulanarak amplifikasyon işlemi yapıldı.

Tablo 6: Yapılacak PCR işlemi için belirlenen döngüleri ve sürelerini gösteren protokol

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95	1	1
95	1/6	
60	1/6	45
72	1/3	
72	1	1
4	sınırsız	1

3.4.6. Yeni nesil dizi analizi (Next-Generation sequencing) (NGS)

Yeni nesil dizi analizi yöntemi, DNA'nın bir çok enzimatik reaksiyon sonucunda parçalara bölünerek çok sayıda DNA parçasıyla bir kütüphane oluşturulması ve sonrasında bu DNA parçalarının replikasyonu esasına dayanmaktadır. *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* tarafından yapılan araştırmalara göre günümüzde 6000'den fazla tek gen hastalığı bulunmaktadır ve bu hastalıkların yaklaşık %70'inin moleküler temeli bilinmemektedir. Ancak NGS yönteminin kullanılmasıyla birçok hastalığın moleküler temelini anlaşılması konusunda büyük ilerlemeler elde edilmiştir. NGS teknolojileri ile tüm ekzom ve tüm genom dizilenmesinin yanı sıra hedefe yönelik olarak oluşturulan NGS panelleri ile etyolojisi genetik heterojenite gösteren hastalıklar için çok sayıda gen aynı anda dizilenebilmektedir.

Hastalığa sebep olan genetik patolojinin ortaya konmasıyla hastalara daha doğru genetik danışmanlık verilebilmekte ve risk faktörü olan bireyler hızlıca taranabilmektedir. Ayrıca gelecekte yapılacak genetik araştırmalar neticesinde gen aktarımı yoluyla bu genlerin sağlıklı olanlarıyla değiştirilmesi veya hatalı genlerin fonksiyonlarının tekrar düzenlenmesi ile hastalarda kalıcı tedavi sağlanacağı öngörülmektedir.

3.5. Çalışma Prensipleri

DNA'nın enzimatik reaksiyonlar sonucunda parçalanarak çok sayıda DNA parçasıyla bir kütüphane oluşturulması ve sonrasında bu DNA parçalarının replikasyonu NGS yönteminin temelini oluşturur. Milyonlarca küçük DNA parçasının paralel sekanslama ile eş zamanlı olarak dizilenmesini sağlamakta; böylece genomdaki her bir

bazın birden çok kez okunması mümkün olmakta ve varyasyonlar daha doğru bir biçimde saptanabilmektedir. Kabaca; çalışma yapılacak biyolojik materyalin elde edilmesi, elde edilen biyolojik materyalden genomik DNA izolasyonu, izole edilen DNA'daki hedef bölgelerin seçilmesi, DNA'nın enzimatik reaksiyonla kesilerek DNA kütüphanesinin oluşturulması, kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılması, DNA parçalarının dizilenmesi, dizileme sonrası ham verinin oluşturulması, kaynak dizi üzerine haritalama, olası değişimlerin tanımlanarak yorumlanması, sanger dizileme veya NGS ile doğrulama ve segregasyon analizi, aday patojenik değişimlerin belirlenmesi ve elde edilen bu verilerin raporlanması basamaklarını içerir.

Çalışmamızda *Illumina miseq platform* kullanıldı ve hedefe yönelik dizileme (Targeted resequencing) yöntemi uygulandı. Bu yöntem için önce tasarlanan primer ile dizilenecek bölgeler çoğaltıldı, sonrasında barkodlanarak dizilendi.

Yeni nesil dizileme testi için kütüphane hazırlığında “illumina TruSeq DNA library prep kit” kullanıldı. Dizileme sonrası elde edilen ham okumaların kalite kontrolü FastQC yazılım aracı (v0.11.5) kullanılarak yapıldı. Düşük kaliteli okumaların (phred skor <20) ve adaptör kontaminasyonunun ortadan kaldırılması için *Trimmomatic* (v0.35) yazılım aracı kullanıldı. BWA (Burrows-Wheeler Alignment Tool) ile okumalar hg19 referans insan genomuna hizalandı. Picard ile dublike okumalar temizlendi ve BAM (Binary Alignment Mapping) dosyası oluşturuldu. IGV (Integrative Genomics Viewer) ile BAM dosyaları görüntülenerek ilgili varyasyonlar görsel olarak kontrol edildi. GATK (Genome Analysis Toolkit) analiz araçları ile SNP (single nucleotide differences-tek nükleotid farklılıkları) ve indel varyasyonlar belirlendi ve VCF (Variant Calling Format) dosyası oluşturuldu. Elde edilen VCF dosyasındaki varyasyonların annotasyonu için *Illumina BaseSpace Variant Interpreter* analiz platformu, *InterVar*, *Franklin*, *VarSome*, *ClinVar*, *OMIM*, *Pubmed* veri tabanları kullanıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayar ortamında SPSS 17.0 (*SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA*) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Araştırmanın tüm verileri için ilk olarak tanımlayıcı istatistikler uygulandı. Ölçümle elde edilen değişkenler için ortalama ve standart sapma şeklinde tanımlayıcı veriler hesaplandı. Başlangıç olarak verilerin normal dağılıma uygunluğunu belirlemek için Shapiro-Wilk testi yapıldı. Bu test sonucunda verilerin normal dağıldığı görüldü ($p < 0,05$) ve sonraki aşamada istatistiksel analiz için non-parametrik testlerin yapılması planlandı. Bunun

için ikili kıyaslamalarda Mann-Whitney U testi, ikiden fazla kıyaslamalarda ise Kruskal–Wallis testi kullanıldı. İki grup arasındaki ilişki ise korelasyon testi ile değerlendirildi. İsimsel/dereceli iki kategorik değişken arasındaki ilişki çapraz tablo (Cross Tab) analizi ile hesaplandı. Elde edilen 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterildi. Gruplar arasında anlamlı fark tespit edilen değişkenler için lojistik regresyon analizi yapılarak risk oranları (Odds Ratio,OR) ve bu değerlerin % 95 güven aralıkları (Confidence interval-CI) hesaplandı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi p değeri $<0,05$ olarak kabul edildi.



4.BULGULAR

Çalışmaya toplam 50 prematüre yenidoğan dahil edilmiştir. Bebekler RDS tanılı 32 (%64) prematüre yenidoğandan oluşan Hasta Grubu ile 18 sağlıklı prematüre yenidoğandan oluşan Kontrol Grubu (%36) olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. RDS tanılı 32 hastanın 20'si (%62,5) erkek, 12'si (%37,5) kız olup erkek/kız oranı 1,66 idi. Kontrol Grubundaki 18 hastanın 8'i (%44,4) erkek, 10'u (%55,6) kız olup erkek/kız oranı 0,8 olarak bulundu. Cinsiyet açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,217$).

Tablo 7'de Hasta ve Kontrol grubunun antropometrik değerleri ve klinik bulguları yer almaktadır. Hasta Grubunun gestasyonel yaşı ortalama $32,71\pm 2,03$ hafta iken Kontrol Grubunun $33,05\pm 7,05$ haftaydı. RDS'li hastaların gestasyonel yaşı, Kontrol Grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüktü ($p=0,022$). Hasta ve Kontrol Gruplarının 1.dk APGAR skoru ortalamaları sırasıyla $7,31\pm 1,28$ ve $7,61\pm 0,97$ idi. RDS'li hastalarla Kontrol Grubunun 1.dk APGAR skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,416$). Hasta ve Kontrol Gruplarının 5.dk APGAR skoru ortalamaları sırası ile $8,62\pm 0,97$ ve $8,94\pm 0,72$ idi. RDS'li hastalarla Kontrol Grubunun 5.dk APGAR skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,212$).

Doğum ağırlığı ortalaması Hasta Grubunda 2072 ± 692 gram iken Kontrol Grubunda 2272 ± 393 gram idi ($p=0,172$). Boy ölçümleri Hasta ve Kontrol Grubunda sırasıyla $43,93\pm 4,5$ cm ve $46\pm 1,74$ cm olarak tespit edildi ($p=0,102$). Hasta Grubunda baş çevresi $31,22\pm 3,05$ cm iken Kontrol Grubunda $32,2\pm 1,4$ cm idi ($p=0,241$). İki grup arasında doğum ağırlığı, boy ve baş çevresi değerleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

Sürfaktan verilmiş sayısı Hasta Grubunda ortalama $1,40\pm 0,6$ olarak tespit edildi. Hastanede yatış süresi ve entübe takip süresi Hasta Grubunda sırasıyla $25,3\pm 18,2$ gün ve $7,9\pm 4,9$ gün, Kontrol Grubunda sırasıyla $10\pm 4,56$ gün ve $0,27\pm 0,66$ gün idi. Yatış ve entübe süreleri Hasta Grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Kontrol Grubundan fazlaydı (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,000$).

Anneye ait parametreler incelendiğinde anne yaşı, gravite, parite, abortus sayısı, ölü doğum sayısı ve antenatal steroid uygulanması açısından Hasta ve Kontrol grubunda anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Anne yaşı Hasta Grubunda ortalama $29,62\pm 4,41$ yıl iken Kontrol Grubunda $28,44\pm 6,13$ yıl idi ($p=0,404$). RDS'li prematürelerin annelerinin gravite, parite, abortus ve ölü doğum değerleri sırası ile $2,71\pm 1,42$, $2,53\pm 0,95$, $0,53\pm 1,10$ ve $0,15\pm 0,36$ iken sağlıklı prematürelerin annelerinde

2,33±1,74, 2,38±1,50, 0,44±1,24 ve 0 olarak bulundu (p>0,05). Antenatal steroid uygulanma oranı Hasta Grubunda 1,6±0,51, Kontrol Grubunda 1,5±0,70 idi (p=0,802)(Tablo 7).

Tablo 7: Hasta ve Kontrol Grubunun antropometrik değerleri ve klinik bulguların karşılaştırılması

	Hasta Grubu Ortalama±SD (Min-Max)	Kontrol Grubu Ortalama±SD(Min-Max)	Z skoru	P
Gestasyonel yaşı (hafta)	32,71±2.,03(26-37)	33,05±7.05(5-36)	-2,294	0,022*
Apgar 1. dakika	7,31±1,28(5-9)	7,61±0,97(6-9)	-0,813	0,416
Apgar 5. dakika	8,62±0,97(7-10)	8,94±0,72(8-10)	-1,247	0,212
Doğum ağırlığı (gr)	2072,03±692,180(101;370)	2272,77±393,98 (158;326)	-1,364	0,172
Boy (cm)	43,93±4.51 (36-51)	46±1,74 (43-49)	-1,634	0,102
Baş çevresi (cm)	31,22±3,05 (25-37)	32,27±1,40 (30-35)	-1,173	0,241
Sürfaktan sayısı	1,40±0,6 (1;3)	-	-6,208	0,000*
Entübasyon süresi (gün)	7,90±4.96(0-20)	0,27±0,66(0-2)	-5,870	0,000*
Yatış süresi (gün)	25,31±18.20(7-73)	10±4,56(3-20)	-3,373	0,001*
Anne yaşı (yıl)	29,62±4,41(19-42)	28,44±6,13(19-44)	-0,834	0,404
Gravite sayısı	2,71±1,42(1-6)	2,33±1,74(1-8)	-1,249	0,212
Parite sayısı	2,53±0,95 (1-4)	2,38±1,50 (1-5)	-0,878	0,380
Abortus sayısı	0,53±1,10 (0-4)	0,44±1,24 (0-5)	-0,771	0,441
Ölü doğum sayısı	0,15±0,36 (0-1)	-	-1,750	0,080
Antenatal steroid sayısı	1,6±0,516(1-2)	1,5±0,70 (1-2)	-0,251	0,802

Min-Max: Minimum-Maximum **SD:** Standard deviation

Tablo 8’de Hasta ve Kontrol grubunun demografik özellikleri ve klinik durumları özetlenmiştir. Hasta grubunda resusitasyon uygulanan 15 (%46,8) hastanın 9’una (%28,1) pozitif basınçlı ventilasyon (PBV) uygulanmışken 6’sına (%18,7) kardiyopulmoner resüsitasyon (CPR) uygulanmıştır. Kontrol grubundaki 18 hastanın 8’ine (%44,4) PBV uygulanmıştır.

Doğum şekli açısından karşılaştırıldığında Hasta Grubundaki bebeklerin 27’si (%84,4) sezaryen (C/S), 5’i (%15,6) normal spontan vajinal yolla (NSVY) ile Kontrol Grubundakilerin 14’ü (%77,8) C/S, 4’ü (%22,2) NSVY ile doğmuştur. Yirmi yaş altı gebe ve 35 yaş üstü gebe oranları Hasta Grubunda sırasıyla 1 (%3,1) ve 2 (%6,3) olup

Kontrol Grubunda sırasıyla 1 (%5,6) ve 2 (%11,1)'dir. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Anne ve bebek ABO uyumsuzluğu Hasta Grubunda 7 (%21,9), Kontrol Grubunda 2 (%11,1) olguda tespit edildi ve gruplar arasında farklılık yoktu ($p>0,05$). Rh uyumsuzluğu ise Hasta Grubunda 2 (%6,3) , Kontrol Grubunda 5 (%27,8) olguda tespit edildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardı ($\chi^2=4,434$; $p=0,035$)(Tablo 8).

Tablo 8: Hasta ve Kontrol Grubunun demografik özellikleri ve klinik durumlarının karşılaştırılması

		Hasta Grubu(%)	Kontrol Grubu(%)	χ^2	P
Cinsiyet	Kız	12(%37,5)	10(%55,6)	1,524	0,217
	Erkek	20(%62,5)	8(%44,4)		
Sümfaktan	var	32(%100)	0(%0)	50,00	0,000*
	yok	0(%0)	18(%100)		
Resusitasyon	PBV(+)	9(%28,1)	8(%44,4)	4,290	0,117
	CPR(+)	6(%18,7)	0(%0)		
Doğum şekli	C/S	27(%84,4)	14(%77,8)	0,340	0,560
	NSVY	5(%15,6)	4(%22,2)		
Anne 20 yaş altı	var	1(%3,1)	1(%5,6)	0,177	0,674
	yok	31(%96,9)	17(%94,4)		
Anne 35 yaş üstü	var	2(%6,3)	2(%11,1)	0,370	0,543
	yok	30(%93,8)	16(%88,9)		
Rh uyumsuzluğu	var	2(%6,3)	5(%27,8)	4,434	0,035*
	yok	30(%93,8)	13(%72,2)		
ABO uyumsuzluğu	var	7(%21,9)	2(%11,1)	0,904	0,342
	yok	25(%78,1)	16(%88,9)		

Tablo 9’da Hasta ve Kontrol grubunun APGAR skoru karşılaştırmasına yer verilmiştir. Hasta ve Kontrol grubu 1. ve 5. dakika APGAR skoru açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($\chi^2=6,597$; $p=0,581$). Hasta Grubunun en düşük APGAR skoru olan 5-7, 1 (%3,1) hastada belirlenmişken en yüksek skor olan 9-10 8 (%25) hastada tespit edilmiştir. Diğer yandan Kontrol Grubunun en düşük APGAR skoru olan 6-8 sadece 2 (%11,1) hastada gözlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 9 : Hasta ve Kontrol Grubunun APGAR skoru yönünden karşılaştırması

	Hasta Grubu(%)	Kontrol Grubu(%)	χ^2	P
APGAR Skor	5-7	1(%3,1)	0(%0)	6,597 0,581
	5-8	1(%3,1)	0(%0)	
	6-7	2(%6,3)	0(%0)	
	6-8	6(%18,8)	2(%11,1)	
	7-8	6(%18,8)	3(%16,7)	
	7-9	2(%6,3)	4(%22,2)	
	8-8	1(%3,1)	0(%0)	
	8-9	5(%15,6)	5(%27,8)	
	9-10	8(%25)	4(%22,2)	

Tablo 10'da Hasta ve Kontrol Grubunun annelerinin hastalıkları karşılaştırılmıştır. Çalışmaya katılan her iki grubun annelerinin hastalıkları incelendiğinde gebelik sırasında Hasta Grubunda 3 (%9,4), Kontrol Grubunda 1 (%5,6) annede sadece erken membran rüptürü (EMR), sırasıyla Hasta ve Kontrol Grubunda 2 (%6,3) ve 1 (%5,6) annede de idrar yolu enfeksiyonu (İYE) + EMR olduğu belirlendi. Sadece Hasta Grubunda 1 (%3,1) annede gebelik kolestazı ve 1 (%3,1) annede de hipotiroidi tespit edildi. Kontrol Grubu içinde immün trombositopenik purpura (İTP) ve oligohidroamniyozu olan anne sayıları 1 (%5,6) iken Hasta Grubu annelerinde bu hastalıklar görülmedi.

Plasenta dekolmanı, preeklampsi, HPV, kanama bozukluğu ve gebelikte sigara kullanım öyküsü olan anne sayıları Hasta ve Kontrol grubunda eşit olup her iki grupta 1'er kişiydi. Gebelik süresince hiçbir hastalığı olmayan anne sayısı Hasta Grubunda 20 (%62,5) iken Kontrol Grubunda 9 (%50) idi. Hasta ve Kontrol Grubu anne hastalığı açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($\chi^2=11,486;p=0,570$)(Tablo 10).

Tablo 10 : Hasta ve Kontrol Grubunun anne hastalığı yönünden karşılaştırması

	Hasta Grubu(%)	Kontrol Grubu(%)	χ^2	P
EMR	3(%9,4)	1(%5,6)	11,48	0,570
İYE+EMR	2(%6,3)	1(%5,6)		
Kolestaz	1(%3,1)	0(%0)		
Hipotiroidi	1(%3,1)	0(%0)		
HPV	1(%3,1)	1(%5,6)		
İTP	0(%0)	1(%5,6)		
Kanama bozukluğu	1(%3,1)	1(%5,6)		
Oligohidroamniyoz	0(%0)	1(%5,6)		
Plasenta dekolmanı	1(%3,1)	1(%5,6)		
Preeklampsi	1(%3,1)	1(%5,6)		
Sigara	1(%3,1)	1(%5,6)		
Yok	20(%62,5)	9(%50)		

EMR: Erken membran rüptürü **HPV:** İnsan papilloma virüs

İTP: İmmün trombositopenik purpura **İYE:** İdrar yolu enfeksiyonu

Tablo 11’de Hasta ve Kontrol grubunun komplikasyon / ek hastalıklar yönünden karşılaştırması yapılmıştır. Bebek ek hastalığı açısından karşılaştırıldığında Hasta ve Kontrol Grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($\chi^2=16,299;p=0,362$). Sadece Hasta Grubunda 1’er (%3,1) bebekte 2.süfaktan sonrası arrest gelişimi, pnömotoraks, pulmoner hemoraji komplikasyonları görüldü. Yine aynı şekilde Hasta Grubunda sadece 1’er (%3,1) bebeğe hidronefroz, hipotiroidi, ASD (atrial septal defekt)+BPD, PDA+PFO (patent foramen ovale), NEK+PDA ve KKH tanısı konuldu.

Kontrol Grubunda ise Down sendromu, PEV (pes ekinovarus), IUGR (intrauterin gelişme geriliği) ve mekonyum aspirasyon sendromu (MAS) tespit edilen 1’er (%5,6) bebek varken, 2 (%11,1) bebekte inmemiş testis tespit edildi. Tüm olgular incelendiğinde ek hastalığı olmayan bebek sayısı hasta grubunda 22 (%68,8) iken kontrol grubunda 12 (%66,7) idi (Tablo 11).

Tablo 11: Hasta ve Kontrol Grubunun komplikasyon / ek hastalıklar yönünden karşılaştırması

	Hasta Grubu(%)	Kontrol Grubu(%)	χ^2	P
Arrest	1(%3,1)	0(%0)	16,29	0,36
Pulmoner hemoraji	1(%3,1)	0(%0)		
Pnömotoraks	1(%3,1)	0(%0)		
İkizi exitus	1(%3,1)	0(%0)		
ASD-BPD	1(%3,1)	0(%0)		
Down sendromu	0(%0)	1(%5,6)		
Hidronefroz	1(%3,1)	0(%0)		
Hipotiroidi	1(%3,1)	0(%0)		
IUGR	0(%0)	1(%5,6)		
İnmemiş testis	0(%0)	2(%11,1)		
KKH	1(%3,1)	0(%0)		
MAS	0(%0)	1(%5,6)		
NEK-PDA	1(%3,1)	0(%0)		
PDA-PFO	1(%3,1)	0(%0)		
PEV	0(%0)	1(%5,6)		
Yok	22(%68,8)	12(%66,7)		

ASD: Atriyal septal defekt **BPD:** Bronkopulmoner displazi **IUGR:** İntrauterin gelişme geriliği **KKH:** Konjenital kalp hastalığı **MAS:** Mekonyum aspirasyon sendromu **NEK:** Nekrotizan enterokolit **PDA:** Patent duktus arteriozus **PFO:** Patent foramen ovale **PEV:** Pes ekinovarus

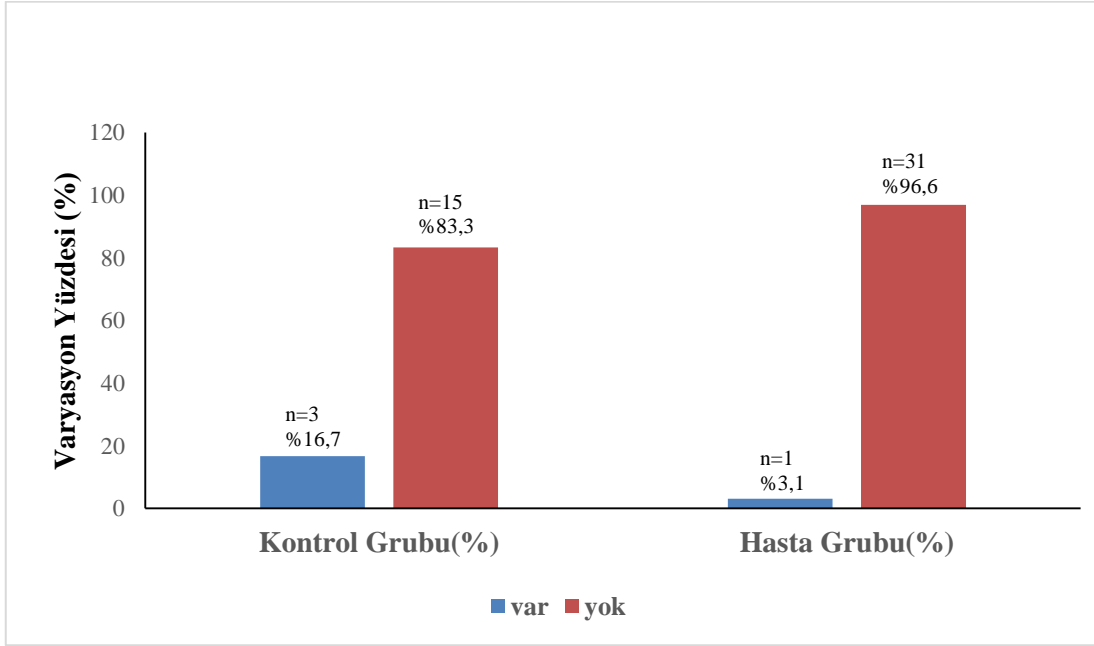
Hasta ve kontrol grubunda NKX2.1 genindeki genetik varyasyonlar incelendiğinde Hasta ve Kontrol Grubunda saptanan varyasyonlar Tablo 12’de gösterilmiştir. RDS’li hastaların 1’inde (%3,1) c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu, 3’ünde (%9,4) c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu, 12’sinde (%37,5) c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu, 1 (%3,1)’inde c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu, 2’sinde (%6,3) bileşik heterozigot (c.-85G>T NM_001079668.2 + c.446A>C NM_001079668.2 ve c.1031G>A NM_001079668.2 + c.446A>C NM_001079668.2) mutasyonu saptanmıştır. Hasta Grubunda en az bir varyasyonu olan hasta sayısı 17 (%53,1)’dir.

Kontrol Grubunda en az bir varyasyon saptanan çocuk sayısı 9 (%50) idi. Bunların 3’ünde (%16,7) c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu, 3’ünde (%16,7) c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu, 3’ünde (%16,7) c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu saptanmışken, c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu ve bileşik heterozigot mutasyonu Kontrol Grubunda saptanmamıştır (Tablo 12).

Tablo 12: Hasta ve Kontrol Gruplarındaki NKX2.1 genindeki genetik varyasyonlar

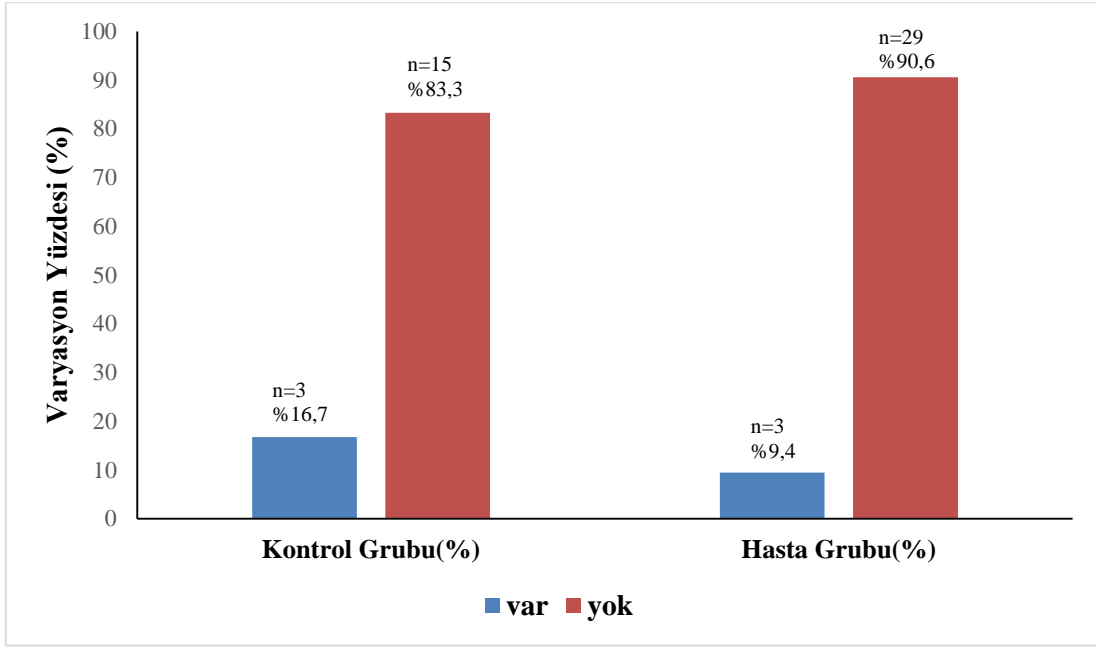
			Hasta Grubu(%)	Kontrol Grubu(%)	χ^2	P
c.-61C>T NM_003317.3 rs147791173	heterozigot	var	1 (%3,1)	3 (%16,7)	2,87	0,09
		yok	31(%96,9)	15(%83,3)		
c.-85G>T rs2076751 NM_001079668.2	heterozigot	var	3 (%9,4)	3 (%16,7)	0,58	0,44
		yok	29 (%90,6)	15(%83,3)		
c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865	heterozigot	var	12 (%37,5)	3 (%16,7)	2,38	0,12
		yok	20 (%62,5)	15(%83,3)		
c.1031G>A heterozigot NM_001079668.2	p.Gly344Asp	var	1 (%3,1)	0 (%0)	0,57	0,44
		yok	31 (% 96,9)	18 (%100)		
Bileşik Heterozigot		var	2 (%6,3)	0 (%0)	1,17	0,27
		yok	30 (%93,8)	18(%100)		
En az bir varyasyon olan		var	17 (%53,1)	9 (%50)	0,04	0,83
		yok	15 (%46,9)	9 (%50)		

Şekil 6’te c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu kıyaslanmıştır. c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 2,870$; $p=0,090$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 6,2 kat daha düşüktü (OD:6,2 CI:0,5-64,7).



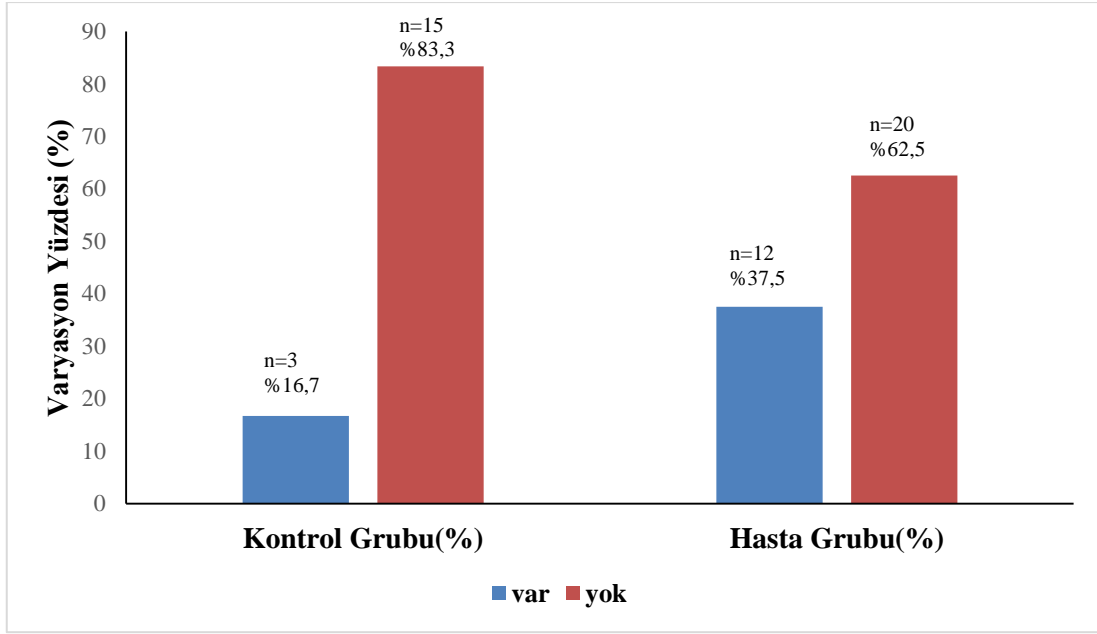
Şekil 6: c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 7’te c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu karşılaştırması yapılmıştır. c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 0,580$; $p=0,446$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,9 kat daha düşüktü (OD:6,2 CI:0,34-10,76).



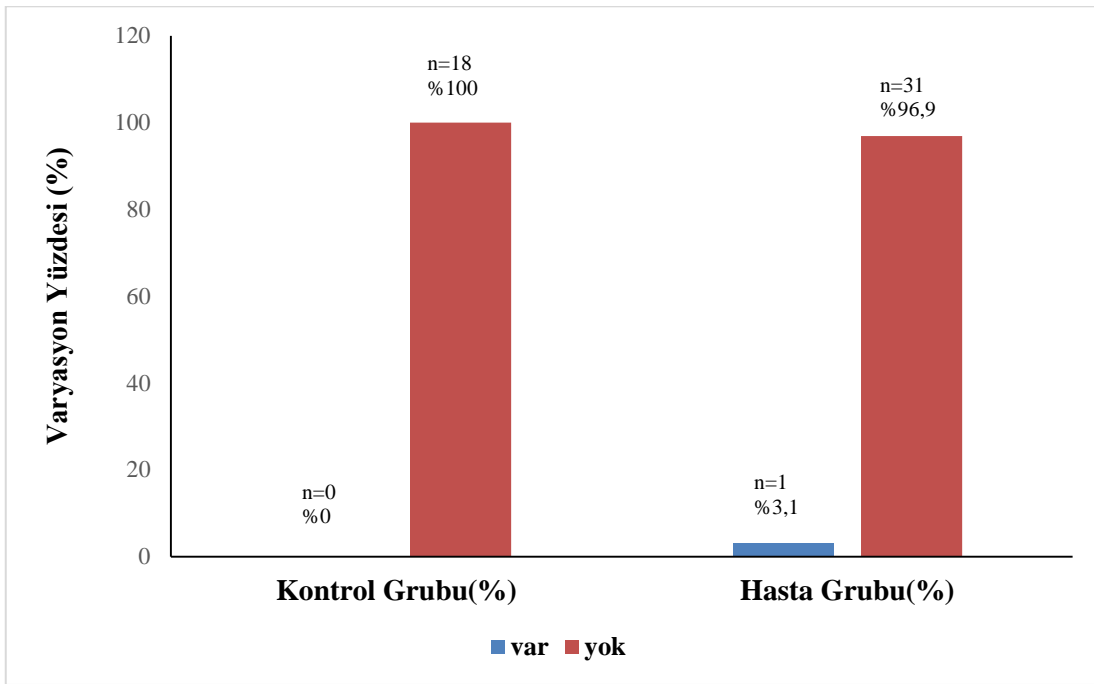
Şekil 7: c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 8'te c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu kıyaslaması yer almaktadır. c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 2,381$; $p=0,123$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 0,3 kat daha yüksekti (OD:0,333 CI:0,08-1,39).



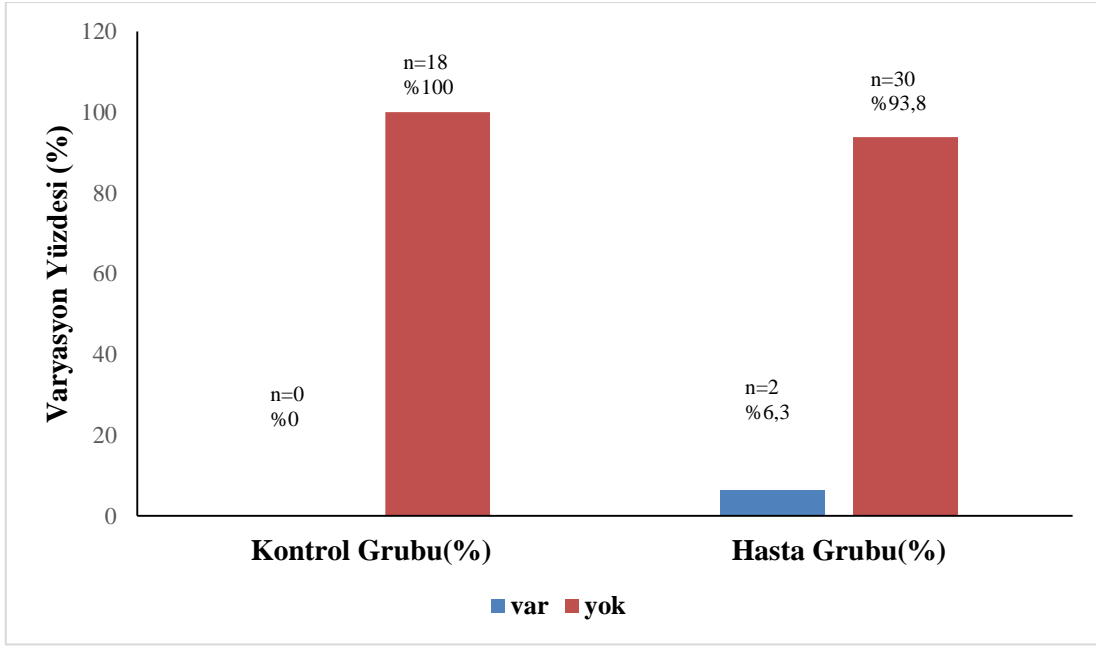
Şekil 8: c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 9’da c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu karşılaştırılması yer almaktadır. c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu bildiğimiz kadarıyla literatürde RDS’li hastalarda NKX2.1 geninde daha önce hiç tanımlanmamış olup, bu çalışmamızda ilk defa tespit edilen ve yalnızca RDS’li grupta bulunan bir varyasyondur. Bu varyasyon açısından Hasta ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2 = 0,574$; $p=0,449$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,5 kat daha yüksekti (OD:1,581 CI:1,2-1,9).



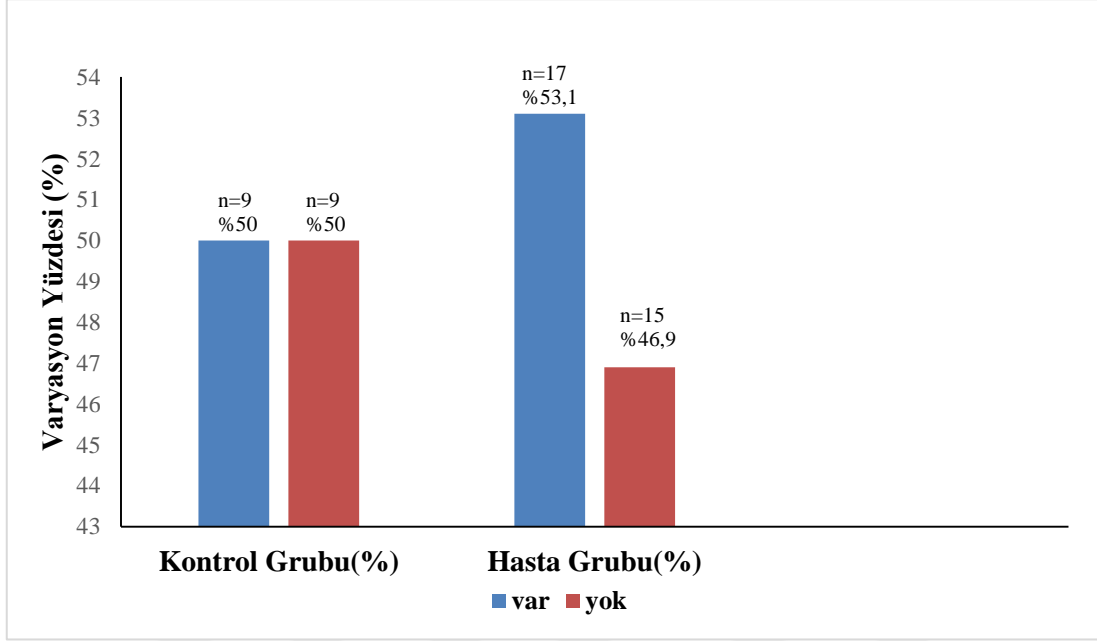
Şekil 9: c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 10'de Bileşik heterozigot (*c.-85G>T NM_001079668.2 + c.446A>C NM_001079668.2 ve c.1031G>A NM_001079668.2 + c.446A> NM_001079668.2*) mutasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu kıyaslaması yer almaktadır. NKX2.1 geninde bileşik heterozigot mutasyonu Hasta Grubunda yalnızca 2 bebekte olup, Kontrol Grubunda hiçbir bebekte saptanmamıştır. Bileşik heterozigot mutasyon taşıma açısından Hasta ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2 = 1,172$; $p=0,279$), bu mutasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,6 kat daha yüksekti (OD:1,600 CI:1,2-1,9).



Şekil 10: Bileşik heterozigot mutasyonu açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

Şekil 11’de NKX2.1 geninde en az bir varyasyon taşıma açısından Hasta ile Kontrol grubu kıyaslanmıştır. NKX2.1 geninde en az bir varyasyon taşıma açısından karşılaştırıldığında, Hasta Grubu ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($\chi^2= 0,045$; $p=0,832$).



Şekil 11: NKX2.1 geninde en az bir varyasyon taşıma açısından hasta ile kontrol grubu kıyaslaması

5.TARTIŞMA

RDS; yenidoğan bakımındaki artan bilgi, deneyim, ekipman ve personel tecrübesine rağmen prematüre bebeklerde hala mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni olmaya devam etmektedir.¹¹¹ Solunum sisteminin immatüritesine neden olan alveolar epitelin yetersiz gelişimi, sürfaktan eksikliği, pulmoner ödem ve göğüs duvarının düşük kompliyansı RDS'nin patofizyolojisinde etkilidir. Son yıllarda doğum sonrası sürfaktan verilmesi, antenatal steroid uygulamaları ve yeni ventilasyon tekniklerinin keşfedilmesi sayesinde RDS'ye bağlı mortalite ve morbidite oranları azalmış olmakla birlikte, prematüre doğum sayısının artışı RDS olgularının sayısında beklenen azalmaya engel olmuştur.^{52,53}

RDS'nin en önemli risk faktörü gestasyon yaşının ve doğum ağırlığının düşüklüğüdür. Türkiye Yenidoğan Derneği tarafından 2016-2017 yılları arasında gerçekleştirilen ulusal veri tabanı kullanılarak elde edilen bir analize göre, 32 gebelik haftasından küçük 3490 prematüre bebekte RDS ve sürfaktan tedavi oranlarının sırasıyla % 70,3 ve % 58,7 olduğunu göstermiştir. Gestasyon yaşı 28 hafta ve altında doğan 1539 prematüre bebekte ise bu oranlar sırasıyla % 86,5 ve % 78,8 olarak saptanmıştır. Ülkemizde RDS ve sürfaktan kullanım oranlarının yüksek olmasının nedeni, üçüncü basamak perinatal merkezlerde dahi antenatal steroid kullanım oranının düşük olmasıdır.⁶³ Ülkemizde Kul ve ark.nın¹¹² RDS tanılı prematüre yenidoğanlarda yaptıkları retrospektif bir çalışmada olgularında doğum ağırlığı 1490±456 gr, ortalama gestasyon yaşı 30.0 ±2,5 hafta olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da gestasyon yaşı benzer olup (32±2 hafta), doğum ağırlığı daha yüksek (2072±692 gr) saptanmıştır.

Gebelikte dişi fetal akciğerin, erkek akciğerinden daha erken sürfaktan ürettiği düşünülmektedir. Bunun nedenleri arasında androjenlerin, alveolar tip II hücrelerinin gelişimini geciktirebilen ve sürfaktan salınımını azaltabilen fibroblast-pnömosit faktörü üretmeleri ayrıca epidermal büyüme faktörünün sinyal yollarını düzenleyerek ve büyüme faktörü-Beta'yı dönüştürerek fetal akciğer gelişimini yavaşlatmaları sayılabilir. Bunun yanında östrojenin; fosfolipidler, lesitin ve yüzey aktif madde proteinleri A ve B'nin sentezini artırması ayrıca alveolar tip II hücrelerinin sayısını artırarak fetal akciğer gelişimini sağladığı bilinmektedir.^{113,114} Anna ve ark.nın¹¹⁴ yaptığı çalışmada RDS'nin riskinin kızlarda erkeklere göre 0,52 kat daha düşük olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda cinsiyet açısından Hasta ve Kontrol Grubu arasında anlamlı bir fark olmasa da RDS tanılı hastalarımızın % 62,5’u erkek cinsiyetti. Literatür ile uyumlu olarak kız cinsiyet düşük oranda tespit edildi.

RDS için diğer önemli risk faktörü sezaryen doğumdur. Nakahara ve ark.nın¹¹⁶ Japonya’da yaptığı çalışmalarında Bizim Çalışmamızla uyumlu olarak C/S ile doğan hastalarda RDS insidansı vajinal doğum ile doğanlara göre anlamlı olarak daha yüksek ($p < 0.001$) saptanmıştır. Aynı çalışmada C/S yoluyla doğan yenidoğanlarda entübasyon ve mekanik ventilasyon süreleri vajinal yolla doğanlara göre anlamlı olarak daha uzun tespit edilmiştir. İsveç’te neonatal solunum hastalıkları üzerine yapılan epidemiyolojik bir çalışmada erken doğmuş bebeklerde RDS morbiditesinin multiparite, C/S, EMR ve erkek cinsiyette daha fazla görüldüğü bildirilmiştir.¹¹⁷ Çalışmamızda RDS tanılı hastalarımızın % 84,4’ü C/S doğum ile doğmuş olup hastaların hastanede yatış ve entübe takip edilme süreleri Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek hesaplanmıştır (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,000$).

Yenidoğanlarda RDS risk faktörlerinin tanınması, önleyici ve erken tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için çok önemlidir.¹¹⁸ Avrupa Perinatal Tıp Derneği tarafından yapılan çalışmada multiparite ve EMR ile RDS arasındaki ilişki araştırılmış ve Çalışmamız ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.^{119,120} Gouyon ve ark.¹²¹ da prematüre bebeklerde RDS risk faktörleri arasında çoğul gebelik ve EMR’nin de olduğunu göstermiştir. Mevcut Çalışmamız, annede gebelikte EMR, İYE, preeklampsi, oligohidroamniyoz, sigara içme öyküsü, hipotiroidi, İTP, plasenta dekolmanı hastalıklarından birinin bulunmasının gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığını gösterdi. RDS grubunda daha fazla çoğul gebelik ve EMR olmasına rağmen, bu açıdan Kontrol Grubu ile istatistiksel anlamlılık görülmedi.

Steroid kullanımı, orta ve şiddetli RDS dahil olmak üzere prematürite ile ilgili olumsuz sonuçların azalmasını sağlamıştır. Antenatal steroid kullanımının doğumdan önce 24 saatten daha kısa sürede verilmesi bile neonatal mortalite, RDS ve İVK sıklığını önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir.¹²³ Yeni Zelanda’da Devender ve ark.nın¹²² yayınladıkları derlemede erken doğum riski taşıyan kadınlarda fetal akciğer olgunlaşmasını hızlandırmak için antenatal kortikosteroid kullanımı desteklenmiştir. Bu

önemli yararlarına rağmen antenatal kortikosteroidin, olgularımızın sadece %24'ünde uygulanmış olduğu saptanmıştır.

Vajinal doğumla karşılaştırıldığında, elektif C/S doğumunun prematüre yenidoğanlarda solunum yolu hastalıkları riskinde 2 ile 7 kat artışa neden olduğu bilinmektedir. Hai-Li ve ark.nın¹²⁴ Çin'de 14 il ve 39 hastaneyi dahil ederek yaptıkları çok merkezli klinik epidemiyolojik bir çalışmada taradıkları 2756 yenidoğanın analizi sonucunda gebelik yaşının artması ile artan C/S doğum sayılarına bağlı olarak yenidoğan mortalitesi, RDS insidansı ve doğum asfiksisi oranında artış olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu bebeklerin 1.dk ve 5.dk APGAR skorlarında düşüş olduğu sonucuna varılmıştır. Yaptığımız çalışmada anne yaşı ile 1.dk ve 5.dk APGAR skorları açısından Hasta ve Kontrol Grupları arasında anlamlı bir fark olmasa da, APGAR skorları Hasta Grubunda daha düşük tespit edilmiştir.

AB kan grubunun A ve B antijenlerinin fenotipik özelliklerinin, endotel seviyesinde artmış bir duyarlılığa ve hasara neden olması sonucunda neonatal hastalık gelişimi riskini arttırdığı bilinmektedir. Amerika'da yapılan bir çalışmada AB kan grubu ile sık görülen neonatal bozuklukların ortaya çıkması arasındaki ilişki incelenmiş ve çalışma sonucunda AB kan grubuna sahip bebeklerde yenidoğan hastalıklarının (RDS, sepsis, ROP) görülme riskinin (%14-89) anlamlı şekilde arttığı görülmüştür.¹²⁵ Al-Dughaishi ve ark.nın¹²⁶ Umman'da retrospektif olarak yaptığı farklı bir çalışmada da anne ve yenidoğan arasındaki Rh kan grubu uyumsuzluğunun yenidoğan üzerine etkileri incelenmiş ve çalışma sonucunda anne ve bebek arasındaki Rh uyumsuzluğunun yenidoğanda anemi, RDS, IUGR, oligohidramniyos, yenidoğan hemorajik hastalıkları insidansını arttırdığı görülmüştür. Çalışmamızda farklı olarak Kontrol Grubunda Rh kan grubu uyumsuzluğu daha fazla saptandı ($\chi^2=4,434$; $p=0,035$). Bu durumun çalışmamızın yeterli sayıda olgu üzerinde yapılamamış olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda; ailevi eğilimin ve ırksal farklılıkların RDS riskini arttırdığının görülmesi üzerine genetik araştırmalara eğilim artmıştır. Aynı gebelik haftasında doğan tüm bebekler için; antenatal steroid uygulamasına, postnatal sürfaktan tedavisine ve optimal ventilatör bakımına rağmen tedaviye eşit yanıtın alınmadığı görülmüştür. On yıllar boyunca sürfaktanın araştırılması ve daha iyi anlaşılması, sürfaktan protein bozuklukları ile ilgili daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Sürfaktan eksikliklerinin genetiği çok karmaşıktır. Bazı

mutasyonlar yenidoğan döneminde öldürücüdür, diğerleri ise bebeklikten yetişkinliğe kadar çok çeşitli hastalıklara neden olur. Sürfaktan protein bozuklukları SFTPB, SFTPC, ABCA3 ve NKX2.1 (TTF-1) genlerinin genetik mutasyonlarının neden olduğu nadir bir hastalık grubudur.¹²⁻¹³

Washington Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Johns Hopkins Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin¹²⁷ NKX2.1 geni ile ilgili ortak yaptıkları bir araştırmada, bu genin akciğerde en fazla eksprese edilen iki izoformu belirlenmiştir. Bu izoformların birincisi 371 amino asit izoformu (NM_003317.3) ve ikincisi 401 amino asit izoformu (NM_001079668.2, "transkript 1") dur. NKX2.1 genindeki değişimler ile RDS arasındaki ilişkiyi incelediğimiz çalışmamıza dahil olan olgularda c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 ve c.-85G>T heterozigot NM_001079668.2 rs2076751 varyasyonları açısından Hasta ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, bu varyasyonları taşıyanların hasta olma riski Kontrol grubundan sırasıyla 6,2 ve 1,9 kat daha düşüktü. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu varyasyonun RDS oluşumuna karşı koruyucu etkisi olduğu söylenebilir.

Thorwarth ve ark.¹²⁸ nın yeni nesil dizi analizi yöntemi ile yaptıkları kapsamlı genotipleme sonucunda 27 yeni NKX2.1 mutasyonu saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan bir diğer varyasyon olan c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülme de bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 0,3 kat daha yüksek saptanmıştır.

Literatür incelendiğinde görüldüğü kadarıyla c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu RDS'li hastalarda NKX2.1 geninde daha önce hiç tanımlanmamış olup, bu Çalışmamızda ilk defa tespit edilen ve yalnızca RDS'li grupta bulunan bir varyasyondur. Bu varyasyon açısından Hasta ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,5 kat daha yüksekti. Bulgularımıza göre RDS'nin oluşumunda c.1031G>A p.Gly344Asp varyasyonunun önemli bir yer alabileceği, bu konuda daha geniş serileri içeren yeni çalışmaların yapılmasının ilgili varyasyonun RDS etiopatolojisindeki rolünün daha iyi açıklanmasında önemli olduğu söylenebilir.

Yeni nesil dizi analizi ile tarama yaptığımız olgulardan Hasta Grubuna ait sadece 2 yenidoğanda NKX2.1 geninde bileşik heterozigot mutasyonu saptanmış olup, Kontrol grubunda hiçbir bebekte bu mutasyon tespit edilmemiştir. Bileşik heterozigot mutasyon taşıma açısından Hasta ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, bu mutasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol grubundan 1,6 kat daha yüksekti.

RDS; prematüre yenidoğan bakımındaki artan bilgi, deneyim, ekipman ve personel tecrübesine rağmen prematüre bebeklerde hala mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni olmaya devam etmektedir. Bu durum RDS'li birey ve ailelerinin yaşam kalitesini etkilemekte, aile bireyleri üzerinde psikolojik baskılara neden olarak iş gücü kayıplarına neden olmakta, hastaneye yatışlardan kaynaklı sağlık sistemi üzerinde yük bindirmektedir. Bu nedenle RDS'nin etiopatolojisinin daha iyi anlaşılması, hastalığın erken tanı alması ve idamesinde önemli olup RDS'ye bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılarak maliyet kaybının azaltılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bizim mevcut çalışmamız bu açıdan büyük önem arz etmektedir. Ancak olgu sayımızın fazla olmadığı çalışmamızda tespit ettiğimiz sonuçların, hasta sayısının daha fazla olduğu çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6.SONUÇLAR

1. Çalışmaya toplam 50 prematüre yenidoğan dahil edilmiştir.
2. Bebekler RDS tanılı 32 (%64) prematüre yenidoğandan oluşan Hasta Grubu ile 18 sağlıklı prematüre yenidoğandan oluşan Kontrol Grubu (%36) olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır.
3. Hasta Grubunun doğum yaşı ortalama $32,71 \pm 2.03$ hafta iken Kontrol Grubunda $33,05 \pm 7.05$ hafta olarak hesaplandı. RDS'li hastaların doğum yaşı, Kontrol Grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüktü ($p=0,022$).
4. Hastanede yatış süresi ve entübe takip süresi Hasta Grubunda sırasıyla $25,3 \pm 18,2$ gün ve $7,9 \pm 4,9$ gün, Kontrol Grubunda sırasıyla $10 \pm 4,56$ gün ve $0,27 \pm 0,66$ gün idi.
5. Anne ve bebek kan grupları arasındaki Rh uyumsuzluğu açısından Hasta (2 (%6,3)) ve Kontrol (5 (%27,8)) Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardı ($p=0,035$).
6. Hasta Grubunda 1'er (%3,1) bebekte hidronefroz, 2.sürfaktan sonrası arrest gelişimi, hipotroidi, pnömotoraks, pulmoner hemoraji görüldü. Yine aynı şekilde Hasta Grubunda sadece 1'er (%3,1) bebeğe ASD (atrial septal defekt)+BPD, PDA+PFO (patent foramen ovale), NEK+PDA ve KKH tanısı konuldu.
7. c.-61C>T heterozigot NM_003317.3 rs147791173 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 2,870$; $p=0,090$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 6,2 kat daha düşüktü.
8. c.-85G>T heterozigot rs2076751 NM_001079668.2 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 0,580$; $p=0,446$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,9 kat daha düşüktü.
9. c.446A>C heterozigot p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 varyasyonu açısından Hasta ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 2,381$; $p=0,123$), bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 0,3 kat daha yüksekti.

10. c.1031G>A p.Gly344Asp heterozigot NM_001079668.2 varyasyonu bildiğimiz kadarıyla literatürde RDS'li hastalarda NKX2.1 geninde daha önce hiç tanımlanmamış olup, bu çalışmamızda ilk defa tespit edilen ve yalnızca RDS'li grupta bulunan bir varyasyondur. Bu varyasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,5 kat daha yüksekti.
11. NKX2.1 geninde bileşik heterozigot mutasyonu Hasta Grubunda yalnızca 2 bebekte olup, Kontrol Grubunda hiçbir bebekte saptanmamıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ($\chi^2= 1,172$; $p=0,279$), bu mutasyonu taşıyanların hasta olma riski Kontrol Grubundan 1,6 kat daha yüksekti.
12. Hasta Grubunda 17 (%53,1) yenidoğanda, Kontrol Grubunda ise 9 (%50) yenidoğanda NKX2.1 geninde en az bir varyasyon saptandı.

7. KAYNAKLAR

1. Li Y, Wang W, Zhang D. Maternal diabetes mellitus and risk of neonatal respiratory distress syndrome: a meta-analysis 2019;56 (7): 729-740
2. Alemzadeh R, Ali O. Çocuklarda Diabetes Mellitus (Çeviri: Gülcan R, Kırkgöz T). Akçay T (Editör). Nelson Pediatri. 19th Ed İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2015. s.1968-97
3. Hamvas A, Rodriguez RJ, Martin RJ, Fanaroff AA. Pathophysiology and Management of Respiratory Distress Syndrome. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2011: 1106-1116
4. Marttila R, Haataja R, Guttentag S, Hallman M. Surfactant protein A and B genetic variants in respiratory distress syndrome in singletons and twins. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:1216-22
5. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Xian-Tan D, Barberi I. Respiratory distress syndrome in the newborn: role of oxidative stres. Intensive Care Med 2001; 27(7): 1116-1123
6. Gomella T L. Neonatology. 5th Ed, USA : Appleton & Lange, 2004; 524-553 .
7. Jackson JC. Respiratory distres in the preterm infant. In: Gleason CA, Devaskar SU, Eds. Avery's diseases of Newborn. 9th edition, Philedelphia: Elsevier Saunders, 2012:633-57
8. Moss TJ. The respiratory consequences of preterm birth. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33:280–284
9. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. Lancet 1980;1:55-59.
10. Whitsett JA, Rice WR, Warner BB, Wert SE, Pryhuber GS. Acute Respiratory Disorders. In: MacDonald MG, Seshia MMK, Mullett MD, eds. Avery's Neonatology, 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 554-577
11. Jobe AH. Lung Development and Maturation. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2011.p. 1075-1092

12. Amin RS , Wert SE , Baughman RP , Tomashefski Jr JF , Noguee L M et al. Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease . *J Pediatr* 2001; 139 (1): 85 - 92
13. Shulenin SNL , Noguee LM , Annilo T , Wert SE , Whitsett JA , Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency . *N Engl J Med*. 2004; 350 (13): 1296 - 1303.
14. Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116 : 27-35
15. Jeffrey A Whitsett , Susan E Wert, Bruce C Trapnell. Genetic disorders influencing lung formation and function at birth. *Hum Mol Genet*. 2004 Oct 1;13 Spec No 2:R207.
16. Kaplan F. Molecular determinants of fetal lung organogenesis. *Mol Genet Metab* 2000;71, 321–341
17. Halliday HL. The fascinating story of surfactant. *J Paediatr Child Health* 2017;53:327–332
18. Obladen M. History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate* 2005; 87:308–316
19. Gruenwald P. Surface tension as a factor in the resistance of neonatal lungs to aeration. *Am J Obstet Gynecol* 1947;53:996–1007
20. Avery M, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child* 1959; 97:517– 523
21. Halliday HL. Surfactants: past, present and future. *J Perinatol* 2008; 28:S47–S56
22. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 1955; 175:1125–1126
23. Weibel ER, Limacher W, Bachofen H. Electron microscopy of rapidly frozen lungs: evaluation on the basis of standard criteria. *J Appl Physiol* 1982; 53:516–527
24. Perez-Gil J, Weaver TE. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25:132–141
25. Hamvas A. Inherited surfactant protein-B deficiency and surfactant protein-C associated disease: clinical features and evaluation. *Semin Perinatol* 2006; 30:316–326
26. Numata M, Chu HW, Dakhama A, Voelker DR. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:320–325

27. Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2000; 1467:255–270
28. Gower WA, Noguee LM. Surfactant dysfunction. *Paediatr Respir Rev* 2011; 12:223–229
29. Ridsdale R, Post M. Surfactant lipid synthesis and lamellar body formation in glycogen-laden type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol Am J Physiol-Lung C* 2004; 287:L743–L751
30. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, Van Golde LMG, Demel RA. Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry* 1991; 30:10965–10971
31. Kotecha S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 82: 69-74
32. Albert RK. The role of ventilation-induced surfactant dysfunction and atelectasis in causing acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185:702–708
33. Notter RH. In: Lenfant C, ed. *Lung surfactant: Basic Science and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker, 2000: Vol 149.
34. Pryhuber GS. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 217-228
35. Stahlman MT, Besnard V, Wert SE, Weaver TE, Dingle S, Xu Y, et al. Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 71–83
36. Mallory GB Jr. Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatr Respir Rev* 2001; 2: 151-158
37. Carreto-Binaghi LE, Aliouat EM, Taylor ML. Surfactant proteins, SP-A and SP-D, in respiratory fungal infections: their role in the inflammatory response. *Respir Res* 2016; 17:66
38. Yurdakök M. Inherited disorders of neonatal lung diseases. *Turk J Pediatr*. 2004;46:105-14
39. Cole FS, Hamvas A, Noguee LM. Genetic Disorders of Neonatal Respiratory Function. *Pediatr Res*. 2001;50:157-162

40. Ramet M, Haataja R, Marttila R, Flores J, Hallman M. Association between the Surfactant Protein A(SP-A) Gene Locus and Respiratory-Distress Syndrome in the Finnish Population. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1569-1579
41. Hallman M, Haataja R. Surfactant protein polymorphisms and neonatal lung disease. *Semin Perinatol.* 2006;30:350-61
42. Whitsett JA, Wert SE, Xu Y. Genetic disorders of surfactant homeostasis. *Biol Neonate.* 2005;87:283-287
43. Lyra PP, Vaz FA, Moreira PE, Hoffmann JW, Demello DE, Diniz EM. Comparison of surfactant protein B polymorphisms of healthy term newborns with preterm newborns having respiratory distress syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:779-786.
44. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med.* 2002;347:2141-2148
45. Mulugeta S, Beers MF. Processing of surfactant protein C requires a type II transmembrane topology directed by juxtamembrane positively charged residues. *J Biol Chem.* 2003;278:47979-47986. 58
46. Noguee LM, Dunbar AE III, Wert S, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest.* 2002;121:20-21
47. Yurdakök M. Respiratuar distres sendromunun ve yenidoğanın geçici takipnesinin kalıtsal yönü. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2006;49:229- 246.
48. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol.* 2003;8:19-27
49. De Mello DE. Pulmonary pathology. *Semin Neonatol.* 2004;9:311-29.
50. Korkmaz A. Respiratuar distres sendromu ve komplikasyonları. Sağlık Bakanlığı Kurs Kitabı 2010. 73-86.
51. Smith PB, Ambalavanan N, Li L, Cotten CM, Laughon M, Walsh MC, et al. Approach to infants born at 22 to 24 weeks' gestation: relationship to outcomes of more-mature infants *Pediatrics* 2012 Jun;129(6):e1508-16
52. Rodriguez RJ. Management of respiratory distress syndrome: an update. *Respir Care* 2003; 48: 279-286
53. Whitsett JA, Pryhuber GS, Rice WR. Acute respiratory disorders. In: Avery GB, MacDonald MG (eds). *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1999: 505-515

54. Yurdakök M. Yenidoğanda Respiratuar Distres Sendromu. *Yoğun Bakım Dergisi* 2004;4:77-83)
55. Ovalı F. Solunum sıkıntısı ve respiratuar distres sendromu. In: Dağoğlu T, Ovalı F, editörler. *Neonatoloji*. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2007:331-346
56. Nilsson R, Grossmann G, Robertson B. Lung surfactant and the pathogenesis of neonatal bronchiolar lesions induced by artificial ventilation. *Pediatr Res* 1978 12:249
57. Jackson JC. Respiratory distres in the preterm infant. In: Gleason CA, Devaskar SU, Eds. *Avery's diseases of newborn*. 9th edition, Philedelphia: Elsevier Saunders, 2012:633-57
58. Krauss AN. New methods advance treatment for respiratory distress syndrome. *Pediatr Ann* 2003; 32: 585-591
59. Reuter S, Moser C, Baack M. Respiratory distress in the newborn. *Pediatr Rev* 2014 Oct; 35 (10): 417-28; quiz 429
60. Kamath BD, Macguire ER, McClure EM, Goldenberg RL, Jobe AH. Neonatal mortality from respiratory distress syndrome: lessons for low-resource countries. *Pediatrics*. 2011 Jun;127(6):1139-46
61. Pasha AB, Chen XQ, Zhou GP. Bronchopulmonary dysplasia: Pathogenesis and treatment. *Exp Ther Med*. 2018 Dec;16(6):4315-4321
62. Sun H, Zhou Y, Xiong H, Kang W, Xu B, Liu D, et al. Prognosis of very preterm infants with severe respiratory distress syndrome receiving mechanical ventilation. *Lung* 2015 Apr;193(2):249-54
63. Özkan H, Erdeve Ö, Kanmaz Kutman HG. Turkish Neonatal Society guideline on the management of respiratory distress syndrome and surfactant treatment. *Turk Pediatri Ars* 2018; 53(Suppl 1): S45-S54
64. Stock SJ, Bricker L, Norman JE, West HM. Immediate versus deferred delivery of the preterm baby with suspected fetal compromise for improving outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 7: CD0089688
65. Eke AC, Chalaan T, Shukr G, Eleje GU, Okafor CI. A systematic review and meta-analysis of progestogen use for maintenance tocolysis after preterm labor in women with intact membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2016; 132: 11-6
66. Crowther CA, McKinlay CJ, Middleton P, Harding JE. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for improving neonatal health outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 7: CD003935

67. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, et al. Resuscitation chapter collaborators. Part 7: neonatal resuscitation: 2015 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations. *Circulation* 2015; 132: S204-41
68. Tarnow-Mordi W, Morris J, Kirby A, et al. Australian placental transfusion study collaborative group. Delayed versus immediate cord clamping in preterm infants. *N Engl J Med* 2017; 377: 2445
69. Oei JL, Vento M, Rabi Y, et al. Higher or lower oxygen for delivery room resuscitation of preterm infants below 28 completed weeks gestation: a meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017; 102: F24-30
70. Subramaniam P, Ho JJ, Davis PG. Prophylactic nasal continuous positive airway pressure for preventing morbidity and mortality in very preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 6: CD001243
71. Rojas-Reyes MX, Morley CJ, Soll R. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2012:CD000510
72. Ardell S, Pfister RH, Soll R. Animal derived surfactant extract versus protein free synthetic surfactant for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2015:CD000144
73. Singh N, Halliday HL, Stevens TP, Gautham Suresh, Roger Soll, Maria Ximena Rojas-Reyes. Comparison of animal-derived surfactants for the prevention and treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2015:CD010249
74. Bahadue FL, Soll R. Early versus delayed selective surfactant treatment for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;11:CD001456
75. Göpel W, Kribs A, Ziegler A, Laux R, Hoehn T, et al. Avoidance of mechanical ventilation by surfactant treatment of spontaneously breathing preterm infants (AMV): an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011;378:1627-34
76. Dargaville PA, Aiyappan A, Cornelius A, Williams C, De Paoli A. Preliminary evaluation of a new technique of minimally invasive surfactant therapy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011; 96:F243
77. Aldana-Aguirre JC, Pinto M, Featherstone RM, Kumar M. Less invasive surfactant administration versus intubation for surfactant delivery in preterm infants with

- respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017;102: F17-23
78. Sardesai S, Biniwale M, Wertheimer F, Garingo A, Ramanathan R. Evolution of surfactant therapy for respiratory distress syndrome: past, present, and future. *Pediatr Res* 2017; 81: 240-8. doi: 10.1038/pr.2016.203
79. Leonart LP, Tonin FS, Ferreira VL, Penteadó ST, Araújo Motta F, Pontarolo R. Fluconazole doses used for prophylaxis of invasive fungal infection in neonatal intensive care units: A network meta-analysis. *J Pediatr* 2017;185:129-35
80. Rabe H, Rojas-Anaya H. Inotropes for preterm babies during the transition period after birth: friend or foe? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017;102:F547-50
81. Henderson-Smart DJ, De Paoli AG. Prophylactic methylxanthine for prevention of apnoea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;12:CD000432
82. Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, et al. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 2001;508(2):221-5
83. Hamvas A, Heins HB, Guttentag SH, Wegner DJ, Trusgnich MA, Bennet KW, et al. Developmental and genetic regulation of human surfactant protein B in vivo. *Neonatology.* 2009;95(2):117-24
84. Noguee LM. Interstitial lung disease in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(4):227-33
85. Boggaram V. Regulation of lung surfactant protein gene expression. *Front Biosci.* 2003;8:d751
86. Peca D, Cutrera R, Masotti A, Boldrini R, Danhaive O. ABCA3, a key player in neonatal respiratory transition and genetic disorders of the surfactant system. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(5):913-9
87. Brasch F, Griese M, Tredano M, Johnen G, Ochs M, Rieger C, et al. Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur Respir J.* 2004;24(1):30-9
88. Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* 2004;350(13):1296-303
89. Brasch F, Schimanski S, Muhlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, et al. Alteration of the pulmonary surfactant system in full term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(5):571-80

90. Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Nogee LM. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(8):1026-31
91. Garmany TH, Moxley MA, White FV, Dean M, Hull WM, Whitsett JA, et al. Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatr Res.* 2006;59(6):801-5
92. Garmany TH, Wambach JA, Heins HB, Watkins-Torry JM, Wegner DJ, Bennet K, et al. Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency. *Pediatr Res.* 2008;63(6):645-9
93. Doan ML, Guillerman RP, Dishop MK, Nogee LM, Langston C, Mallory GB, et al. Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children. *Thorax.* 2008;63(4):366-73
94. Nogee LMG, W.A. Genetic disorders of surfactant dysfunction. Up to date.2020:1-28
95. Deutsch GH, Young LR, Deterding RR, Fan LL, Dell SD, Bean JA, et al. Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(11):1120-8
96. Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, et al. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22(3):380-91
97. Li J, Ikegami M, Na CL, Hamvas A, Espinassous Q, Chaby R, et al. N-terminally extended surfactant protein (SP) C isolated from SP-B-deficient children has reduced surface activity and inhibited lipopolysaccharide binding. *Biochemistry.* 2004;43(13):3891-8
98. Hamvas A, Trusgnich M, Brice H, Baumgartner J, Hong Y, Nogee LM, et al. Population-based screening for rare mutations: high-throughput DNA extraction and molecular amplification from Guthrie cards. *Pediatr Res.* 2001;50(5):666-8
99. Tredano M, Cooper DN, Stuhmann M, Christodoulou J, Chuzhanova NA, Roudot-Thoraval F, et al. Origin of the prevalent SFTPB indel g.1549C > GAA (121ins2) mutation causing surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Med Genet A.* 2006;140(1):62-9
100. Nogee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):973-81

101. Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, et al. Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res.* 2000;48(3):275-82
102. Cameron HS, Somaschini M, Carrera P, Hamvas A, Whitsett JA, Wert SE, et al. A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *J Pediatr.* 2005;146(3):370-5
103. Guillot L, Epaud R, Thouvenin G, Jonard L, Mohsni A, Couderc R, et al. New surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. *J Med Genet.* 2009;46(7):490-4
104. Thouvenin G, Abou Taam R, Flamein F, Guillot L, Le Bourgeois M, Reix P, et al. Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C. *Arch Dis Child.* 2010;95(6): 449-54
105. Abou Taam R, Jaubert F, Emond S, Le Bourgeois M, Epaud R, Karila C, et al. Familial interstitial disease with I73T mutation: A mid- and long-term study. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(2):167-75
106. Litao MK, Hayes D, Jr., Chiwane S, Nogee LM, Kurland G, Gugliani L. A novel surfactant protein C gene mutation associated with progressive respiratory failure in infancy. *Pediatr Pulmonol.* 2017;52(1):57-68
107. Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, White FV, Dishop MK, Alfano DN, et al. Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1. *Chest.* 2013;144(3):794-804
108. Willemsen MA, Breedveld GJ, Wouda S, Otten BJ, Yntema JL, Lammens M, et al. Brain-Thyroid-Lung syndrome: a patient with a severe multi-system disorder due to a de novo mutation in the thyroid transcription factor 1 gene. *Eur J Pediatr.* 2005;164(1):28-30
109. Carre A, Szinnai G, Castanet M, Sura-Trueba S, Tron E, Broutin-L'Hermite I, et al. Five new TTF1/NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. *Hum Mol Genet* 2009;18(12):2266-76
110. Guillot L, Carre A, Szinnai G, Castanet M, Tron E, Jaubert F, et al. NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in "Brain-Lung-Thyroid Syndrome". *Hum Mutat.* 2010;31(2):E1146-62
111. Wiingreen R, Greisen G, Ebbesen F, et al. Surfactant need by gestation for very preterm babies initiated on early nasal CPAP: A Danish observational multicentre study of 6,628 infants born 2000-2013. *Neonatology* 2017; 111: 331-6

112. Kul M, Saldır M, Gülgün M, Kesik V, Sarıcı S, et al. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde respiratuvar distres sendromu tanısıyla takip edilen düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların retrospektif değerlendirilmesi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2005; 47: 290-293
113. Nielsen HC, Torday JS. Sex Differences in Avian Embryo Pulmonary Surfactant Production: Evidence for Sex Chromosome Involvement. 1985; 117 (1):31–37
114. Bresson E, Seaborn T, Côté M, Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. 2010; 1477-7827-8-2
115. Niesłuchowska-Hoxha A, Cnota W, Czuba B, Ruci A, Ciaciura-Jarno M, Jagielska A et al. A Retrospective Study on the Risk of Respiratory Distress Syndrome in Singleton Pregnancies with Preterm Premature Rupture of Membranes between 24+0 and 36+6 Weeks, Using Regression Analysis for Various Factors.V: 2018 |Article ID 7162478
116. Nakahara M, Goto S, Kato E, Itakura A, Respiratory Distress Syndrome in Infants Delivered via Cesarean from Mothers with Preterm Premature Rupture of Membranes: A Propensity Score Analysis.Takeda S.J Pregnancy. 2020 Jul 31;2020:5658327.
117. M. Roth-Kleiner, BP Wagner, D. Bachmann ve J. Pfenninger, " Respiratory distress syndrome in near-term babies after caesarean section", *Swiss Medical Weekly* , 2003 May 17;133(19-20):283-8
118. Edwards MO, Kotecha SJ, Kotecha S. Respiratory distress of the term newborn infant. 2013 Mar;14(1):29-36; quiz 36-7
119. Sun H, Xu F, Xiong H, Kang W, Bai Q, i Zhang Y, et al. Characteristics of respiratory distress syndrome in infants of different gestational ages. *Lung*. 2013; 191 (4):425–433
120. Condo V, Cipriani S, Colnaghi M, Bellù R, Zanini Ret al. Neonatal respiratory distress syndrome: are risk factors the same in preterm and term infants? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017; 30 (11):1267-1272

121. Gouyon JB, Ribakovskiy C, Ferdynus C, Quantin C, Sagot P, Gouyon B. Severe respiratory disorders in term neonates. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008 Jan;22(1):22-30
122. Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2017;3:Cd004454
123. Smrcek JM, Schwartau N, Kohl M, et al. Antenatal corticosteroid therapy in premature infants. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 271: 26-32
124. Jiang HL, Lu C, Wang XX, Wang X, Zhang WY. Cesarean section does not affect neonatal outcomes of pregnancies complicated with preterm premature rupture of membranes *Chin Med J (Engl)* 2020 Jan 5;133(1):25-32.
125. McMahon K, Habeeb O, Bautista G, Levin S. Et al. The association between AB blood group and neonatal disease 2019;12(1):81-86.
126. Al-Dughaiishi T, Al-Rubkhi IS, Al-Duhli M, Al-Harrasi Y, Gowri V. Alloimmunization due to red cell antibodies in Rhesus positive Omani Pregnant Women: Maternal and Perinatal outcome. *Asian J Transfus Sci.* 2015 Jul-Dec;9(2):150-4.
127. Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, White FV, Dishop MK, Et al. Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1. *Chest.* 2013 Sep;144(3):794-804.
128. Thorwarth A, Schnittert-Hübener S, Schrupf P, Müller I, Jyrch S, Et al. Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum. *J Med Genet.* 2014 Jun;51(6):375-87.

8.EKLER

EK-1: Hasta Ve Kontrol Grubunda Tespit Edilen Mutasyonlar

Hasta Grubu / Dosya No	GENETİK SONUÇ
1-S.G. / 2020010478	NORMAL
2-Y.E.B / 2020010937	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %37
3-M.E.T. / 2020010401	NM_001079668.2 c.1031G>A p.Gly344Asp HET CL3/NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %39 +MUTASYON
4-Y.S. / 2020037267	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %34
5-Ö.S.K / 2020031942	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %39
6-Ç.İ.K / 2020027200	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %35
7-E.P. / 2020040076	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %34
8-M.E.G / 2019005459	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %30
9-B.E.K / 2020000299	c.-85G>T NM_001079668.2 rs2076751 HET/NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %37 +MUTASYON
10-M.E.U. / 2019042070	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %33
11-T.C. / 2019014876	NORMAL
12-H.Ç. / 2019036745	c.-85G>T NM_001079668.2 rs2076751 HET
13-Ö.E.D-1 (üçüz)/ 20190007150	NORMAL
14-M.S.D-2 (üçüz)/ 2019012861	NORMAL
15-U.G.M. / 2019011577	NORMAL
16-E.Ö. / 2019029359	NORMAL
17-M.E.K. / 2019032431	NORMAL
18-Ö.G. (ikiz) / 2019035075	NORMAL
19-Y.G. (ikiz) / 2019035074	NORMAL
20-Bebek İ. / 2021003330	NORMAL
21-A.K.A.(üçüz) / 2021004151	c.-85G>T NM_001079668.2 rs2076751 HET
22-A.M.A. (üçüz) / 2001004153	NORMAL
23-M.Z.A. (üçüz) / 2021004152	NORMAL
24-E.D. (ikiz) / 2018044701	NORMAL
25- Y.D. (ikiz) / 2018043982	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %35
26-M.S.S. / 2018044400	NORMAL
27-D.T. / 2019004969	NORMAL
28-E.D./ 2018006927	c.-61C>T NM_003317.3 rs147791173 HET
29-C.D. / 2018002389	NORMAL
30-Bebek1-A.(ikiz) / 2021004615	NORMAL
31-M.H.T. / 2018012970	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %37
32- Bebek K. / 2019034269	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %34
Kontrol Grubu / Dosya No	
1-E.A. / 2021001867	NORMAL
2-U.B.Ç. / 2021000297	NORMAL
3-Z.G-1 (üçüz) / 2021001148	c.-85G>T NM_001079668.2 rs2076751 HET
4- Z.G-2 (üçüz) / 2021001149	NORMAL
5- Z.G-3 (üçüz) / 2021001147	c.-85G>T NM_001079668.2 rs2076751 HET
6-K.K. / 2021001101	NORMAL

7 -G.E. / 2021000656	c.-85G>T NM_001079668.2 rs2076751 HET
8 -Bebek K./ 2020017350	c.-61C>T NM_003317.3 rs147791173 HET
9 -Bebek -1 E./ 2020040911	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %36
10 -Bebek -2 E./ 2020040912	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %34
11 -Bebek KA. / 2021005238	c.-61C>T NM_003317.3 rs147791173 HET
12 -Bebek2-A.(ikiz) / 2021007194	NORMAL
13 -Bebek D. / 2021009829	NORMAL
14 -A.A.H. / 2021004885	c.-61C>T NM_003317.3 rs147791173 HET
15 -E.G. / 2021003389	NORMAL
16 -Bebek K. / 2019035277	NORMAL
17 -Bebek N. / 2021005074	NORMAL
18 -M.Y. / 2021005709	NKX2-1:c.446A>C p.Asp149Ala NM_001079668.2 rs756273865 HET %37

