

**KONJENİTAL ANOMALİ PRENATAL TARAMALARINDA BİR
BELİRTEÇ OLARAK MİRNA PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

ŞENAY BALCI FİDANCI

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2018**

**KONJENİTAL ANOMALİ PRENATAL TARAMALARINDA BİR
BELİRTEÇ OLARAK MİRNA PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

ŞENAY BALCI FİDANCI

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**



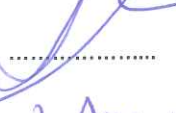
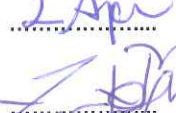
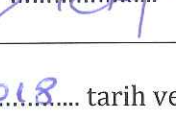
**Danışman
Prof. Dr. Lülüfer TAMER**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2015-TP3-1326 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**MERSİN
AĞUSTOS - 2018**

ONAY

Şenay BALCI FİDANCI tarafından Prof. Dr. Lülüfer TAMER danışmanlığında hazırlanan "Konjenital Anomali Prenatal Taramalarında Bir Belirteç Olarak miRNA Profilinin Belirlenmesi" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 10 Ağustos 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Lülüfer TAMER	
Üye	Prof.Dr. Gürbüz POLAT	
Üye	Prof.Dr. Ali ÜNLÜ	
Üye	Doç. Dr. Lokman AYZAZ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Nil ÜNAL	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.08.2018 tarih ve 2018/355 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. BANU COŞKUN YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copy rights of this thesis to the Mersin University.

10 Ağustos 2018 / 10 August 2018

İmza / Signature

Şenay BALCI FİDANCI

ÖZET

KONJENİTAL ANOMALİ PRENATAL TARAMALARINDA BİR BELİRTEÇ OLARAK MİRNA PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Genetik defekt, kromozomal anöploidi ve yapısal doğum kusurlarını tanımlamak için tarama testleri önerilmektedir. Birinci ve/veya ikinci trimesterde anöploidi risk değerlendirmesi yapmak için sonografik ve maternal serum bazlı seçenekler mevcuttur. Ayrıca prenatal tanı için koryon villus biyopsisi, amniyosentez gibi invaziv tanı yöntemleri kullanılmaktadır ve bu yöntemler fetus için somut bir risk taşıdığından, özellikle genetik hastalıkların doğru, kolay kullanılabilir ve noninvaziv prenatal tanı testi gerekliliği artmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda, fetal kromozomal anöploidilerin noninvaziv prenatal tanısında, dolaşımdaki fetal nükleik asitler ümit vaat eden moleküller haline gelmiştir. Bu nedenle miRNA'ların bu alanda kullanılabilirliğini sorguladığımız bu çalışmada, konjenital anomalili fetus taşıdığı saptanan 14 gebe hasta grubu olarak, tarama testi sonucunda riskli grup olarak belirlenen 16 gebe ve risk taşımadığı belirlenen 13 gebe kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Maternal plazma ve amniyotik sıvı örneklerinden izole edilen miRNA ekspresyonlarının analizi qRT-PCR ile gerçekleştirildi. Hasta grubuna ait maternal plazmasında, kontrol grubuna kıyasla hsa-miR-629-5p 2 kat ($p=0,008$), hsa-miR-320c 1,22 kat ($p=0,042$), hsa-miR-21-5p 1,27 kat ($p=0,019$), hsa-let-7c-5p 1,56 kat ($p=0,022$), hsa-miR-98-5p 1,43 kat ($p= 0,034$), hsa-miR-486-5p 1,49 kat ($p=0,03$), hsa-miR-4732-5p 1,79 kat ($p=0,04$) ve hsa-miR-181a-5p 1,61 kat ($p=0,045$) arttığı bulundu. Bu veriler doğrultusunda miRNA'ların, özellikle Down sendromunun noninvaziv prenatal tanısında önemli bir yere sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: MikroRNA, Prenatal tanı, Gebelik, Konjenital anomali, Trizomi 21,

Danışman: Prof. Dr. Lülüfer TAMER, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

DETERMINATION OF miRNA PROFILE AS A BIOMARKER IN PRENATAL SCREENING OF CONGENITAL ANOMALY

Screening tests are recommended to identify genetic defects, chromosomal aneuploidies, and structural birth defects. Sonographic and maternal serum-based options are available for risk assessment of aneuploidy in the first and/or second trimester. Also, invasive diagnostic methods, such as chorionic villus biopsy and amniocentesis, are used for prenatal diagnosis, and true, easy to use and non-invasive prenatal diagnostic test, especially for genetic diseases, requirement is increasing, because these methods carry a tangible risk to the fetus. However, in recent years, circulating fetal nucleic acids have become promising molecules in the noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies. Therefore, in this study, which we inquire about the usability of miRNAs in this area, 14 pregnant patients who were found to carry a fetus with congenital anomalies as patient group, and 16 pregnant women who were identified as risky group and 13 pregnant women whose risk was not identified as a result of screening test as control group were included in the study. Analysis of miRNA expressions, isolated from maternal plasma and amniotic fluid samples, was performed by qRT-PCR. It was found that hsa-miR-629-5p 2 fold ($p=0.008$), hsa-miR-320c 1.22 fold ($p=0.042$), hsa-miR-21-5p 1,27 kat ($p=0,019$), hsa-let-7c-5p 1,56 fold ($p=0.022$), hsa-miR-98-5p 1.43 fold ($p=0.034$), hsa-miR-486-5p 1.49 fold ($p=0.03$) hsa-miR-4732-5p 1.79 fold ($p=0.04$) and hsa-miR-181a-5p 1.61 fold ($p=0.045$) increased when patient group's maternal plasma compared to the control group's one. In the direction of this data, we think that miRNAs may have an important place in the noninvasive prenatal diagnosis especially in Down syndrome.

Keywords: MicroRNAs, Prenatal diagnosis, pregnancy, Congenital anomaly, Trisomy 21

Advisor: Prof. Lülüfer TAMER, Department of Medical Biochemistry, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

İyi bir akademisyen olabilmem adına her konuda bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Lülüfer Tamer olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Gürbüz Polat, Prof. Dr. Gülçin Eskandari, Prof. Dr. Burak Çimen'e,

Tezime ait çalışma grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecinde rol almanın dışında fikirleri ile de büyük katkıları olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Filiz ÇAYAN'a ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi M. Ertan AY'a ve Arş. Gör. Ümit KARAKAŞ'a,

Tezimin istatistik analizini yaparken, sorularıma sabırla cevap vererek yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Lokman AYZAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Didem Derici'ye,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunduğum süre zarfında, güleryüzlerini ve her türlü desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum bütün çalışma arkadaşlarıma,

Son olarak aileme, yaşamım boyunca, verdiğim her kararda, sorgulamadan, müdahale etmeden ama ellerini hep sırtımda hissettiğim babama ve anneme, yol arkadaşım olan eşime, geleceğe dair umudum olan oğluma, hayatımın her döneminde hep yanıbaşımda olan manevi anneme ve kanatsız iki meleğime ve ailem bildiğim can dostlarıma,

Minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. Konjenital Anomaliler	4
2.1.1. Konjenital Anomali Sebepleri ve Risk Faktörleri	5
2.1.2. Sınıflandırması	7
2.2. Kromozom Anomalileri	12
2.2.1. Down Sendromu	12
2.2.2. Edwards Sendromu ve Patau Sendromu	15
2.2.3. Turner Sendromu	15
2.2.4. Klinefelter Sendromu	16
2.3. Prenatal Tanı	17
2.3.1. Tarihçe	17
2.3.2. Prenatal Tarama ve Tanı Testleri	18
2.3.2.1. Tarama testleri	19
2.3.2.1.1. Birinci Trimester Tarama Testi	23
2.3.2.1.2. İkinci Trimester Tarama Testi	24
2.3.2.2. Tanı Testleri	26
2.3.2.2.1. Koryonvillus Örneklenmesi	26
2.3.2.2.2. Amniyosentez	27
2.3.2.3. Sitogenetik değerlendirmeler	28
2.4. Prenatal Tarama Testlerindeki Güncel Gelişmeler	29
2.4.1. Serbest Fetal DNA	30
2.4.2. Fetal mRNA	32
2.4.3. mikroRNA	33
2.4.3.1. miRNA Biyogenezi	34
2.4.3.2. Gebelik ve miRNA	37
2.4.3.3. Non-invaziv Prenatal Taramada miRNA'ların Kullanımı	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM	41
3.1. Materyal	41
3.1.1. Cihazlar	41
3.1.2. Sarf Malzemeler	41
3.1.3. Kullanılan Kitler	42
3.2. Çalışma Grubu	42
3.3. Örneklerin Alımı ve Saklanması	42
3.4. Yöntemler	44
3.4.1. Amniyosentez	44
3.4.2. Sitogenetik Analiz	44
3.4.2.1. İn situ Kültür ve Harvest Yöntemi	44
3.4.2.2. Karyotipik Analiz	45
3.4.3. miRNA Ekspresyon Analizi	45
3.4.3.1. miRNA İzolasyonu	45

	Sayfa
3.4.3.2. cDNA Reaksiyonun Hazırlanması	48
3.4.3.3. Preamplifikasyon Reaksiyonunun Hazırlanması	48
3.4.3.4. RT-PCR Mix ve Primer Hazırlanması	50
3.4.3.5. Dynamic Array Hazırlanması	51
3.5. İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	53
4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Gebelerin Tanımlayıcı Bilgilerine Ait Bulgular	53
4.2. mikroRNA Analizine Ait Bulgular	54
4.2.1. Plazma Örneğindeki miRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Bulgular	54
4.2.2. Amniyotik Sıvı Örneğindeki miRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Bulgular	66
4.2.3. Plazma Ve Amniyotik Sıvı Örneğindeki miRNA Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular	81
TARTIŞMA	82
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	109

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa	
Tablo 2.1.	Konjenital malformasyonların etiyolojik sınıflaması	8
Tablo 2.2.	Anöploidi için serum tarama testlerine ait kriterler	20
Tablo 2.3.	Tekil gebeliklerde Trizomi 21 için tarama testlerinin özellikleri	22
Tablo 2.4.	Fetal otozomal trizomilerle ilişkili belirteçler	24
Tablo 2.5.	Anöploidi için serbest DNA'nın tahmini tespit oranı ve anne yaşına göre pozitif prediktif değeri	31
Tablo 3.1.	Analizi gerçekleştirilen miRNA listesi	43
Tablo 4.1.	Çalışmaya dahil edilen gebelere ait yaş ve gebelik haftalarına ait bulgular	53
Tablo 4.2.	Hasta, Kontrol-1 ve Kontrol-2 gruplarına ait tarama testi dağılımları	53
Tablo 4.3.	Hasta, Kontrol-1 ve Kontrol-2 gruplarına ait amniyosentez istem nedenlerinin dağılımları	54
Tablo 4.4.	Kontrol-2 grubuna karşı hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	55
Tablo 4.5.	Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	56
Tablo 4.6.	Kontrol-2 grubuna göre Kontrol-1 grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	58
Tablo 4.7.	Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	59
Tablo 4.8.	Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	61
Tablo 4.9.	Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	63
Tablo 4.10.	Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	65
Tablo 4.11.	Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri	67
Tablo 4.12.	Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri	69
Tablo 4.13.	Kontrol-2 grubuna göre Kontrol-1 grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri	71
Tablo 4.14.	Amniyotik sıvı örneğindeki Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri	73
Tablo 4.15.	Amniyotik sıvı örneğindeki Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki miRNA ekspresyon düzeyleri	75
Tablo 4.16.	Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri	77
Tablo 4.17.	Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Dünyada 2015 yılındaki 2.68 milyon yenidoğan ölümünün nedenleri	5
Şekil 2.2. Down Sendromu karyotipi	13
Şekil 2.3. Anöplidilerin maternal yaş ile ilişkileri	13
Şekil 2.4. Anöploidilerin gebelik haftası ile ilişkileri	14
Şekil 2.5. Gametogenezdeki Robertsonian translokasyon	14
Şekil 2.6. Edwards sendromu ve Patau sendromu	15
Şekil 2.7. Turner sendromu	16
Şekil 2.8. Klinefelter sendromu	17
Şekil 2.9. Trizomi olan gebeliklerin maternal yaşına göre prevalansı	19
Şekil 2.10. Anöploidi tarama testlerinin karakteristikleri	21
Şekil 2.11. Koryonvillus örneklenmesi	27
Şekil 2.12. Amniyosentez	28
Şekil 2.13. miRNA biyogenezini ve miRNA aracılı hedef mRNA supresyonunu gösteren şematik diyagram	35
Şekil 2.14. Ekstraselüler miRNA'nın, sadece AGO proteine bağlı olabileceği gibi apoptotik cisim, mikro vesiküller ve HDL parçacıkları içine kapsüllenmesi	37
Şekil 2.15. Plasenta ve rahimdeki miRNA'ların, gebelik sürecinde genetik, çevresel ve fizyolojik faktörlerin etkilerine göre ekspresyon değişimleri	38
Şekil 2.16. Gebelikte fetus ile anne arasındaki miRNA'ların karşılıklı iletişimi ve gebelikle ilişkili maternal ve fetal bozukluklarla bağlantısı	39
Şekil 2.17. Ekstrasellüler ve intrasellüler miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması	40
Şekil.3.1. Amniyosentez	44
Şekil 3.2. miRNA izolasyon kiti protokolü	47
Şekil 3.3. Dynamic array 96.96 görüntüsü	51
Şekil 4.1. Kontrol-2 grubuna göre Down sendromu grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	57
Şekil 4.2. Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	60
Şekil 4.3. Kontrol-1 grubuna göre Down sendromu grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri	62
Şekil 4.4. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeylerindeki kat farkı	64
Şekil 4.5. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre Down sendromu grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeylerindeki kat farkı	66
Şekil 4.6. Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri	68
Şekil 4.7. Kontrol-2 grubuyla karşılaştırıldığında, hasta grubu amniyotik sıvısındaki ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişim olan miRNA'lar	68
Şekil 4.8. Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında Down sendromu grubunun amniyotik sıvıdaki miRNA ekspresyon düzeyleri	70
Şekil 4.9. Kontrol-1 grubundaki amniyotik sıvıda bulunan miRNA ekspresyon düzeyleri	72
Şekil 4.10. Amniyotik sıvı örneğindeki kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri	74
Şekil 4.11. Amniyotik sıvı örneğindeki Kontrol-1 grubuna göre Down sendromu grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri	76
Şekil 4.12. Amniyotik sıvı örneğindeki iki kontrol grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri	78
Şekil 4.13. Amniyotik sıvı örneğindeki iki kontrol grubuna göre Down sendromu grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri	80

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
NT	Ense kalınlığı (Nuchal translucency)
PAPP-A	Gebelik ilişkili plazma proteini-A (Pregnancy Associated Plasma Protein-A)
β -hCG	Beta insan koryonik gonadotropin (Beta Human Chorionic Gonadotropin)
miRNA	mikroRNA
ICD	Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (The International Classification of Diseases)
ACOG	Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Derneği (American College of Obstetricians and Gynecologists)
DS	Down sendromu
AFP	Alfa-fetoprotein
DIA	Dimerik İnhibitin-A
uE3	Konjuge Olmayan Estriol
PPV	Pozitif prediktif değer
NPV	Negatif prediktif değer
CVS	Koryonvillus örneklenmesi
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
NIPT	Noninvaziv prenatal test
cffDNA	Serbest fetal DNA
cffRNA	Serbest fetal RNA
Rh	Rhesus
RT-PCR	Ters transkripsiyon-PCR
hPL	İnsan plasental laktojeni (human Placental Lactogen)
tRNA	Taşıyıcı RNA
rRNA	Ribozomal RNA
UTR	Untranslated region
pri-miRNA	Primer miRNA
pre-miRNA	Öncü miRNA
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
TRBP	Transactivating response RNA binding protein
dsRNA	Çift sarmallı RNA
ssRNA	Tek sarmallı RNA
Ago 2	Argonaute 2
RISC	RNA induced silencing complex
NPM1	Nükleofosmin 1
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
İMY	İleri maternal yaş
FR	Fold regulation
MeCP2	Metil-CpG bağlayıcı protein
HT-qPCR	Yüksek verimli kantitatif PCR
CBMCs	Kordon kanı mononükleer hücresi
HSC	Hematopoitik kök hücre
SOD1	Süperoksit dismutaz-1
MXD4	MAX dimerization protein 4
BCLAF 1	PBX1, Bcl-2 ilişkili faktör 1
FOXO1	Forkhead BOX 01

1. GİRİŞ

Konjenital anomaliler, dünya genelinde hastalık yükünün önde gelen nedenleri arasında ilk 20 içerisinde yer almaktadır. Bununla birlikte ölü doğumların ve neonatal ölümlerin de önemli bir nedeni olarak gösterilmektedir [1,2]. 1972 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından konjenital anomalinin tanımı, doğumdaki yapısal kusurlarla sınırlandırılmış ve sadece konjenital malformasyon terimi kullanılmıştır. Ancak günümüzde *konjenital bozukluk*, *doğumsal kusurlar*, *konjenital malformasyon* veya *konjenital anormallik* olarak da adlandırılan konjenital anomaliler, WHO tarafından 2012'de yayınlanan bilgi formuna göre, “doğum anında mevcut metabolik bozukluklar da dahil olmak üzere doğum sırasında veya intrauterin yaşam sırasında tanımlanabilen yapısal veya fonksiyonel anomaliler” olarak tanımlanmaktadır [2-4].

Konjenital anomalilerin paterni ve prevalansı, zaman içerisinde veya coğrafi konuma göre değişebilmekle birlikte küresel doğum prevalansı % 2-3 civarındadır. Konjenital anomaliler; klinik, etiyolojik ve patogenetik kriterlere göre sınıflandırılabilir [5,6].

Konjenital anomaliler hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yenidoğan ölümlerinde önemli bir neden oluşturmaktadır. 2013 yılındaki Global Hastalık Yükü Çalışması'na göre beş yaşın altındaki çocuklarda mortalitenin ilk on nedeni arasında konjenital anomalilerin olduğu gösterilmiştir. Ancak, konjenital anomaliler, yüksek gelirli ülkelerde özellikle bu yaş grubundaki çocuk ölümlerinin önemli bir nedeni sayılırken, düşük ve orta gelirli ülkelerde, enfeksiyon ve malnutrisyon gibi perinatal nedenlere göre ölüm oranlarının düşük olmasına orantılı olarak prevalansı düşüktür. Bu nedenlere ek olarak, bu hastalıkların yönetim maliyeti oldukça yüksek olduğundan halk sağlığının öncelikli başlıkları altında sayılmamaktadırlar. Ayrıca ölümcül olmayan çeşitli anomalilerle doğan çocukların sayıları konusunda da yetersiz veri bulunmaktadır [7-11].

Konjenital anomali nedenleri, enfeksiyöz, genetik veya çevresel kaynaklı olabileceği gibi, bunların kombinasyonlarından oluşan multifaktörler de konjenital defektleri indükleyebilmektedir. Konjenital anomali etiyoloji tespiti büyük oranda yapılamamakla birlikte en sık karşılaşılan ve tespit edilebilen nedeni genettir. Kromozom anomalileri, 1 yaşından önce teşhis edilebilen major konjenital anomalilerin yaklaşık % 15'ini oluşturur ve perinatal ölümlerin % 25'inde görülmektedir [2,12]. Anöploidi, klinik olarak kabul edilmiş gebeliklerin % 3 ila % 4'ünde ortaya çıkan ve klinik sitogenetikte en sık görülen kromozom anomalisi olarak kabul görmektedir. Anöploidinin en önemli nedeni olan kromozomların ayrılmaması (nondisjunction), hem mitoz hem de mayozda ortaya çıkabilmektedir, ancak mayoz bölünmede daha sık gözlenmektedir. Bu durum söz konusu olduğunda, bir çift kromozom anafazda tek kutba aktarıldığından, bir gamet kromozom çiftinin her iki üyesine sahip iken diğer bir gamet

bu kromozom çiftini içermemektedir. Döllenmeden sonra, embriyo ekstra bir üçüncü kromozomu barındırıyor ise trizomi veya normal kromozom çiftinden yalnızca birine sahip ise monozomi olarak adlandırılmaktadır. Kromozom sayısındaki anormalliklere neden olabilecek diğer bir durum olan anafaz gecikmesinde ise, bir kromozom, anafaz sırasında homolog kromozomu kadar hızlı hareket edemez ve kaybolur. Genellikle bu kayıp, bir öploide ve bir monozomik (ör. 45, XO / 46, XX) mozaik hücre popülasyonuna yol açmaktadır [13].

Özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sorun olmaya devam eden konjenital anomalilerin erken tanısı ve daha kapsamlı tetkik ve tedavilerin yapılmasına olanak sağlaması açısından antenatal takiplere erken haftalarda başlanması gerekliliği öne çıkmaktadır [6,14]. Bu nedenle, sonuçların erken gebelik yaşında verildiği ve noninvaziv bir yöntem olmasından dolayı birinci trimester tarama testi, bütün gebelere uygulanan bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Gebelikte yapılan noninvaziv tarama yöntemlerinin amacı, geniş bir popülasyonu tarayarak anomalili fetusleri erken dönemde saptamak ve invaziv girişimlerin mümkün olduğunca kullanım oranlarını azaltmaktır. Ancak fetusün anöploidi ve diğer kromozomal anomalilerini saptamak ve fetal hücreleri elde etmek için invaziv girişimler gerekmektedir. Amniyosentez ve koryonik villüs örnekleme gibi işlemler nedeniyle fetal kayıp (abortus, ölü doğum), fetal ekstremitte anomali riskleri artmaktadır. Bu nedenle aynı spesifikite ve sensitiviteye sahip noninvaziv tekniklere olan ilgi ve gereklilik giderek artış göstermektedir [14-18].

Prenatal tanı istemlerinin en sık sebebi, ilerlemiş maternal yaşla ilişkili olan Trizomi 21'dir. Tüm gebelere önerilen birinci trimester kombine tarama testlerinde risk hesaplaması, maternal yaş, sonografi ile belirlenmiş ense kalınlığı (Nuchal translucency=NT) ve iki serum belirteci olan gebelik ilişkili plazma proteini-A (PAPP-A) ve serbest beta hCG (serbest β -hCG) ölçümüne dayalıdır. Yaklaşık % 85-90 tespit oranına karşılık % 5-9'luk yanlış pozitiflik oranı olmasına karşın testlerin tanı gücü bulunmamaktadır [16-20]. Bununla birlikte, plasental proteinlerin analizlerine dayandırılarak yapılan ve olasılık skoru veren bu noninvaziv testler yerine kesin bir tanı sağlayan ve maternal plazmada bulunan fetal DNA ve RNA'nın hedeflenmesi ve analizine olanak sağlayan tekniklerin kullanımı, noninvaziv prenatal teşhis alanında giderek artış göstermektedir [19-21].

Noninvaziv prenatal tanı konusunda yapılan son çalışmalar, mikroRNA'ların (miRNA) umut verici moleküler belirteçlerin başka bir sınıfını temsil ettiğini düşündürmektedir. miRNA'lar, gen ekspresyonunun kilit posttranskripsiyonel düzenleyicileri olarak ortaya çıkan, küçük, 18-22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan RNA ailesidir (21). Son yıllarda plasenta-spesifik miRNA'lar ile ilgili çalışmalar artmış ve bununla birlikte bu miRNA'ların ekzozomlar ya da sinsityotrofoblastlar tarafından maternal sirkülasyona katılımı gösterilmiştir [22]. Ayrıca miRNA'ların oldukça stabil olması ve gerçek zamanlı kantifikasyona olanak

sağlaması nedeniyle, bu molekülleri noninvaziv tanısal amaçlı kullanılmak üzere ideal bir aday yapmaktadır [23, 24].

Bu nedenle bu çalışmada, konjenital anomalilerde, miRNA'ların amniyon sıvısı ve maternal plazmadaki korelasyonunun değerlendirilmesiyle, konjenital anomali prenatal tanısında noninvaziv bir belirteç olarak miRNA profilinin oluşturulması amaçlanmaktadır.

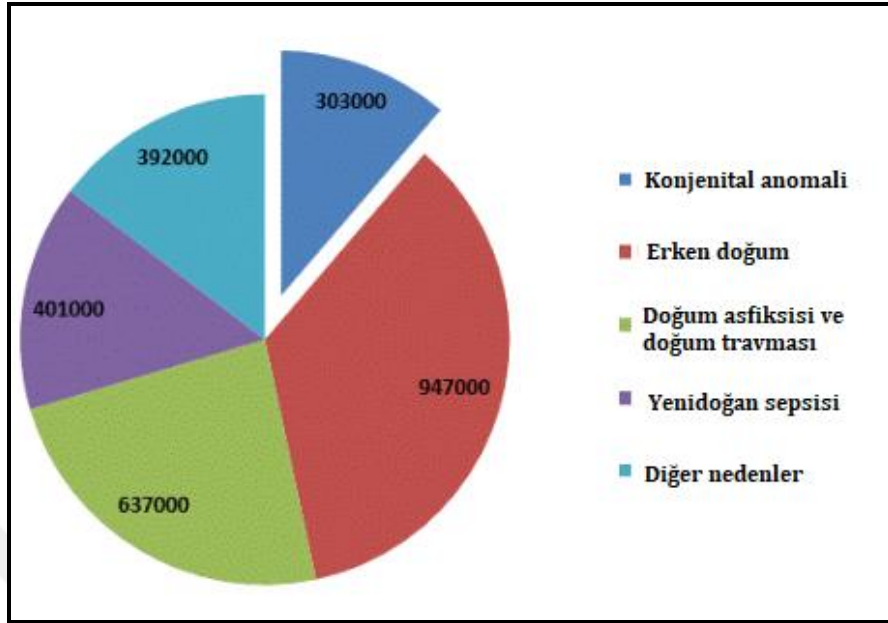


2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Konjenital Anomaliler

Konjenital bozukluk, doğumsal kusur, konjenital malformasyon veya konjenital anormallik olarak da adlandırılan konjenital anomaliler, doğumda, potansiyel olarak bir bebeğin sağlığını, gelişimini ve / veya sağ kalımı etkileyen prenatal kaynaklı koşulları tanımlayan bir terimdir [3]. Konjenital anomaliler, intrauterin yaşam sırasında ortaya çıkan ve prenatal olarak tanımlanabilen doğumda veya daha sonra işitme bozuklukları gibi nedenlerle bebeklik çağında da saptanabilen yapısal veya fonksiyonel anomaliler (örneğin, metabolik bozukluklar) olarak tanımlanmaktadır [2]. Bu yapısal ve fonksiyonel anomaliler, tekli defekt veya bir grup kusuru birlikte içeren çoklu defekt şeklinde de ortaya çıkabilmektedir. Konjenital anomalilerin çoğu, aynı fenotipik görünüme sahip olmalarına rağmen, nedenleri ve patogenetik yolları birbirinden oldukça farklılık göstermektedir. Dolayısıyla, doğumsal kusurlar veya genetik bozuklukların görüldüğü durumlarda, gebeliklerin yaklaşık % 3 ile % 5'inde daha karmaşık bir süreç görülmektedir [25]. Bu nedenle tanısal işlem genellikle uzun ve zor olup, anamnez, fenotip analizi, görüntüleme ve laboratuvar testleri de dahil olmak üzere uzun süreli takip gerektirmektedir [26,27]. Ayrıca hastalık tipine göre şiddeti de önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bazı konjenital anomaliler, spontan abortus, ölü doğum veya erken postnatal dönemde görülen ölüm ile ilişkilidir [25].

Konjenital anomaliler bebek ölümlerinin en önemli nedenleri arasında sayılırken aynı zamanda, çocukluk çağında görülen ölümlerde de başlıca sebep olarak gösterilmektedir [28]. 2015 yılındaki global yenidoğan ölüm nedenleri arasında ilk beşte olan konjenital anomalilere bağlı global ölümler, 1990 yılında 750.6 bin iken 2013 yılında 632.1 bine gerilemiştir ve yaşa bağlı olarak standardize edilen ölüm oranları ise sırasıyla 100.000'de 11.0 ve 8.7 olarak belirlenmiştir (Şekil 2.1) [2,28]. Ancak konjenital kalp anomalileri (323.4), nöral tüp defektleri (68.9), Down sendromu (36.4) ve kromozomal yeniden düzenlenmeler (17.3) gibi ölümcül konjenital anomalilerin alt tiplerine bağlı ölümlerin 2013 yılında bile hala binlerce kişi olduğu tahmin edilmektedir. Diğer konjenital anomalilerin az da olsa sağkalım etkisi bulunmaktadır [28].



Şekil 2.1. Dünyada 2015 yılında sayısı 2.68 milyon olan yenidoğan ölümünün nedenleri [2].

2.1.1. Konjenital Anomali Sebepleri ve Risk Faktörleri

Konjenital anomalilere bir veya daha fazla genetik bozukluk, besinsel, enfeksiyöz veya çevresel faktör sebep olmakla birlikte, tüm konjenital anomalilerin yaklaşık % 50'sinin kesin nedenlerinin belirlenmesi güçtür [2].

Genetik faktörler

Genler birçok konjenital anomalide önemli rol oynamaktadır. Bu durum, anomaliyi kodlayan kalıtsal genler yoluyla veya mutasyon sonucu genlerdeki ani değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır [2].

Akraba evliliği, nadir görülen genetik doğumsal anomalilerin yaygınlığını arttırdığı gibi aynı zamanda yenidoğan ve çocukluk çağı ölümü, engelli ve diğer anomalilerin oranını iki katına çıkarmaktadır. Nadir görülen bazı genetik mutasyonların prevalansı etnik topluluklarda oldukça yüksektir [2].

Sosyoekonomik ve demografik faktörler

Düşük gelire sahip olmak konjenital anomalilerin dolaylı bir belirleyicisi olabilir ki nitekim kısıtlı kaynağa sahip aileler ve ülkelerde daha yüksek sıklıkta görülmektedir. Majör konjenital anomalilerin % 94'ünün düşük ve orta gelirli ülkelerde ortaya çıktığı bildirilmektedir. Dolaylı ancak yüksek riske sahip olan bu faktör, gebelerin yeterli ve besleyici gıdalara erişim olasılığının az olması, ajanlara veya enfeksiyon ve alkol gibi faktörlere daha fazla maruz kalma durumu, sağlık bakımına ve prenatal taramaya erişim olasılığının daha düşük olması ile ilişkilendirilmektedir. Düşük gelir ile ilişkili olan bu faktörlerin, anormal prenatal gelişim insidansını indükleyebileceği veya arttırabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte, aşılama, temel gıdaların güçlendirilmesi veya takviye yoluyla yeterli miktarda folik asit veya iyot alımı, antenatal bakımın yeterli olması gibi etkenlerin bazı konjenital anomalilerin önlenabilir hale gelmesinde önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmektedir [2].

Anne yaşı, anormal intrauterin fetal gelişim için bir risk faktörüdür. İleri anne yaşı, Down sendromu da dahil olmak üzere kromozomal anomalilerin riskini arttırmaktadır [2].

Çevresel faktörler

Bazı pestisitlere ve kimyasal maddelere, ayrıca belirli ilaçlara, alkol, tütün ve radyasyona gebelik sırasında maruz kalma, konjenital anomalilere sahip fetus veya yenidoğan riskini arttırabilmektedir. Atık alanlarında, fabrikalarda veya madenlerde çalışmak veya yaşamak, annenin diğer çevresel risk faktörlerine veya beslenme yetersizliklerine maruz kalması durumunda bir risk faktörü olabilmektedir [2,29].

Enfeksiyonlar

Frengi ve kızamıkçık gibi gebelik sırasında yaşanan enfeksiyonlar, düşük ve orta gelirli ülkelerde konjenital anomalilerin önemli bir nedenidir [2].

Anne beslenme durumu

Maternal folat eksikliği, nöral tüp defekti oluşum riskini arttırabileceği gibi, aşırı miktarda A vitamini alımının da embriyo veya fetusün normal gelişimini etkileyebileceği bildirilmektedir [2].

2.1.2. Sınıflandırması

Yenidoğanın yaşam kalitesini, fiziksel, sosyal ve sağlık durumunu etkileyen anomaliler "major" anomaliler olarak tanımlanmaktadır. Majör anomaliler, klinik kriterlere dayanarak, tıbbi veya cerrahi tedaviye ihtiyaç duyan fonksiyon bozukluğuna neden olan morfogenetik bozukluklardır. Buna karşılık, "minör" anomaliler, kısa ya da uzun vadede yenidoğan sağlığına çok az ya da hiç etkisi olmayan anomaliler olarak tanımlanmaktadırlar. Minör anomaliler (doğum prevalansı < % 4) veya fenotipik varyantlar (doğum prevalansı > % 4) fonksiyon bozukluğuna neden olmayan ve tıbbi destek gerektirmeyen kusurlardır [5,30].

Konjenital anomalilerin nedenleri büyük ölçüde değişiklik göstermekle birlikte birçok anomali tanımlanmamış etiyojiye sahiptir (Tablo 2.1)[5].

Etiyolojik kriterlere dayanarak,

- Malformasyonlar, genetik kökenli olup gelişim sürecinin intrinsik hatalarından kaynaklanan primer morfogenetik defektlerdir;
- Distrupsiyon'lar (sekonder), çevresel faktörlerin, normal gelişimsel sürece müdahalesi sonucu, organ veya doku gibi gelişim alanlarında global bir bozulma veya spesifik bir hasar şeklinde ortaya çıkmaktadır;
- Deformasyonlar, fetal gelişim sırasında harici bir kaynağın neden olduğu mekanik kompresyona (amniyotik bantlar, eşleştirme, uterin malformasyonlar ve kütleler) bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [5].

Patogenetik kriterlere dayanarak,

- Sendromlar, tek bir etiyolojik faktörden kaynaklanan, tüm yapısal defektlerin görüldüğü çoklu anomali modeli olarak tanımlanmaktadır;
- Sequence'lar, sekonder defektler zincirini tetikleyen bir başlangıç olayından kaynaklanan dismorfogenetik süreçlerin oluşturduğu kaskad ile karakterize edilmektedirler;
- Assosiyasyonlar, herhangi bir etiyolojik veya patogenetik korelasyon bulgusu olmaksızın farklı defektlerin rastgele beklenenden daha yüksek frekansta bulunmasıdır;
- Displaziler, spesifik dokularda görülen hücrelerin anormal yerleşmesi sonucu oluşan yapısal defektlerdir [5].

Tablo 2.1. Konjenital malformasyonların etiyolojik sınıflaması [5].

Birincil (Genetik)	
Kromozom anomalileri	Sayısal (Poliploidi, polizomi, monozomi)
	Yapısal (Delesyon, duplikasyon, insersiyon, translokasyon)
Monogenik	Nokta mutasyonları (Nonsense, missense, çerçeve kayması)
	Dinamik mutasyonlar (Üçlü amplifikasyon)
	Epigenetik düzenlenme (Baskılanma defektleri, uniparental dizomi)
Poligenik	
İkincil (Çevresel)	
Biyolojik ajanlar	Virüsler (Sitomegalovirüs, Kızamıkçık, Herpes virüsleri...)
	Bakteriler (<i>Treponema pallidum</i> ...)
	Parazitler (<i>Toxoplasma gondii</i> ...)
Kimyasal maddeler	İlaçlar (Antiblastikler, antikonvülsanlar, antibiyotikler...)
	Uyarıcı ve uyuşturucu maddeler (Alkol, sigara, kokain, opiyatlar...)
Metabolik koşullar	Hiperglisemi, hiperinsülinemi, hiperfenilalaninemi, hiperandrojenizm
Fiziksel ajanlar	İyonize radyasyonlar, elektromanyetik radyasyonlar
Vasküler bozulmalar	Subklavian arter vasküler bozulması İkiz-ikiz ayrışma dizisi
Mekanik nedenler (deformasyonlar)	Amniyotik bantlar
	Yapışık ikizler
	Oligohidramnios
	Uterin malformasyonlar
	Uterus tümörleri

Yapısal anomaliler genellikle fetal gelişimin kritik periyotlarında oluşan embriyogenezis hatalarına bağlıdır. Organ, sistem veya anomali tipleri gebeliğin kritik periyotlarına göre değişebilir. Öyle ki birinci trimester (1-13 hafta arası) genel olarak gebelik için en yüksek risk taşıyan dönemdir [3].

Uluslararası Hastalık Sınıflandırması

Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (The International Classification of Diseases (ICD)), epidemiyoloji, sağlık yönetimi ve klinik amaçlar için standart tanı aracı olarak dünya çapında kullanılmaktadır. Konjenital anomaliler, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)-WHO Version for;2016'da yer alan sınıflandırmada "konjenital malformasyonlar" başlığı altında verilmektedir. Bu sınıflamaya "konjenital malformasyonlar, deformasyonlar ve kromozom anomalileri" (Q00-Q99) dahil edilirken, "doğuştan olan metabolizma hataları" (E70-E90) hariç tutulmaktadır [31].

1. Sinir sisteminin konjenital malformasyonları (Q00-Q07)
 - Q00 Anensefali ve benzer malformasyonlar
 - Q01 Ensefalosel
 - Q02 Mikrosefali
 - Q03 Konjenital hidrosefali
 - Q04 Beyindeki diğer konjenital malformasyonlar
 - Q05 Spina bifida
 - Q06 Spinal kordun diğer konjenital malformasyonları
 - Q07 Sinir sisteminin diğer konjenital malformasyonları
2. Konjenital göz, kulak, yüz ve boyun malformasyonları (Q10-Q18)
 - Q10 Göz kapağı, lakrimal sistem ve orbita konjenital malformasyonları
 - Q11 Anoftalmi, mikroftalmi ve makroftalmi
 - Q12 Konjenital lens malformasyonu
 - Q13 Göz ön segmentinin konjenital malformasyonları
 - Q14 Göz arka segmentinin konjenital malformasyonları
 - Q15 Gözün diğer konjenital malformasyonları
 - Q16 Kulağın konjenital malformasyonları, işitme azlığı yapan
 - Q17 Kulaktaki diğer konjenital malformasyonlar (Preauriküler sinüs hariç) (Q18.1)
 - Q18 Yüz ve boyunun diğer konjenital malformasyonları
3. Dolaşım sisteminin konjenital malformasyonları (Q20-Q28)
 - Q20 Kalp odacıkları ve bağlantılarının konjenital malformasyonları
 - Q21 Kardiyak septanın konjenital malformasyonları
 - Q22 Pulmoner ve triküspit kapakların konjenital malformasyonları
 - Q23 Aort ve mitral kapakların konjenital malformasyonları
 - Q24 Kalbin diğer konjenital malformasyonları
 - Q25 Büyük arterlerin konjenital malformasyonları
 - Q26 Büyük venlerin konjenital malformasyonları
 - Q27 Periferik vasküler sistemin diğer konjenital malformasyonları
 - Q28 Dolaşım sisteminin diğer konjenital malformasyonları
4. Solunum sisteminin konjenital malformasyonları (Q30-Q34)
 - Q30 Burun konjenital malformasyonları
 - Q31 Larenksin konjenital malformasyonları
 - Q32 Trakea ve bronşun konjenital malformasyonları
 - Q33 Akciğerin konjenital malformasyonları
 - Q34 Solunum sisteminin diğer konjenital malformasyonları

5. Yarık dudak ve yarık damak (Q35-Q37)
 - Q35 Yarık damak
 - Q36 Yarık dudak
 - Q37 Yarık dudak ile birlikte yarık damak
6. Sindirim sistemi diğer konjenital malformasyonları (Q38-Q45)
 - Q38 Dil, ağız ve farinksin diğer konjenital malformasyonları
 - Q39 Özofagusun konjenital malformasyonları
 - Q40 Üst gastrointestinal yolun diğer konjenital malformasyonları
 - Q41 İnce barsağın konjenital yokluğu, atrezisi ve stenozu
 - Q42 Büyük barsağın konjenital yokluğu, atrezisi ve stenozu
 - Q43 Barsağın diğer konjenital malformasyonları
 - Q44 Safra kesesi, safra kanalları ve karaciğerin konjenital malformasyonları
 - Q45 Sindirim sisteminin diğer konjenital malformasyonları
7. Genital organların konjenital malformasyonları (Q50-Q56)
 - Q50 Over, fallop tüp ve geniş ligamentlerin konjenital malformasyonları
 - Q51 Uterus ve serviksin konjenital malformasyonları
 - Q52 Kadın genital organlarının diğer konjenital malformasyonları
 - Q53 İnmemiş testis
 - Q54 Hipospadias
 - Q55 Erkek genital organlarının diğer konjenital malformasyonları
 - Q56 Belirsiz seks ve psödohermafroditizm
8. Üriner sistemin konjenital malformasyonları (Q60-Q64)
 - Q60 Renal agenezi ve böbreklerin diğer küçülme defektleri
 - Q61 Kistik böbrek hastalığı
 - Q62 Renal pelvisin konjenital obstrüktif defektleri ve üreterin konjenital malformasyonları
 - Q63 Böbreğin diğer konjenital malformasyonları
 - Q64 Üriner sistemin diğer konjenital malformasyonları
9. Kas-iskelet sistemi konjenital malformasyon ve deformasyonları (Q65-Q79)
 - Q65 Kalçanın konjenital deformiteleri
 - Q66 Ayakların konjenital deformiteleri
 - Q67 Baş, yüz, vertebra ve göğüsün konjenital kas-iskelet deformiteleri
 - Q68 Konjenital kas-iskelet sistemi deformiteleri, diğer
 - Q69 Polidaktili
 - Q70 Sindaktili

- Q71 Üst ekstremitenin redüksiyon defektleri
- Q72 Alt ekstremitenin redüksiyon defektleri
- Q73 Ekstremitelerin redüksiyon defektleri, tanımlanmamış
- Q74 Ekstremitelerin diğer konjenital malformasyonları
- Q75 Kafatası ve yüz kemiklerinin diğer konjenital malformasyonları
- Q76 Vertebra ve kemik toraksın konjenital malformasyonları
- Q77 Tübüler kemikler ve vertebranın büyüme defektleri ile birlikte osteokondrodizplazi
- Q78 Osteokondrodizplaziler, diğer
- Q79 Kas iskelet sisteminin konjenital malformasyonları, başka yerde sınıflanmamış

10. Diğer konjenital malformasyonlar (Q80-Q89)

- Q80 Konjenital iktiyozis
- Q81 Epidermolizis bülloza
- Q82 Derinin diğer konjenital malformasyonları
- Q83 Memenin konjenital malformasyonları
- Q84 Deri eklerinin diğer konjenital malformasyonları
- Q85 Fakomatoslar, başka yerde sınıflanmamış
- Q86 Bilinen ekzojen nedenlere bağlı konjenital malformasyon sendromları, başka yerde sınıflanmamış
- Q87 Birden fazla sistemi etkileyen diğer tanımlanmış konjenital malformasyon sendromları
- Q89 Diğer konjenital malformasyonlar, başka yerde sınıflanmamış

11. Kromozom anomalileri, başka yerde sınıflanmamış (Q90-Q99)

- Q90 Down sendromu
- Q91 Edwards sendromu ve Patau sendromu
- Q92 Trizomiler ve otozomaların parsiyel diğer trizomileri, başka yerde sınıflanmamış
- Q93 Monozomiler ve otozomal kromozom delesyonları, başka yerde sınıflanmamış
- Q95 Kromozomal düzenlenmeler ve yapısal özellikler, başka yerde sınıflanmamış
- Q96 Turner sendromu
- Q97 Diğer seks kromozom anomalileri, kadın fenotip, başka yerde sınıflanmamış
- Q98 Diğer seks kromozom anomalileri, erkek fenotip, başka yerde sınıflanmamış
- Q99 Diğer kromozom anormallikleri, başka yerde sınıflanmamış

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, en sık görülen major konjenital anomaliler, konjenital kalp kusuru, nöral tüp defekti ve Down sendromudur. Bununla birlikte birçok fonksiyonel ve bazı yapısal defektin altında yatan neden olarak genetik defektler veya kromozomal anomaliler işaret edilmektedir [2,29].

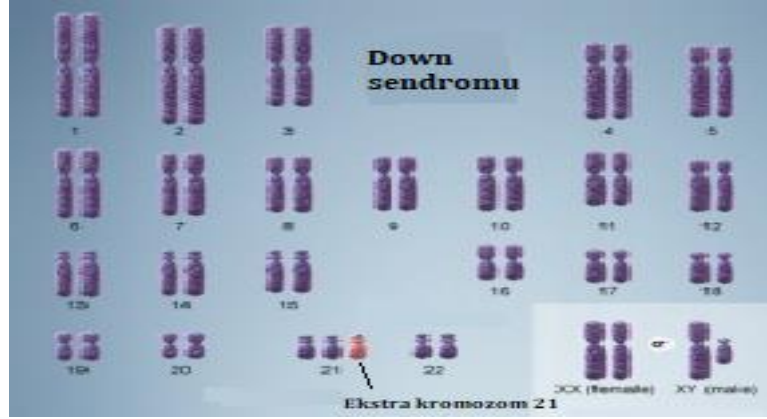
2.2. Kromozom anomalileri

Kromozomal anomaliler yaklaşık 150 canlı doğumda 1 görülmektedir [29]. Kromozomal düzensizlikleri, anöploidi, translokasyonlar, duplikasyonlar ve delesyonlar şeklinde olmak üzere yapısal ve sayısal anomalileri içermektedir (Tablo 2.1) [5]. Kromozomlarda görülen sayısal anomaliler yapısal olanlara göre daha yüksek sıklıkta görülür, hatta kromozom anomalilerinin yaklaşık % 95'inde görüldüğü bildirilmektedir [32]. Sayısal kromozom anomali grubunda yer alan ve en önemli kromozom bozukluğu olarak kabul edilen anöploidinin, kromozom ayrılmaması (nondisjunction) ve anafaz gecikmesi olmak üzere iki temel mekanizması vardır [33,34]. Anöploidide kromozom sayısı katları kadar değildir; bir veya daha fazla ekstra kromozom varlığı trizomi veya bir kromozom kaybı monozomi ile sonuçlanmaktadır [33,35-37].

2.2.1. Down sendromu

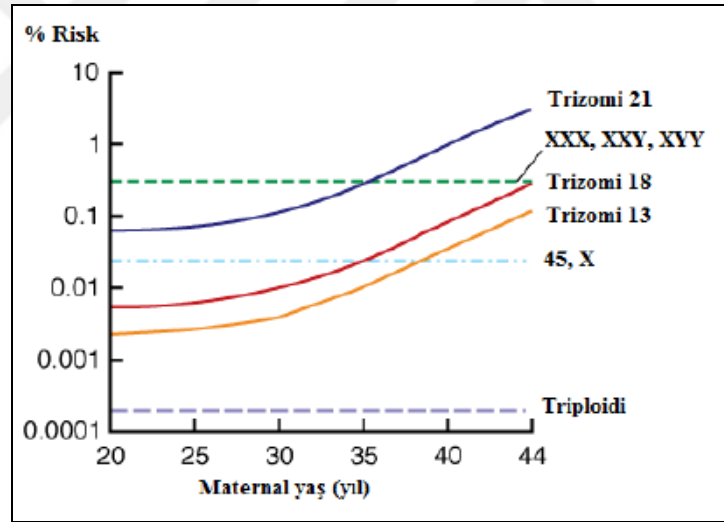
En sık rastlanan ve üzerinde en çok çalışılan kromozomal bozukluk trizomi 21 (Down sendromu) olup, görülme oranı 800 doğumda 1'dir [38]. Down sendromlu (DS) embriyo ve fetusların büyük çoğunluğunun 1. ve 2. trimesterde kaybediliyor olmasına rağmen görülme sıklığının yüksek olması sonucu, zeka geriliğinin de en sık saptanma nedeni olarak görülmektedir [39-41].

Down sendromlu bireylerde kromozom 21'den bir çift yerine kromozomun bir parçasından veya tamamından üç kopya bulunmaktadır (Şekil 2.2). Bu durumun altında yatan temel mekanizma, % 95 oranında mayotik nondisjunction iken, %4'ü Robertsonian translokasyonu ve % 1'lik çok küçük bir oranda ise mozaizm sonucudur [42,43].

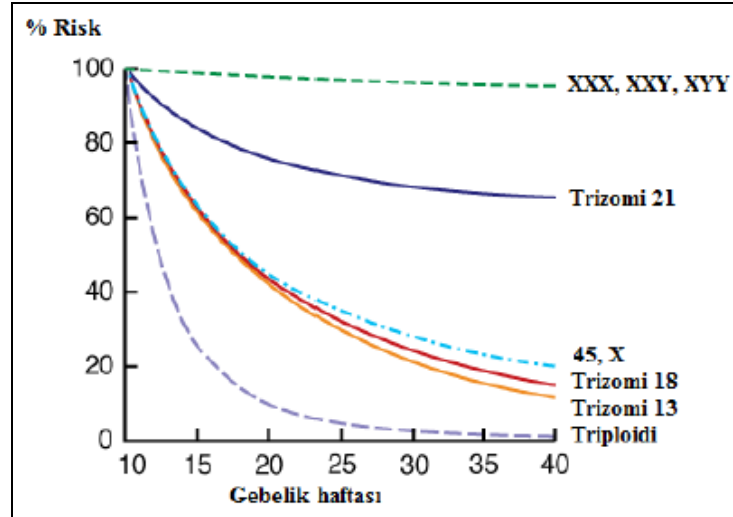


Şekil 2.2. Down Sendromu karyotipi [44].

Down sendromunun en önemli risk etmeni maternal kaynaklı nondisjunctionlarla ilişkili olan anne yaşdır. İlerlemiş maternal yaş ile birlikte risk artarken, gebelik haftasına bağlı olarak azalmaktadır ve diğer trizomi ve poliploidilerde de benzer şekilde bir ilişki bulunmaktadır (Şekil 2.3) (Şekil 2.4) [34,36,41,45].

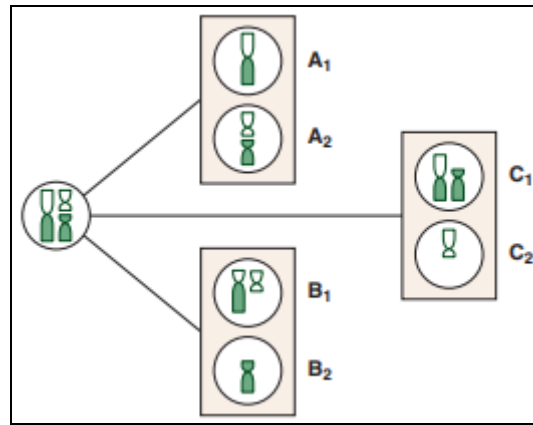


Şekil 2.3. Anöplidilerin maternal yaş ile ilişkileri [36].



Şekil 2.4. Anöploidilerin gebelik haftası ile ilişkileri [36].

Henüz ilişkileri tam olarak kanıtlanmamış olmakla birlikte annenin kullanımı şeklinde gerçekleşen ya da maruz kaldığı çevresel faktörler de risk etkeni olarak görülmektedir. Ayrıca ebeveynlerin translokasyon taşıyıcısı olması en önemli risk faktörüdür [44]. En sık görülen 14q ile 21q arasındaki translokasyonların büyük kısmının gametogenez sırasında de novo oluştuğu ebeveynlerin karyotipinde anormal bir durum olmadığından, DS riski önemli ölçüde azalmaktadır (Şekil 2.5)[13]. Ancak ebeveynler dengeli translokasyon taşıyıcısı iseler DS yineleme riski önemli ölçüde artmaktadır. Ayrıca, otuz yaşın altındaki annelerde translokasyon sonucu oluşan DS görülme sıklığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [46,47].



Şekil 2.5. Gametogenezdeki Robertsonian translokasyon [13].

A1, t (14q21q) dengeli translokasyon olan 22 kromozom. A2 normal, 22 kromozom. B1 anormal, (14q21q) translokasyonu ve ekstra 21'i içeren 23 kromozom. B2 anormal, kromozom 21 açısından monosomi. C1 anormal, t (14q21q) ve ekstra kromozom 14 olmak üzere 23 kromozom. C2 anormal, 22 kromozom ve kromozom 14 eksik.

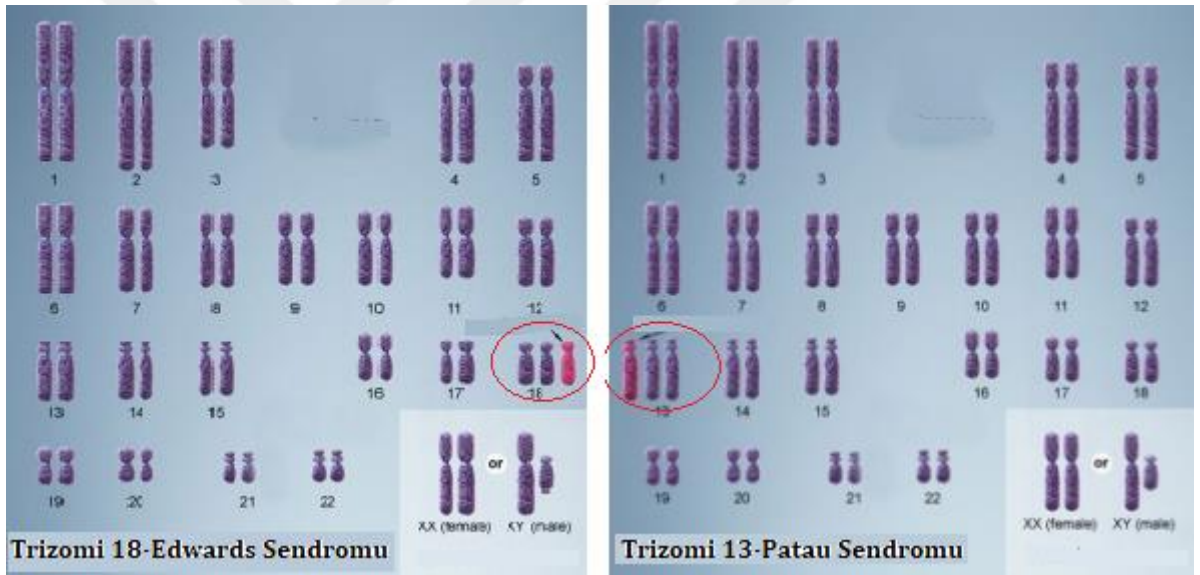
Down sendromuna neden olan patolojik durumlar kesin olarak bilinmemesine rağmen, zeka geriliği, küçük ve basık burun, el ve ayak anomalileri gibi tipik fenotipik bozukluklar ve

çeşitli sistem bozuklukları ile seyreder. Başta kardiyovasküler sistem olmak üzere merkezi sinir sistemi ve bağışıklık sistemi etkilenen sistemler arasında bulunmaktadır [41,48,49].

2.2.2. Edwards sendromu ve Patau sendromu

Down sendromundan sonra en sık görülen Trizomi 13 ve 18'de canlı doğumlar görülebilir, ancak insidansları belirgin olarak düşüktür [38, 50]. Her iki sendroma ait karyotip Şekil 2.6'da verilmiştir [44].

Trizomi 18'de (Edwards Sendromu) genellikle tüm sistemler etkilenmiştir ve fetuslerde gelişme geriliği görülür. Ayrıca yüksek oranda fetal hayatta ölümle sonuçlanmaktadır [36,51]. Trizomi 13'de (Patau Sendromu) ise sıklıkla kardiyak anomaliler ve holoprozensefali görülmektedir. Bunlara eşlik eden mikrosefali ve yüz anomalileri görülen bu sendromda da hayatta kalma süresi oldukça düşüktür [36].

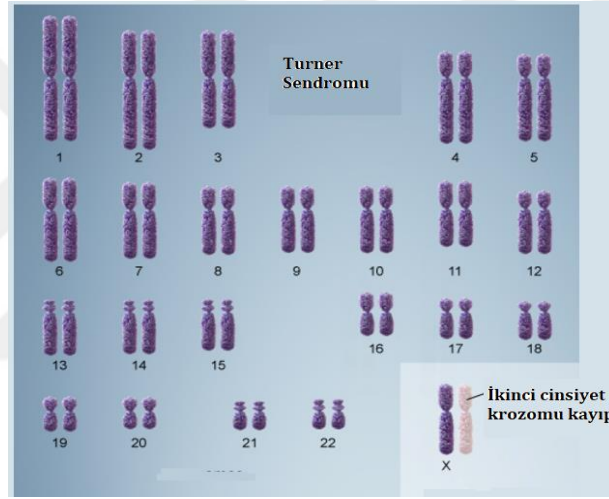


Şekil 2.6. Edwards sendromu ve Patau sendromu [44].

2.2.3. Turner sendromu

Otozomal anöploidlerden daha az sıklıkla görülen seks kromozom anöploidlerde fenotipik bulgular daha hafif bir seyir göstermektedir [38]. Cinsiyet kromozom düzensizlikleri olan hastalarda zeka geriliği görülmezken, fertilité azalması ya da infertilité ise karakteristik bir bulgu olarak kabul edilmektedir. Ancak cinsiyet kromozom sayısında artış olduğunda zeka geriliği ile birlikte fiziksel anomalilere de rastlanılmaktadır. Bununla birlikte bilinen tek monozomi, X monozomisi olan Turner sendromudur (Şekil 2.7)[33,38,44].

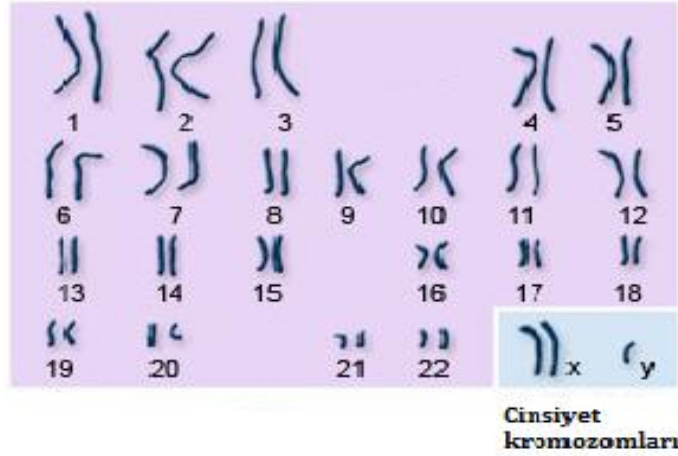
2500 doğumda 1 görülen prevalansı oldukça yüksek olan Turner sendromu vakalarının çoğunluğu (% 98-99) abortus ile sonuçlanmaktadır [52-54]. Turner sendromu olan kadınlarda, adölesan ve menarş yokluğuna kadar durumlarının farkında olmamaları sıklıkla görülen bir durumdur. Turner sendromu, prenatal vakaların % 64'ünde ve postnatal vakaların % 47'sinde X monozomisine bağlıdır [55]. Geri kalan vakalar, delesyon, duplikasyon, ring kromozomu veya mozaik anöploidiler gibi çeşitli X kromozom anomalilerinden kaynaklanmaktadır. Patognomonik klinik özellikler yoktur, ancak kısa boy, ağdalı boyun, aort koarktasyonu, lenf ödemi ve infertilite gibi tipik olarak bulunan klinik özellikler ve malformasyonlar bulunmaktadır. Obezite, skolyoz, glukoz intoleransı, ateroskleroz, hiperlipidemi ve juvenil romatoid artriti gibi durumlar da eşlik edebilmektedir [56]. Artmış ense kalınlığı, hidrops ve kistik higroma gibi prenatal sonografi ile saptanabilen fetal anomaliler de bulunmaktadır [57].



Şekil 2.7. Turner sendromu [44].

2.2.4. Klinefelter sendromu

Klinefelter sendromu görülme oranı yaklaşık 700-1000 canlı doğan erkekte 1'dir ve 47, XXY karyotipi ile ilişkilidir (Şekil 2.8)[44]. Klinefelter sendromunun başlıca fiziksel özellikleri, nispeten uzun boylu ve ince beden tipi, nispeten uzun ekstremiteler (özellikle bacaklar) ergenlikte hipogonadizm, infertilite, jinekomasti sıklıkla ve kriptorşidizm veya hipospadias nadiren görülmektedir. Ergenlikte virilizasyon olmaması yaygın bir durumdur ve hastaların çoğunlukla tıbbi müdahaleye başvurmasının nedenidir. Öğrenme güçlükleri, daha düşük sözlü anlama, davranışsal ve sosyal sorunların daha sık görülmesi ortak özellikleri arasında sayılmaktadır [13].



Şekil 2.8. Klinefelter sendromu [44].

Klinefelter sendromunun ikiden fazla X kromozomuna (karyotip 48, XXXY gibi) sahip birkaç karyotipik varyantı bulunmaktadır. X kromozomlarının sayısı arttıkça fenotip şiddetinde mental retardasyon insidansının arttığı ve tipik sendroma kıyasla daha fazla fiziki anormallik görülmektedir. Bazı klinefelter fenotipi olan bireylerin yaklaşık % 15'inde 47, XXY / 46, XY mozaizmi bulunmaktadır. Bu tür mozaik bireylerin daha değişik fenotipleri vardır ve testis fonksiyonu için biraz daha iyi bir prognoza sahiptirler. Genel olarak, Y kromozomunu içeren kromozom anöloidlerinin bebeklik döneminde veya çocukluk çağında klinik olarak teşhis edilme olasılığı düşüktür [13].

2.3. Prenatal Tanı

2.3.1. Tarihçe

Doğumsal kusurları belirlemede ilk tarama 1950'lerde ultrason kullanımı ile başlamıştır ve geçen süreç içerisinde obstetrik bakımdan ön plana çıkmıştır. Gerçek zamanlı gri-ölçekli görüntüleme 1970'lerde kullanıma girmiş ve gebeliğin erken dönemlerinde, gebeliklerin değerlendirilmesine izin vererek prenatal tanının geliştirilmesine katkıda bulunmuştur. Ultrasonografinin amaçları, gebelik yaşı ve fetus sayısının belirlenmesi, malformasyonlar için değerlendirme, sağlıklı fetal gelişimin test edilmesi, invaziv tanısal ve tedavi prosedürlerinin desteklenmesidir [54].

İlk prenatal kromozomal tanı testi olan amniyosentez, ilk olarak 1950'lerde tanımlanmıştır [58]. Genetik tarama ve enfeksiyöz değerlendirmesi de dahil olmak üzere çeşitli amaçlar için kullanılmakta olan amniyosentez giderek daha güvenli bir test haline gelmektedir.

Koryon villus örnekleme (CVS) başka bir tanı testidir ve gebeliğin daha erken dönemlerinde yapılmaktadır [48].

Daha sonraki yıllarda, gebelikte genetik anomalilerin taranması amacıyla, serum analit taraması ve serbest fetal DNA taraması gibi noninvaziv testler geliştirilmiştir [48].

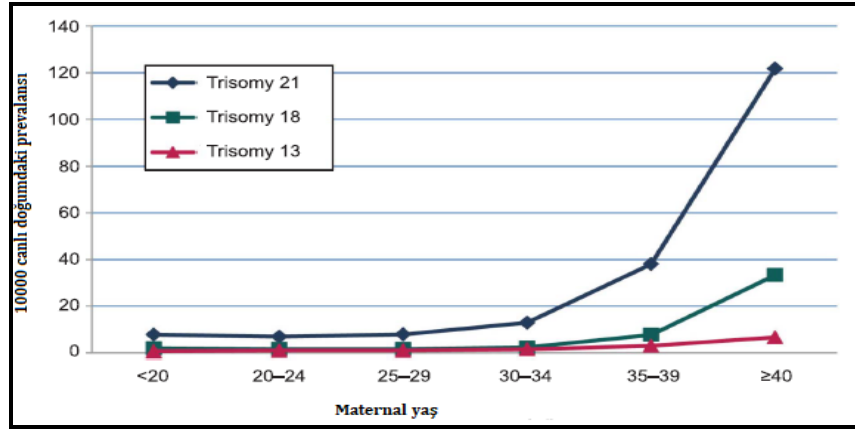
2.3.2. Prenatal Tarama ve Tanı Testleri

Fetal anöploidi için prenatal tarama, klinik olarak kullanılmaya başlanmasından itibaren geçen süre zarfında, tespit edilen anöploidili fetus oranında ve hatasız tanımlanan kromozomal anomali oranında dikkat çekici iyileşmeler olmuştur. Buna ek olarak, 35 yaş ve üzeri kadınlarda gebelik oranı yaklaşık % 5'ten % 15'e çıkmış ve bunun bir sonucu olarak anöploidi taraması sadece 35 yaşından küçük gebeler için kullanılabilen bir test olmaktan çıkıp tüm gebeliklere uygulanabilen bir test durumuna gelmiştir [59].

Canlı doğumlar, fetal ölümler ve gebelik sonlandırmalarını içeren popülasyon tabanlı kayıtlara göre kromozom anormallikleri doğumların yaklaşık % 0,4'ünü (1/250) etkilemektedir [60]. Trizomi 21, vakaların % 50'sinden fazlasını, trizomi 18 % 15'ini ve trizomi 13 %5'ini oluşturmaktadır. Yaklaşık % 12'si de, 45 X0 ve 47 XXX, XXY ve XYY gibi seks kromozomal anomalileridir. Kromozomal anormalliklerinin yaklaşık kalan % 18'i, ya polipoidi, mozaizm ve yapısal yeniden düzenlenmeler gibi anöploidi değildirler ya da şu an maternal serum taramasında tanımlanamamaktadırlar [35].

Anöploidi tarama programlarının başlangıcından beri, uzun dönem sağkalım ile uyumlu en yaygın anöploidi olmasından dolayı fetal trizomi 21 bu testlerin odak noktası olmuştur. Trizomi 18 ve 13, trizomi 21'e göre daha az yaygındırlar ve neonatal dönem haricinde yaşama nadiren uyumludurlar [61,62].

Nüfus temelli veriler, kromozom anomalilerinin fetal prevalansının arttığını ve bu oranın 35 yaş ve üzerindeki kadınların doğum oranındaki ve doğum yaşındaki artışa karşılık geldiğini göstermekle birlikte, canlı doğum prevalansının nispeten istikrarlı olduğunu ortaya koymaktadır [61]. Trizomi 21 ve diğer otozomal trizomilerin oranları maternal yaşla birlikte, özellikle 35 yaşından sonra artmaktadır. Şekil 2.9'da, trizomi 21, 18 ve 13 olan gebeliklerin maternal yaşa göre prevalansı gösterilmektedir [63]. Annelik yaşı öncelikle risk değerlendirmesi için temel nitelikte kullanılmaktadır. Ancak yalnızca yaş, bir kadının doğum öncesi tarama veya tanı testi için bir aday olup olmadığını belirleyememekle birlikte, bu testler tüm gebelikler için bir seçenek oluşturmaktadır. En önemlisi, bu testler hasta merkezli karar verme, her kadına, tüm risk faktörleri ve tercihlerine dayanan spesifik riskleri hakkında bilgi verilmesini sağlamaktadır [35,64,65].



Şekil 2.9. Trizomi olan gebeliklerin maternal yaşa göre prevalansı [63].

Hastalar, anöploidi taraması veya prenatal tanı ve sonuçları için birçok farklı karar bildirebilmektedir. Defekt, erken ve uygun gebelik haftasında tanımlandığında, bazı gebeler tarafından terminasyon seçilmektedir. Bununla birlikte bazı gebeler, ileri taramayı veya kesin tanı koyabilecek testlerin yapılmasını ya da postnatal dönemde defekt olan bebeğin bakımı başta olmak üzere hazırlık aşamasında onlara yardım edebilecek deneyimli uzmanlardan danışmanlık almayı seçebilmektedirler. Her bir hastanın kişisel hedeflerine uygun seçimler yapılabilmesi için riskler, faydalar ve sınırlamalar konusunda tam olarak bilgilendirilmelidir [66].

2007 yılında Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Derneği (ACOG) tarafından yayınlanan bültene göre, sadece yüksek risk altında olduğu düşünülen kadınlar değil ilk prenatal ziyaretlerindeki tüm kadınlar için anöploidi tarama veya invaziv test yapılmasının ideal olduğu bildirilmiştir [48].

2.3.2.1. Tarama testleri

Taramanın hedefi, asemptomatik, düşük riskli bir popülasyonda hastalık riskini saptamak veya tanımlamaktır. Etkilenen bireyleri tanımlamak veya teyit etmek amacıyla yapılan tanı testlerinin aksine, tarama, belirli bir hastalık için yüksek riski olan ve tanısal testlerin uygulanması gereken popülasyonu tanımlamak için hazırlanmıştır. İdeal bir perinatal genetik tarama testi aşağıdaki ölçütleri yerine getirmelidir [13]:

- ✓ Sık görülen veya önemli fetal bozuklukları tanımlayabilmesi,
- ✓ Uygun maliyetli ve kolay gerçekleştirilebilir olması,
- ✓ Yüksek saptama oranına ve düşük yanlış pozitifliğe sahip olması,
- ✓ Güvenilir ve tekrarlanabilir olması,
- ✓ Hastalığın tanı testinin olması,
- ✓ Gebe tarafından istenirse yasal sonlandırma seçeneğine olanak sağlayacak kadar erken pozitif ve güvenli olması [13].

Çoğu prenatal test taramaya yönelik olup, bu testler arasında serum taraması, genetik hastalık taşıyıcılık testleri (carrier screening) ve ultrason bulunmaktadır. Bu testlerin amacı kromozomal anomaliler veya doğum defektleri açısından yüksek riskli gebelikleri olan kadınları tanımlamaktır. Nöral tüp defektinin belirlenmesinde olduğu gibi ultrason tanısallık bir test olabilmesine karşın, serum taraması, yalnızca artmış risk altında olan gebelikleri tanımlamak için tasarlanmıştır. Farklı test ölçütleri ve zamanlamaları ile serum taramalarında çok sayıda seçenek oluşmaktadır [Tablo 2.2][38].

Tablo 2.2. Anöplöidi için serum tarama testlerine ait kriterler [38].

Tarama testi	Taramada gestasyonel yaş (hafta olarak)	Trizomi 21 için tespit oranı (%)	Pozitif tarama oranı (%)	Analitikler ve / veya ölçümler
Birinci trimester tarama	10-13 *	82-87	5	NT PAPP-A hCG
Üçlü tarama	15-22	69	5	hCG AFP uE3
Dörtlü tarama	15-22	81	5	hCG AFP uE3 DIA
Entegre	10-13 ve 15-22	96	5	Birinci trimester tarama sonrası dörtlü tarama
Kademeli ardışık tarama	10-13 ve 15-22	95	5	Birinci trimester tarama sonrası dörtlü tarama
Şartlı tarama	10-13 ve 15-22	88-94	5	Birinci trimester tarama sonrası dörtlü tarama
Serbest fetal DNA	9-10 haftadan sonra	99	0.5	Maternal serumda serbest fetal DNA'nın moleküler değerlendirmesi

AFP, Alfa-fetoprotein; DIA, Dimerik İnhibin-A; hCG, İnsan Koryonik Gonadotropin; PAPP-A, Gebelik İlişkili Plazma Proteini A; uE3, Konjuge Olmayan Estriol.

Tarama testleri dört kriter kullanılarak karşılaştırılabilir ve değerlendirilebilir: Sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer. Bunlar validite kriterleri olup, bir tarama testinde, hasta bireylerin, hasta olmayan bireylerden ayrımının iyi yapıldığının bir göstergesidir ve Şekil 2.10'da gösterilen denklemler kullanılarak hesaplanmaktadır [35].

	Hastalık +	Hastalık -
Tarama +	a	b
Tarama -	c	d

Sensitivite	$a/a+c$
Yalancı negatiflik oranı	$c/a+c$
Spesifite	$d/b+d$
Yalancı pozitiflik oranı	$b/b+d$
Pozitif prediktif değeri	$a/a+b$
Negatif prediktif değeri	$d/c+d$

Şekil 2.10. Anöploidi tarama testlerinde validite kriterleri [35].

Sensitivite, tespit oranı veya pozitif tarama sonucuna sahip anöploidili fetus taşıyan kadınların oranıdır. Analit tabanlı tarama testlerinin sensitivitesi zamanla önemli ölçüde artmıştır, örneğin maternal serum alfa-fetoprotein (AFP) ölçümü ile sadece % 25 iken, entegre test ile bu oran % 95'e kadar çıkmıştır. Anomali olmayan fetusu taşıyan ve negatif bir tarama sonucuna sahip olan kadınların oranı olan spesifitenin, yaklaşık % 95 oranında olması istenmektedir. Bu oran aynı zamanda, kadınların yaklaşık % 5'inin trizomi 21 için pozitif olduğunun da bir göstergesidir. Entegre teste kıyasla serbest fetal DNA testinde sensitivitede az da olsa bir iyileşme sağlanması, daha düşük yanlış pozitiflik oranına (daha yüksek spesifite) neden olarak bir avantaj sağlamaktadır ki bu da invaziv tanı yöntemlerinin gerekliliğinin azalabileceğini düşündürmektedir [35].

Anöploidi taramasında kullanılacak testin, diğerlerine göre ne kadar daha iyi çalıştığına karşılaştırması yapılırken, her test için sensitivite ve yanlış pozitif oranlarının değerlendirilmesi faydalı olabilmektedir. Analit tabanlı tarama testlerinde, ileri yaş kadınlarda sensitivite ve yanlış pozitiflik oranlarının daha yüksek olması komplike bir durum oluşturmaktadır [67]. Örneğin, birinci ve ikinci trimester risk değerlendirmesinde, trizomi 21 için birinci trimester taramasının sensitivitesi, 35 yaş ve üzeri kadınlarda % 95 ve yanlış pozitiflik oranı % 22 iken, 35 yaş altındaki kadınlarda, %75 sensitiviteye rağmen yanlış pozitiflik oranı sadece % 5 olarak saptanmıştır [68].

Pozitif prediktif değer (PPV), pozitif bir tarama sonucu olan bir hastanın anomalisi olan fetusa sahip olma olasılığıdır. En basit tanımıyla, PPV, tarama testi sonucudur ve 1: X olarak veya yüzde olarak ifade edilmektedir (Tablo 2.3) [35]. Analit temelli testler için PPV, dörtlü taramada yaklaşık % 3'ten entegre taramayla % 5'e kadar değişmektedir. Serbest fetal DNA

taramasının PPV'si, analit tabanlı testlerden çok daha yüksek olabilir. Bununla birlikte, PPV doğrudan prevalans ile ilişkilidir ve anne yaşına göre değişmektedir [35].

Tablo 2.3. Tekil gebeliklerde Trizomi 21 için tarama testlerinin özellikleri [35].

Tarama Testi	Sensitivite %	Yalancı pozitiflik oranı %	Pozitif prediktif değer* %
AFP	25	5	1
Üçlü tarama (AFP, hCG, estriol)	69	5	2
Dörtlü tarama (AFP, hCG, estriol, inhibin)	80-82	5	3
1.trimester taraması (NT, hCG, PAPP-A)	80-84	5	3-4
Entegre tarama	94-96	5	5
Serum entegre tarama	85-88	4.9	5
Ardışık tarama			
Basamaklı ardışık test	92	5.1	5
Bağımsız ardışık test	91	4.5	5
Serbest DNA taraması †			
Sadece pozitif sonuç	99	0.1	

AFP, Alfa-fetoprotein; hCG, İnsan Koryonik Gonadotropin; PAPP-A, Gebelik İlişkili Plazma Proteini-A.

*Pozitif prediktif değer incelenen toplam popülasyonu ifade eder ve herhangi bir hastaya uygulanamaz.

†Düşük fetal fraksiyon veya "no-call" gibi yorumlanamayan sonuç varsa, pozitif prediktif değeri herhangi bir anöplöidi için % 4 kadar yüksek bir orandır ve genel pozitif tarama oranı yaklaşık olarak % 5'tir.

Negatif prediktif değer (NPV), uygulanan tarama testinde, hastalığı olmayanların negatif olması oranıdır. Prevalansa göre değişmekle birlikte, analit tabanlı ya da serbest fetal DNA tarama testlerinin NPV genellikle maternal yaşa bakılmaksızın % 99'u aşmaktadır. Negatif bir sonuç, anomali olmayan fetusu garanti etmese de, çoğu olguda oldukça güvenlidir [69,70].

Güvenilirliği etkileyen diğer faktörler, bir testin tekrarlanabilirliği veya tutarlılığıdır. Analit tabanlı anöplöidi tarama testlerinin çoklu gebeliklerde güvenilirliği daha azdır, çünkü iki veya daha fazla fetus (ve plasenta) için anneden alınan serum analit konsantrasyonları ölçülmektedir [71]. Serbest fetal DNA taramaları da çoklu gebeliklerde daha az güvenilir olabilir, çünkü örnek her iki plasentadan da DNA içermektedir ve halihazırda önerilmemektedir [64,72]. Obez

kadınlardaki, serbest fetal DNA taramasında da, fetal fraksiyon düşüklüğü gibi nedenlerden dolayı sonrasında tarama veya tanı testi gerektiren bir sonuç verme olasılığı yüksektir [73].

2.3.2.1.1. Birinci Trimester Tarama Testi

Birinci trimester tarama, 10 ile 13 hafta + 6 gün gebelik haftaları aralığında, serum analit ölçümü ve ense kalınlığının ölçüldüğü ultrasonografi muayenesinin kombinasyonunu içeren ve sık kullanılan tarama testidir. Birinci trimester tarama testi ile, serbest β -HCG ve PAPP-A'nın da dahil edildiği serum belirteçleri, anne yaşı, geçmiş gebelik öyküsü, mevcut fetus sayısı, kilo, ırk ve ense kalınlığı ölçümlerini içeren bir risk tahmini yapılmaktadır. Bazı risk programları ek olarak nazal kemik varlığını veya yokluğunu da içermektedir. 1/300, yüksek riskli sonuç için cut-off değeri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır, ancak cut-off değeri laboratuvar tarafından belirlenmesi önerilmektedir (Tablo 2.4) [38].

3 mm'den büyük ense kalınlığının, hem anöploidi hem de yapısal malformasyonlar ile önemli ölçüde ilişkili olduğu kabul görmektedir [38,74-77]. Bu fenomeni açıklayan ilk gözlemsel çalışmada, ense kalınlığı 3 mm'den büyük olan fetusların % 35'inde anöploidi teyit edilmiştir [74]. Sonraki gözlemsel çalışmada, kromozomal olarak normal olan gebeliklerde 3.5 mm'den büyük ense kalınlığı gözlenen fetuslarda, kardiyak defektlerin yaygınlığı gösterilmiştir [78]. Tek gen defektleri ve merkezi sinir sistemi, kardiyak, iskelet ve abdominal duvar defektleri dahil diğer anomalilerin riski de önemli derecede artmaktadır [75]. Dolayısıyla, ense kalınlığı yüksek bir değerde olan fetus, ultrasonografi ile değerlendirilmeli ve anöploidinin var olup olmadığına bakılmaksızın diğer yapısal kardiyak malformasyonların varlığını değerlendirmek için fetal ekokardiyografi önerilmelidir [38].

Birinci trimester taramasının en önemli avantajı sonuçların erken gebelik yaşında verilmesidir. Bu durum, erken dönemde sonuçların yorumlamasına ve daha ileri tanı testleri, genetik danışmanlık, anne fetal tıbbi konsültasyon veya istenildiği takdirde terminasyon dahil olmak üzere oluşacak seçeneklere karar vermek için gerekli zamana olanak sağlamaktadır. Testin dezavantajı, ense kalınlığının ölçümünde sadece 0.5 mm'lik bir ölçüm tutarsızlığının bile, bu testin hassasiyetini önemli ölçüde düşürdüğünün gösterilmesidir [79]. Testin sensitivitesi, gebelik haftasına göre değişim gösteren dörtlü tarama testine göre daha yüksektir. Bunun nedeni, 13. haftadaki performansının dörtlü tarama ile benzer olmasına rağmen 11. haftadaki tespitinin geliştirilmiş olmasıdır [68].

Tablo 2.4. Fetal otozomal trizomilerle ilişkili belirteçler [35].

	Trizomi 21	Trizomi 18*
1st trimester		
NT	↑	↑
hCG	↑	↓
PAPP-A	↓	↓
2nd trimester		
AFP	↓	↓
hCG	↑	↓
Estriol	↓	↓
Inhibin	↑	NA

NT, Ense kalınlığı; hCG, İnsan Koryonik Gonadotropin; PAPP-A, Gebelik İlişkili Plazma Proteini-A; AFP, Alfa-fetoprotein; NA, Uygulanamaz.

* Birinci trimesterde, trizomi 18 ya da 13 için bir risk olabilir.

2.3.2.1.2. İkinci Trimester Tarama Testi

Üçlü tarama

1990'ların başında, trizomi 21'li fetus taşıyan gebelerde hCG'nin yükseldiği ve konjuge olmayan estriolün azaldığı tespit edilmiştir [80,81]. Bu iki analitin AFP ile kombinasyonu, üçlü test veya üçlü tarama adı altında klinikte kullanılmaktadır. Trizomi 21'i belirleme hassasiyeti yaklaşık % 60'a olmakla birlikte PPV yaklaşık % 2'lerde kalmıştır [82]. Buna ek olarak, üç analitin tümü azalır, trisomi 18'in saptanması olasılığı da % 60'lara ulaşmıştır. Test özellikleri açısından, üçlü test, trisomi 18 için trizomi 21'e göre daha güvenilirdir, çünkü yanlış pozitiflik oranı daha düşük olarak tespit edilmiştir [83].

Dörtlü tarama

Dörtlü tarama, 1990'lı yıllarda kullanıma giren ilk serum tarama testidir [48]. Dörtlü tarama, gebeliğin 15 ila 22. haftası arasında yapılabilmektedir ve hCG, AFP, inhibin A ve konjuge olmayan estriol gibi, gebe tarafından salınan proteinlerin serumdaki düzeyleri ölçülmektedir. Bu protein ölçümleri, risk tahmini yapabilmek için hastanın yaşı, ırkı, kilosunu, mevcut gebelikteki fetus sayısı, diyabet durumu ve gebelik haftası ile birleştirilmektedir. Tespit oranı ilk trimester taramasından biraz daha düşük olup, tespit oranı % 81 ve pozitif tarama oranı % 5 olarak bildirilmiştir [38,84].

Dörtlü taramanın avantajları, anöploidi yanında nöral tüp defekti tarama yeteneğini de göstermesidir. Serum AFP, fetus tarafından salgılanır ve amniyotik sıvıda ve dolayısıyla da

maternal serumda bulunur. Ayrıca, sonografin gerçekleştirilmesini gerektirmez ve bu nedenle, biraz daha ulaşılabilirliği ve uygulanabilirliği biraz daha yüksektir. Çeşitli merkezler, dördü taramada, inhibin ölçümleri içermeyen veya hiperglikosile edilmiş hCG'yi içeren beşli tarama gibi çeşitli varyasyonlar kullanmalarına rağmen, bu testlerin geliştirilmiş test özelliklerine sahip olmadığı bildirilmektedir [85,86].

Entegre, kademeli ardışık ve şartlı tarama

Çok sayıda tarama modaliteleri hem birinci trimester tarama hem de dördü tarama içermektedir. Bu yöntemler, entegre tarama, kademeli ardışık tarama ve şartlı taramayı içermektedir. Entegre taramada ilk olarak sonuçları hastaya veya sağlayıcıya sunulmayan birinci trimester testi uygulanır ve daha sonra dördü tarama gerçekleştirilmektedir. Bu değerlerin tümü, hasta için ikinci trimester anöploidi riski hesaplanırken kapsamlı bir risk oranı sağlamak için tek bir risk tahmini içine dahil edilmektedir. % 5 pozitif tarama oranı ile birlikte tespit oranı % 96 olup, serbest fetal DNA dışındaki herhangi bir mevcut serum tarama testine göre yüksek bir orana sahiptir. Dezavantajı, nispeten geç sonuçlar verilmesinden dolayı seçeneklerin değerlendirilmesi konusunda zamanı sınırlandırmasıdır [48].

Hem kademeli ardışık tarama hem de şartlı tarama, hastaların birinci trimester tarama sonuçlarıyla ilişkilendirilmektedir. Kademeli ardışık tarama, birinci trimester tarama ve dördü taramanın yapılmasını içermektedir. Anöploidi bakımından yüksek risk altındaki hastalar için erken tarama ve tanı olanağının sağlanması açısından birinci trimester tarama sonuçları ulaşılabilir durumdadır. Şartlı taramada, birinci trimester sonuçları, yüksek, orta ve düşük riskli olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Yüksek riskli gruba daha sonra tanı testi uygulanırken, düşük riskli gruba başka test uygulanmamaktadır. Orta risk grubuna ise dördü tarama önerilmektedir. Bu tarama yönteminde, tespit oranı % 80 ila % 94 arasında değişir ve pozitif tarama oranı % 5'tir [48].

Ultrasonografi

Gebeliğin tüm aşamalarında, hemen hemen tüm kadınlar, rutin bir obstetrik izlem için en az bir kere ultrasonografik incelemeye tabi tutulmaktadır. Ultrasonografi ile gebelik yaşı saptanabilmekte ve son adet tarihine göre hesaplanan gebelik yaşına göre, intrauterin gelişimin değerlendirilmesine olanak sağlanmaktadır. Ultrason ve prenatal bakımın birincil işlevi, doğum tarihinin doğrulanması olduğu kadar doğum kusurlarına yönelik gözlemlerin yapılabilmesidir. Anatomik anomalileri değerlendirmek için prenatal dönemde 18-23. gebelik haftaları arasında yapılan ikinci trimester transabdominal ultrasonografinin rutin hale gelmesi

gibi, pek çok gebe tarafından anöploidi için malformasyonlar veya belirteçlerin değerlendirilmesinde ultrason taraması tercih edilmektedir. Ayrıca çoğu hastaya, viyabilite, gebelik sayısı ve anensefali veya kistik higromalar gibi ilk trimesterde tanımlanabilen majör anomalilerin değerlendirilmesinde transvaginal veya transabdominal yolla birinci trimester ultrasonografi uygulanmaktadır. Bazı anomalilerin belirli anöploidi veya kromozomal defektlerle ilişkili oldukları bilindiğinden, bu anomaliler tanımlandıklarında bağlantılı olan koşulların var olma ihtimali de artış göstermektedir. 10-14. gebelik haftalarındaki ultrasonografik değerlendirmelerde saptanan en önemli fetal bulgu NT artışıdır ve artmış NT tespit edilen fetusların yaklaşık % 34'ünde kromozomal anomali olduğu bildirilmiştir [48,87,88].

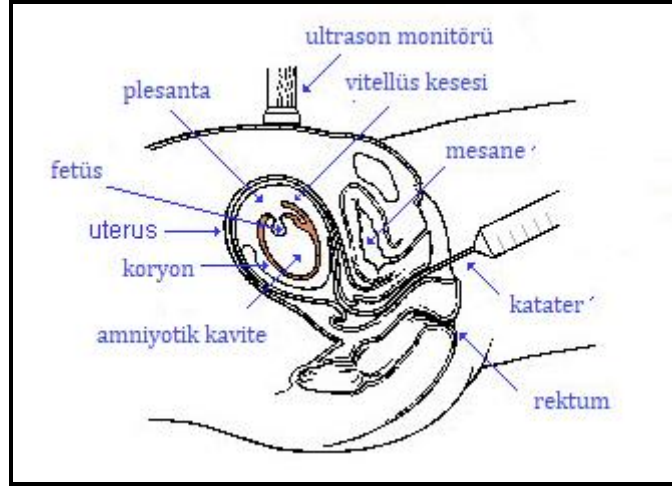
2.3.2.2. Tanı Testleri

Prenatal tanı testleri, fetusün belirli bir genetik nedene bağlı anomalisini belirlemede kullanılan ve fetal karyotip hakkında kesin bilgi sağlayan invaziv girişimlerdir. En yaygın endikasyonunun, 35 yaş ve üzerindeki ileri maternal yaş olduğu bildirilmiştir. Sıklıkla görülen diğer endikasyonları, pozitif anöploidi tarama sonuçları, ailede kalıtsal genetik hastalık öyküsü veya ultrasonda tanımlanan anomalileri içermektedir [48,89].

2.3.2.2.1. Koryonvillus örnekleme

Koryonvillus örnekleme (CVS), ilk trimesterde mevcut olan tek tanı testidir ve floresan in situ hibridizasyon (FISH), karyotipleme, mikroarray, moleküler test ve gen dizilimi de dahil olmak üzere tanı analizleriyle belirlenmektedir. CVS, gebeliğin 10. ve 14. haftaları arasında yapılır. CVS'in, geçmişte 9. haftadan önce uygulamaları yapılmış olsa da, bu durumun ekstremiteler riskini arttırdığı gösterilmiş olup günümüzde uygulanması önerilmemektedir [87,90].

Koryonvillus örnekleme transservikal veya transabdominal uygulanabilmektedir. Her iki uygulamada da, koryonik villus, amniyotik keseye girmeden ultrason kullanımı yardımıyla genetik değerlendirme için toplanmaktadır (Şekil 2.11) [91,92,93].



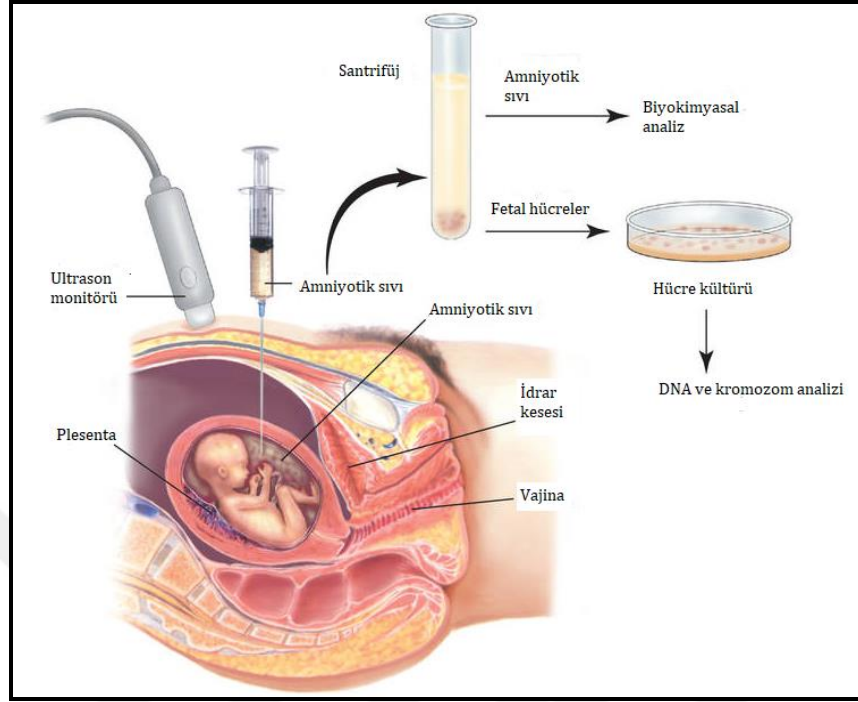
Şekil 2.11. Koryonvillus örnekleme [93].

Koryonvillus örnekleme prosedürünün avantajı daha erken prenatal tanıya izin vermesi nedeniyle daha sonraki belirsizlik süresini azaltması ve istenirse daha erken ve dolayısıyla daha güvenli gebelik sonlandırmasına izin vermesidir. Bununla birlikte, CVS'nin dezavantajı, CVS sonuçlarının yaklaşık % 1 ile % 2'sinin gerçek fetal kromozom anomalilerinden ziyade plasentaya sınırlı mozaizmi yansıtabilmesidir. Plasentaya sınırlı mozaizm, gestasyonel yaş açısından daha küçük bir bebek olma riskini artırabilmektedir [94]. Serbest fetal DNA taramasının son zamanlarda artan kullanımı ile giderek CVS'nin uygulanma oranı azalış göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri de 455'te yaklaşık 1 oranında gebelik kaybına neden olmasıdır [91,92].

Amniyosentez

Amniyosentez, gebeliğin 2. veya 3. trimesterlerinde mevcut olan tek tanı testidir ve 15. gebelik haftasından sonra herhangi bir gestasyonel yaşta uygulanabilmektedir. Bu teknikle, ultrasonografi yardımıyla steril bir iğne kullanılarak amniyotik kese içine girilmekte ve elde edilen amniyotik sıvı analiz için kullanılmaktadır (Şekil 2.12) [95]. Amniyotik sıvı, amniyon boşluğundaki koruyucu özellikte bir sıvı olmasının yanı sıra gebelik boyunca fetus gelişimi için değerli bir bileşendir. Amniyosentez sırasında alınan sıvı miktarı işlem sonrası kısa sürede tamamlandığından, bu yönden fetuse verdiği bir zarar bulunmamaktadır. Genetik hastalıkların değerlendirilmesine ek olarak, amniyosentez kültür veya polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak intra-amniyotik veya fetal enfeksiyonun varlığı veya nöral tüp defektini belirlemede amniyotik sıvıdaki alfa-fetoprotein ve asetilkolinesteraz düzeylerini değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Komplikasyonlar erken gebelik yaşlarında daha sık görülmekle birlikte, uygulama sonrası görülen komplikasyonlar fetus kaybı, kanama ve enfeksiyon riskidir. Amniyosenteze bağlı fetus kaybı, son çalışmalarda yaklaşık 900'de 1 olarak

tespit edilmiştir. Bu nedenle CVS'e benzer şekilde amniyosentez uygulaması sıklığı da, serbest fetal DNA taramasının artmış kullanımı ile birlikte azalmıştır [91,92,96].



Şekil 2.12. Amniyosentez [95].

2.3.2.3. Sitogenetik değerlendirmeler

Günümüzdeki koşullar göz önüne alındığında, kromozomal anomalili fetus taşıyan gebeliklerin belirlenmesinde CVS ve amniyosentez örneklerinden yapılan kromozom analizi en güvenilir yöntem olarak kabul görmektedir. Bununla birlikte, sitogenetik testlerle ilgili tespit edilen bazı konular, bu yöntemlerin klinik yararını sınırlayabilmektedir [48].

Tek bir numunede farklı karyotiplere sahip iki veya daha fazla hücre serisinin bulunması olarak tanımlanan kromozomal mozaizm amniyosentez olgularının yaklaşık % 0,1 ila % 0,3'ünde görülmektedir [97]. Birden fazla kültürden elde edilen çoklu koloniler aynı sonuçları ortaya koyduğunda, gerçek mozaizmi yansıttığı bildirilmektedir. Psödomozaizm, diğerlerinden farklı bir genetik yapı bulunduran tek bir hücredir ve primer hücre kültüründe ortaya çıkmakla birlikte genellikle klinik olarak anlamlı sayılmamaktadır. Fetuste gelişme geriliğine neden olan, plasentaya sınırlı mozaizm, gebeliklerin yaklaşık % 1 ila % 2'sinde görülmektedir. Sınırlı plasental mozaizm, serbest fetal DNA analizinde yanlış pozitif sonuçlara ve CVS örneklerinde de hataya neden olduğundan amniyosentez tercih edilmektedir. Ayrıca sık olmamakla birlikte hücre kültürü aşamasında da hatalar olabilmektedir ve CVS yoluyla yapılan örneklemelerde, amniyosentez ile kıyaslandığında daha sık görülmektedir [48].

Farklı genetik anomali tiplerini tespit etmek için tasarlanmış çoklu test metodolojileri mevcuttur. Geniş delesyon ve duplikasyonlar, karyotipte 5 milyondan fazla baz çiftinde tanımlanabilirken, 50.000 baz çifti düzeyinde olan küçük delesyon ve duplikasyonlar mikroarray teknolojisi ile tanımlanabilmektedir [98]. Majör otozomal anöploidleri tanımlamak veya DiGeorge sendromu gibi belirli delesyon ve duplikasyonlar için FISH teknolojisinden faydalanılmaktadır. Tek gen hastalıklarında, belirli bir gen panelinde belirli bir mutasyon olup olmadığını belirlemek için, çoğunlukla fazla hedefli moleküler yaklaşım gerekmektedir. İnvaziv testler için anöploidinin saptanması en yaygın endikasyon olduğundan, FISH sıklıkla kullanılan ilk testtir. Bu teknoloji hücre kültürü gerektirmez; sonuçlar genellikle 48 saat içinde elde edilmektedir. Ancak sonuçlar tanısal bir prosedürden elde edilmesine rağmen, nadir de olsa yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların raporlanması gerçekleşebildiğinden, bir tarama testi olarak düşünülmemelidir ve karyotip ile doğrulanmalıdır [99]. Mikroarray yönteminde kültüre edilmemiş hücreler kullanılabilirdiğinden daha hızlı bir dönüş süresi sağlayabilmektedir. Bu teknikle, canlı olmayan hücrelerden de sonuç elde edilebilir ve bu nedenle, ölü doğum vakalarına neden olma ihtimalinin yüksek olabileceği bildirilmektedir. Mikroarray hem anöploidi hem de kısa delesyon ve duplikasyonların tespitinin hızlı yapılabilmesinden dolayı, geleneksel karyotipten ziyade FISH ile birlikte başlangıç stratejisi olarak yapısal anomalilerin değerlendirilmesinde önerilmektedir [92].

2.4. Prenatal Tarama Testlerindeki Güncel Gelişmeler

Plasental proteinlerin analizlerine dayandırılarak yapılan ve olasılık skoru veren noninvaziv testler yerine, kesin bir tanı sağlayan ve maternal plazmada bulunan fetal DNA ve RNA'nın hedeflenmesi ve analizine olanak sağlayan tekniklerin kullanımı, noninvaziv prenatal tanı alanında giderek artış göstermektedir. Bu olasılık ilk olarak, maternal dolaşımda plasental fizyolojinin normal sürecinin bir sonucu olarak, erken gebelikten itibaren, gebe kadınların kan örneklerinde fetal DNA ve mRNA'nın bulunmasıyla ortaya atılmıştır ve daha sonra izole edilebilir ve moleküler analizlere olanak sağlayabilecek olduğu da gösterilmiştir [20,100]. Bu genetik materyaller, fetusün genetik haritası ile aynı ve plasentanın transkripsiyonel aktivitesinin göstergesi niteliğinde olduğu için, tanı gücü ile invaziv olmayan prenatal testlerin geliştirilmesi için olası biyolojik belirteçlerden oluşan bir rezervuar sağlamaktadır [101]. Maternal dolaşımdaki fetal DNA ve RNA'ların, özellikle fetal anöploidilerin tespitinde noninvasiv prenatal testi olarak kullanılabilir olabileceği, masif paralel sekanslama gibi teknik açıdan zor ancak doğru yöntemlerle kullanılarak belirlenmiştir [102-104]. Fetal DNA ve RNA'yı hedefleyerek elde edilen biyolojik bilgi, özellikle prenatal tanıya yönelik büyük bir potansiyele sahiptir. Nükleik asit yaklaşımında, ayrıca mikroRNA'lar gibi kodlamayan RNA'nın ve

düzenleyici DNA'nın (diferansiyel olarak metillenmiş DNA) analiz edilmesine olanak sağlamaktadır [105].

Noninvaziv prenatal testlere (NIPT) artan ilgi ile birlikte özellikle maternal kandaki serbest fetal DNA (cffDNA) analizine dayanan NIPT ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve bunun sonucunda günümüzde klinik olarak trizomi 21 ve diğer yaygın kromozom anöplodileri taraması için kullanılmaktadır [106,107]. Yakın gelecekte cffDNA analizinin fetal tek gen hastalıklarının saptanmasına kadar uzanacağı öngörülmektedir [108].

Öte yandan, serbest fetal RNA'lar (cffRNA) ve DNA metilasyon analizi de NIPT tabanlı testler için yeni uygulamalar geliştirmekte fırsatlar sunmaktadır. DNA metilasyonu ve kodlamayan RNA'lar, gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Dokuların mRNA gen ekspresyon profili hücrel aktivite bir yansıması olarak kabul görmektedir. Bu nedenle, maternal plazmada fetal türevli DNA metilasyonu ve transkriptomik profillerin analizinin, genetik veya kromozomal defekti ile direkt ilişkili olmanın ötesinde, fetal veya gebelik ilişkili hastalık ve patolojilerin de gözlemlenmesine olanak sağlayabileceği bildirilmektedir [108].

2.4.1. Serbest fetal DNA

Serbest fetal DNA, 2011 yılında ACOG ve 'Society for Maternal-Fetal Medicine' dernekleri tarafından önerilmesiyle birlikte, noninvaziv prenatal tarama testleri arasında sayılmaya başlanmıştır. Bu yeni teknolojide, gebeden alınan kan örneğinden elde edilen maternal serumdan cffDNA fragmanları izole edilmektedir. Bu serbest DNA başlıca plasental kaynağıdır ve apoptotik trofoblastlardan salınmaktadır. Fetal fraksiyon gestasyonel yaşla birlikte artış göstermekle birlikte, % 10'dan fazla oranda bulunma olasılığı daha yüksek olduğundan en erken 10. gebelik haftasından sonra ölçümü güvenilir sayılmaktadır. cffDNA'nın 10. gebelik haftasında bulunma olasılığı % 4 ile % 13 oranında değişmektedir, ancak güvenilir bir analiz için fetal fraksiyonun en az % 4'ün üzerinde olması gereklidir [64]. Serbest DNA analizinde 2 teknik kullanılmaktadır; Bunlar, masif paralel saçma yöntem vasıtasıyla, hedef masif paralel dizileme veya tek nükleotid polimorfizmlerinin araştırılması yoluyla değerlendirilmiştir [109,110].

Laboratuvarlar tarafından sonuçların raporlanma şekilleri farklılık gösterebilmektedir. Sonuçlar, anöplidi saptanmış veya saptanmamış, pozitif veya negatif ya da anöplidi için yüksek riskli (> % 99) veya düşük riskli (<1/10000) şeklinde rapor edilmektedir. Bununla birlikte istenirse cinsiyet kromozomu bilgisi rapora eklenmektedir [48,110].

Serbest fetal DNA tarama testinin yapılan güncel meta-analizlerde trizomi 21 için, % 99 tespit oranına sahip olduğu bulunmuştur ve bu oran mevcut tüm tarama testlerine göre en yüksek tespit oranıdır. Trizomi 18, 13 ve seks kromozom anomalileri için tespit oranları, trizomi 21'e göre düşük bulunmuştur (Tablo 2.5) [38,111].

Tablo 2.5. Anöploidi için serbest DNA'nın tahmini tespit oranı ve anne yaşına göre pozitif prediktif değeri [38].

	Karma tespit oranı (%)	25 yaşta PPV (%)	35 yaşta PPV (%)	45 yaşta PPV (%)
Trizomi 21	99.2	51	79	98
Trizomi 18	96.3	15	39	90
Trizomi 13	91.7	7	21	Hesaplamak için yeterli veri bulunmamaktadır
Monozomi X	90.3	41	41	41

PPV, Pozitif Prediktif Değer.

Serbest fetal DNA taramasına yönelik endikasyonlar, maternal yaşın doğumda 35 yaşın üstünde olması, anöploidi riskinin arttığını gösteren ultrasonografik bulgular, daha önceki gebeliklerde trizomi öyküsü, trizomi 13 veya 21 riskini arttırdığından ebeveynlerdeki dengeli Robertsonian translokasyonu ve yüksek riskli birinci trimester veya ikinci trimester anöploidi tarama sonuçları olarak belirlenmiştir [64,112]. Yapılan daha önceki çalışmalarda, test özelliklerini sağlayan ancak bir risk tahmini hesaplayabilmek için yeterli fetal fraksiyonu olmayan hastaların dışlandığı dikkati çekmektedir. Ancak daha sonraki çalışmalarda, sonuçsuz olarak raporlanan durumlarda, anöploidi riskinin önemli ölçüde arttığı, düşük fetal fraksiyonun ise özellikle de trizomi 13 ve 18 ile ilişkili olduğu savunulmaktadır. Fetal fraksiyonu etkileyebilecek diğer faktörler arasında kilo bulunmaktadır ve obez kadınlarda düşük fetal fraksiyon riski artmaktadır [113].

Serbest fetal DNA, bir tarama testidir ve tavsiye edilen popülasyonda Trizomi 21 için pozitif prediktif değer çok yüksektir. Bununla birlikte, pozitif prediktif değer, hastalığın popülasyon içerisindeki prevalansına bağlıdır. Bu nedenle, pozitif prediktif değer, ortalama riskli bir popülasyonda önemli ölçüde düşük olması beklenmektedir. 2016 yılında yapılan retrospektif bir kohort araştırmasında, otozomal trizomilerle uyumlu, cffDNA sonuçları olan 105 hasta tanımlanmış; ancak bunlardan sadece % 82'si karyotip ile doğrulanmış ve geri kalan hastaların antenatal veya postnatal analizde normal karyotipe sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 9 hastanın kromozom anomalisinin tanısal doğrulanması olmaksızın gebeliğinin sonlandırıldığı tespit edilmiştir [100]. Bu nedenle, test sonucunun yanlış yorumlanmasının önlenmesi için, testten önce fetal sayı ve gestasyonel yaş teyit edilmeli ve ilk trimesterde tanımlanabilen majör anomalilerin varlığını değerlendirmek için ultrasonun önemi atlanılmamalıdır, çünkü bu analiz öncesi anöploidi riskini değiştirecektir [114]. Kistik higroma veya anomaliye rastlanıldığında, hastalar tarama testlerinden ziyade tanısal teste tabi tutulmayı seçebilirler ve bu durum prenatal tanıya daha erken zamanda ulaşılmasını sağlamaktadır [115].

Serbest fetal DNA'nın avantajları arasında rhesus (Rh) izoimmünizasyonu riski taşıyan gebeliklerde fetal Rh durumunu ve fetal cinsiyeti yüksek doğrulukla tanımlayabilmesi de bulunmaktadır. Ancak diğer otozomal anöploidler veya mikrodelesyonların söz konusu olduğu gebeliklerde çok fazla incelenmemiş olduğundan serbest fetal DNA kullanımı önerilmemektedir [38,64].

Serbest fetal DNA taraması, bazen maternal mozaizm veya nadiren maternal maligniteler de dahil olmak üzere maternal kromozomal anomalileri veya başka sağlık sorunlarını ortaya çıkarabilmektedir [116]. Maternal kromozom anomalileri veya malignite, rapor edilemeyen veya yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir. Yanlış pozitif sonuçların olası diğer kaynakları ise kaybolan ikiz sendromu ya da plasentaya sınırlı mozaizm olmasıdır. Serbest fetal DNA ile tarama, trizomi 21 için herhangi bir tarama testine göre en iyi tespit oranına sahip olmasına rağmen, ardışık tarama, tüm kromozomal anomaliler için serbest DNA'dan daha yüksek bir tespit oranına sahip olmaya devam etmektedir ve geleneksel serum taramasında tanımlanabilecek birçok kromozomal anomalinin serbest fetal DNA ile gözden kaçabileceğini göstermektedir [117].

2.4.2. Fetal mRNA

Gen ekspresyonunun ve protein sentezinin düzenlenmesinde önemli olan RNA'ların ekspresyon düzeyleri doku ve zamana spesifik olduğundan, cffRNA'ların analizi, fetal dokuların o sürece ait patofizyolojik durumu hakkında bilgi sağlayabileceği konusunda fikirler ortaya atılmaktadır. 2000 yılında, ters transkripsiyon-PCR (RT-PCR) kullanılarak maternal plazmada fetal türevli Y-kromozomuna özgü çinko parmak proteini mRNA'sının saptanması, maternal kanda fetal RNA varlığını ortaya koymuştur [20]. Bununla birlikte, maternal plazmada plasental kaynaklı mRNA [118] ve miRNA [24] transkriptlerinin varlığının keşfi ile fetal nükleik asit salımında plasentanın da önemli olduğu ortaya koyulmuştur.

Plazma fetal RNA'nın tespit oranının plazma fetal DNA'ya göre daha düşük olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiş olup ve bunun nedeni maternal kandaki fetal RNA'nın degradasyona uğraması olarak gösterilmektedir. İnsan plazmasındaki mRNA türlerinin, subüçümler partiküler formda paketlenmiş olduğu gösterilmiştir [20,118]. Dolaşımdaki mRNA'nın partiküler özelliğinin, olgunlaşmamış RNA moleküllerine kıyasla oldukça yüksek bir stabiliteye yol açtığı bildirilmiştir. Öte yandan, dolaşımdaki miRNA'lar çoğunlukla nonpartiküler yapıda olmalarına rağmen oldukça kararlıdır [24] ve miRNA'ların saç tokası yapısının stabilitelere katkıda bulunduğu öne sürülmektedir [108].

Bazı çalışmalarda placentamRNA'nın maternal plazmada stabil olduğu gösterilmiş olsa da, bu durumun nedeni degradasyondan koruyan mikropartiküllerin varlığı ile açıklanabilmektedir.

İlerleyen süreçte, plasentaya spesifik mRNA analizi kullanılarak gebelikte insan plasenta laktogeninin (hPL) RNA'sının ve hCG β -altbiriminin mRNA'sının saptanabilirliğini gösteren başka çalışmalar da yapılmıştır [20,118]. 2007 yılında, Lo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kromozom 21'de bulunan PLAC4 mRNA-SNP (tek nükleotid polimorfizmi) kullanılarak heterozigot fetusdaki ilişkili SNP'nin alellik oranı belirlenmiş ve diğer birçok çoklu belirteç tarama stratejisine kıyaslanabilir oranda sensitivite ve spesifite trizomi 21 tanısı koyulabileceğini göstermişlerdir. Bu stratejinin ek bir avantajı, serum biyokimyasal belirteçlerini kullanan mevcut stratejinin aksine örneklemin yapıldığı gestasyonel yaşın duyarsızlığıdır ve bu nedenle, bu stratejinin klinik kullanımının nispeten daha kolay olduğu bildirilmiştir. Ancak bu yöntemin temel dezavantajları, yöntemin polimorfizme bağımlı olması ve yalnızca heterozigot fetus için kullanılabilir olmasıdır. PLAC4 SNP'nin (rs8130833) çalışıldığı popülasyonda % 45'lik bir heterozigotluk oranı bulunmaktadır. Dolayısıyla kapsadığı düşük popülasyon oranının kromozom 21'den transkribe edilen birkaç genin SNP kombinasyonu ile telafi edilebileceği bildirilmektedir [119]. Bazı çalışmalarda, maternal plazmada tanımlanan eksprese edilmiş genin saptanması için oligonükleotit mikroarray kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile plasental doku gen ekspresyon profillemesini sistematik olarak saptaması çalışılmıştır ve altı gen tespit edilmiştir. Bunlar; hPL, β -hCG, CRH, TFPI2, KISS1 ve PLAC1 genleridir ve bunların transkriptleri maternal plazmada saptanmıştır [101].

Bu belirteçlerin fetal dokuların gen ekspresyon patterni hakkında önemli veriler sağlayabilmesi, plazma fetal RNA analizinin avantajları arasında ilk sırada bulunmaktadır. Örneğin preeklampsi gibi karmaşık gebeliklerde, CRH-mRNA'sının düzeyinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur [120,121]. Bu nedenle, daha ileri RNA belirteçlerinin geliştirilmesiyle, maternal plazma RNA analiziyle, fetuse ait birçok fizyolojik ve patolojik durum, gen ekspresyonunun noninvaziv bir yolla izlenmesine olanak sağlayabileceği öngörülmektedir. Plazma fetal RNA analizinin ikinci avantajı, cinsiyet ve polimorfizmden bağımsız olmasıdır. Üçüncüsü, bu belirtecin kullanımının, serbest fetal DNA'ya göre nispeten daha basit ve ucuz bir yöntem olmasıdır [118].

2.4.3. mikroRNA

Kodlama ve kod çözme, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve protein sentezi gibi birçok biyolojik role sahip olan RNA'ların yaklaşık % 95-98'ini kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA) oluşturmaktadır. ncRNA'lar, taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) gibi oldukça yüksek miktardaki RNA'ları ve uzun ncRNA ve miRNA gibi fonksiyonel olarak önemli RNA'ları içermektedir [122,123].

mikroRNA'lar, ilk kez 1993 yılında Harvard Üniversitesi'ndeki Ambros grubundan Lee ve arkadaşları tarafından nematod *Caenorhabditis elegans*'ta (*C. elegans*) tanımlanmıştır [124]. *C. elegans*'ın, hücre kaderini etkileyen mutantlar için taraması yapılırken protein kodlamayan Lin-4 ve let-7 olarak isimlendirilen iki gen tespit edilmiştir. Daha sonra mikroRNA veya miRNA olarak adlandırılan bu küçük RNA'lardan lin-4'ün hedefinin lin-14 mRNA'nın 3'- okunmayan bölgesi [untranslated region (UTR)] olduğu bulunmuştur. Lin-4'ün lin-14'e karşı kuvvetli baz dizisi tamamlayıcılığına sahip oldukları bulunmuş ve lin-4'ün, larva gelişimi boyunca lin-14 ekspresyonunu, mRNA translasyonunu baskılayarak düzenlediği ve lin-14'ün *C. elegans* gelişiminde erken ve geç hücre kaderi arasındaki zamansal geçişin düzenlenmesine katılan bir nükleer proteini kodladığı bulunmuştur. Ayrıca, *C. elegans*'da hücre kaderinin belirlenmesinin zamanlaması için gerekli olduğu bulunan let-7'nin tanımlanmasıyla evrimsel açıdan iyi korunmuş ve günümüzde kısa, kodlanmayan RNA grubunda olan miRNA ailesinin keşfi gerçekleşmiştir [125].

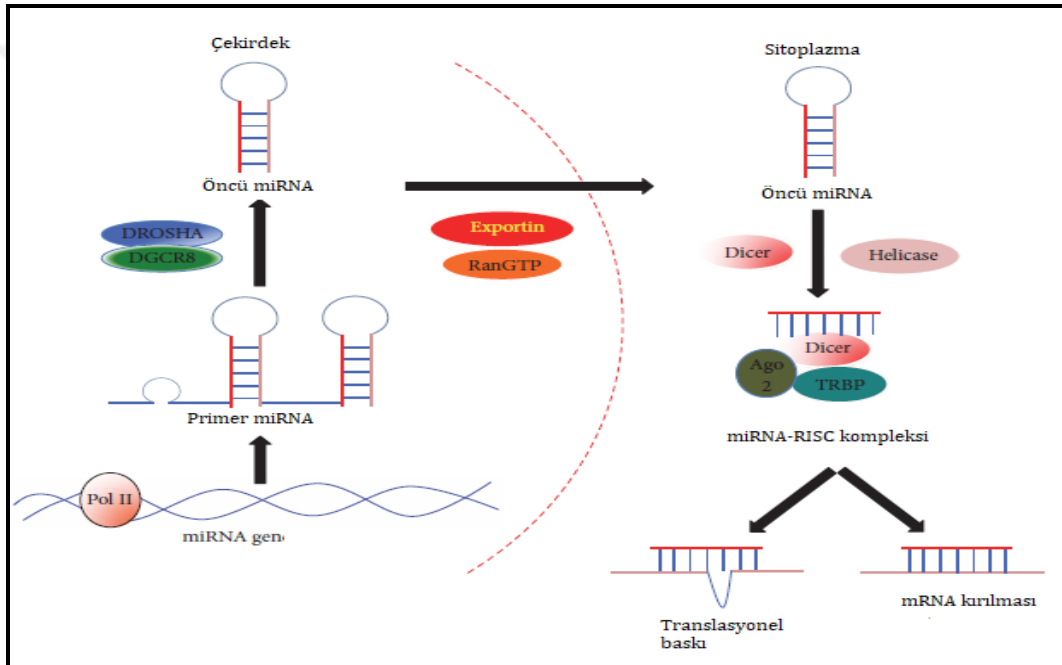
MikroRNA'lar tüm ökaryotik hücre tiplerinde eksprese edilir ve gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesine aracılık etmektedirler. miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-UTR'sinde yer alan kısmen eşlenik dizilere sahip oldukları, yüksek oranda korunmuş ve tohum adı verilen 6-8 nükleotidlik bir bölge aracılığıyla etkileşirler [126]. Böylece hedeflenen mRNA'ların stabilitesi ve protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar [127,128]. Şimdiye kadar 2000'den fazla insan miRNA türü keşfedilmiştir ve bu miktar giderek artmaktadır [129]. İnsanlarda, endojen miRNA'lar genlerin en az % 30'unu düzenlemektedirler [130] ve dolayısıyla proliferasyon, DNA onarımı, farklılaşma, metabolizma ve apoptozu içeren birçok anahtar rol oynayan hücresel işlemleri koordine ederler [127,128,131]. Her miRNA'nın, belirli hücre tiplerinde benzersiz bir nükleotid dizisine ve ekspresyon paternine sahip olduğu gösterilmiştir [132,133].

2.4.3.1. miRNA biyogenezi

Tüm miRNA'lar başlangıçta nükleusta, miRNA genlerinden RNA polimeraz II veya III aracılığıyla kopyalanırlar. Birincil transkriptler olan primer miRNA'lar (pri-miRNA), 5'cap ve 3'polyA kuyruğu olan, birkaç yüz RNA nükleotidi ve bir veya daha fazla sap-ilmik (stem-loop) yapısı içeren tek sarmallı RNA molekülleridir [134,135]. Pri-miRNA'lar, öncü miRNA (pre-miRNA) oluşturmak için ribonükleaz Drosha ve çift sarmallı RNA bağlayıcı protein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) içeren bir protein kompleksi tarafından tanınır ve işlenir [134]. Yaklaşık uzunluğu 70 nükleotid kadar olan hairpin (şaç tokası) pre-miRNA'lar Ran (ras ile ilgili nükleer protein) - GTP kompleksinden sağlanan enerjiyi kullanarak exportin 5 ile sitoplazmaya aktarılır [136]. Sitoplazmada, pre-miRNA'nın ilmik yapısı ve parçası, RNAaz III

ailesinden bir endonükleaz olan Dicer ve transaktive edici yanıt oluşturan çift zincir RNA bağlanma proteini [transactivating response RNA binding protein (TRBP)] tarafından kesilerek yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda çift sarmallı RNA (dsRNA) molekülü oluşturulur [137]. Son olarak, dsRNA helikaz aracılığıyla iki adet tek sarmallı RNA'ya (ssRNA) dönüştürülür ve sadece bir ssRNA, Argonaute 2'yi (Ago 2) içeren RNA-susturma kompleksine [RNA induced silencing complex (RISC)] entegre olur. [138]. Bu AGO ilişkili "olgun" miRNA dizisi, tamamlayıcı mRNA'lara spesifik olarak bağlanır ve hedef mRNA'ların yıkımına ve translasyonu engellemeye neden olmaktadır (Şekil 2.13) [139,140].

Hücredeki geniş miRNA hedefleri göz önüne alındığında, miRNA'ların birçok fizyolojik ve patolojik süreci düzenlemesi beklenmedik bir durum olarak görülmemektedir [140].



Şekil 2.13. miRNA biyogenezini ve miRNA aracılı hedef mRNA supresyonunu gösteren şematik diyagram [140].

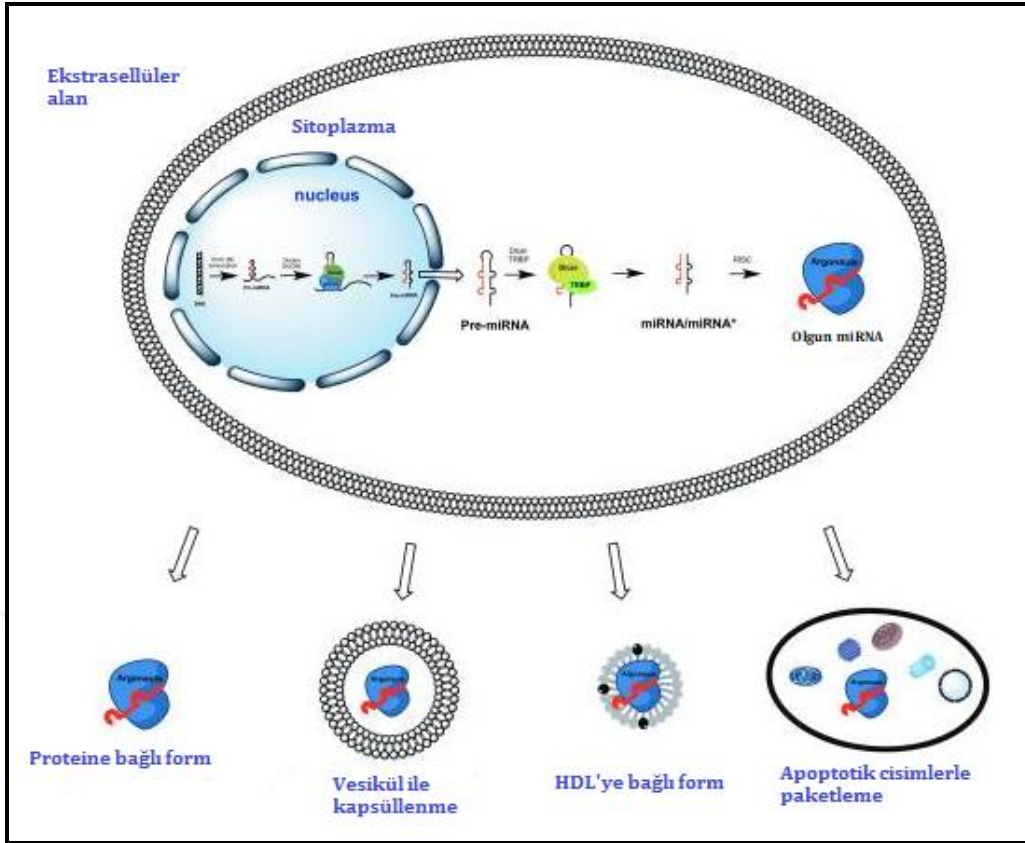
Primer miRNA'lar, RNA polimeraz II veya III tarafından çekirdekte miRNA genlerinden kopyalanır ve ardından pre-miRNA oluşturmak için Drosha ve DGCR8 tarafından işlenir. Daha sonra pre-miRNA'lar, exportin 5 ve RanGTP ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA'lar Dicer tarafından kesilir ve iki ssRNA oluşur. Son olarak, ssRNA'lar AGO-2, Dicer ve TRBP'yi içeren RISC protein kompleksine entegre olurlar. İşlevsel olarak, miRNA-RISC kompleksi translasyonel baskı veya mRNA kırılması yoluyla hedef mRNA ifadesini inhibe eder.

Olgun miRNA'ların kan plazmasında serbest halde bulunduğuna dair çalışmalar, 2008 yılında birçok bağımsız araştırma grubu tarafından yapılmıştır [23,141,142]. Daha sonraki yıllarda diğer tüm biyolojik sıvılarda ekstrasellüler miRNA varlığı teyit edilmiştir [139]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, kan plazması, idrar, gözyaşı, anne sütü, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı, tükürük ve sperm dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılarda önemli miktarda miRNA tespit edilmiştir [143]. Ekstrasellüler dolaşımdaki miRNA'ların pH, kaynama, çoklu

dondurma çözdürme işlemleri ve uzun depolama süreçleri gibi yüksek değişkenlikler içeren olumsuz fizyolojik koşullarda dahi oldukça kararlı oldukları gösterilmiştir. miRNA'ların aksine, mRNA, rRNA ve tRNA gibi RNA türleri nükleaz açısından zengin ekstraselüler dolaşımda kısa süre içerisinde degrade olmaktadır [141,144]. Ekstraselüler miRNA'nın nükleaz direncinden sorumlu olan mekanizması uzun süre anlaşılamıştır. Daha sonraki yıllarda, ekzozomlardaki miRNA'ların varlığının bulunması [145] ve ekstraselüler miRNA'nın membran veziküller ile paketlenerek korunması teorisi Hunter ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır [146].

Bununla birlikte, 2011 yılında, iki bağımsız araştırma grubu tarafından, sadece membran vezikülleri ile paketlenmiş miRNA'ların biyolojik sıvılarda bulunduğu varsayımından farklı olan bir teori ortaya atılmıştır. Ekstraselüler miRNA'nın % 90-99'unun mikroveziküllerden bağımsız ve kan plazması ya da serumu ve hücre kültürü ortamında AGO ailesinin proteinleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Proteaz açısından zengin ortamdaki AGO2 proteini stabilitesi, biyolojik sıvılardaki nükleazlara karşı miRNA'ların direncini net bir şekilde açıklamaktadır [144]. Şimdiye kadar dört insan AGO proteini (AGO1, AGO2, AGO3 ve AGO4) tanımlanmıştır; hepsi ribozomlardaki mRNA'nın translasyon baskılamasına ve P-cisimlerdeki mRNA bozunmasına aracılık edebilir. Bununla birlikte, sadece AGO2, sitoplazmadaki mRNA'yı doğrudan parçalayabilmektedir. miRNA taşıyan AGO, AGO proteininin C-terminal alanından GW182'ye bağlanarak RISC oluşturur. Önemli bir husus, sitoplazmik AGO2'nin sadece % 1'i P-cisimlerinde bulunurken, çoğunluk sitoplazmada diffüz olarak dağılmıştır [139].

Günümüze kadar olan veriler, ekstraselüler miRNA'ların RNAaz degradasyonundan korunabilmesinin yolları olarak; apoptotik cisimler ile paketlenme, veziküller ve ekzozom ile atılma; veya yalnızca AGO proteinleri ile kompleks oluşturma olduğunu göstermektedir [143,147]. Ayrıca bazı miRNA türleri, insan plazmasından yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) saflaştırılmış fraksiyonlarında da bulunmuştur [148], ancak analiz edilen HDL-miRNA'ların dolaşımdaki toplam miRNA'ların yalnızca çok küçük bir kısmını oluşturduğu bildirilmiştir (Şekil 2.14) [139,149]. Son olarak, sentetik miRNA'ların, in vitro koşullarda saflaştırılmış nükleofosmin 1 (NPM1) proteini ile karıştırıldığında RNAaz ile parçalanmadan korunabildiği gösterilmiştir [150]. Ancak in vivo olarak ne hücre içi ne de hücre dışı miRNA ile NPM1 ilişkisi bulunmamıştır [144,150].

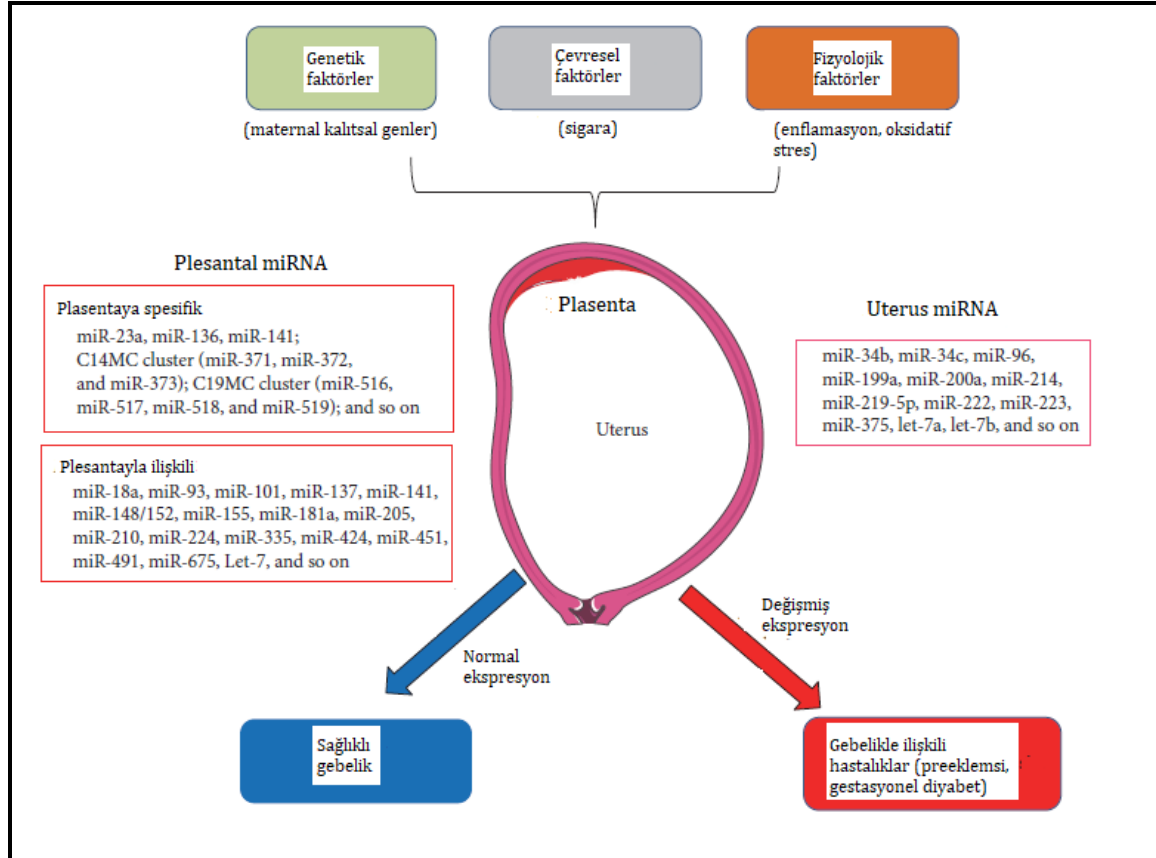


Şekil 2.14. Ekstraselüler miRNA'nın, sadece AGO proteinine bağlı olabileceği gibi apoptotik cisim, mikro vesiküller ve HDL parçacıkları içine kapsüllemesi [139].

2.4.3.2. Gebelik ve miRNA

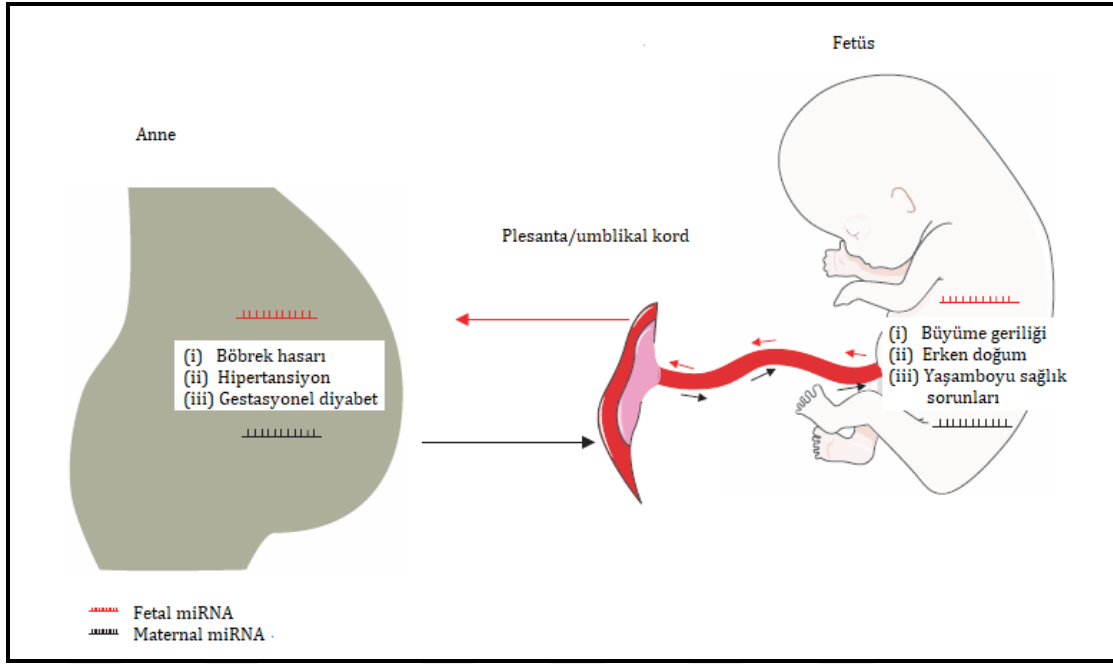
Gebelikte en önemli organlar plasenta ve uterusdur. Özellikle plasenta, gelişmekte olan fetusa gereken besin alımı ve gaz alışverişini sağlamakla birlikte, sıcaklığı düzenleme, hormon üretimi ve gebelik sırasında internal enfeksiyonlardan korunmayı da sağlamaktadır. Ayrıca gebelikte ilgili birçok hastalıkla ilişkili olması bu süreçteki önemini artırmaktadır. Plasenta trofoblastlar, desidual hücreler, endotel hücreleri ve mezenkimal hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerin, trofoblast proliferasyonu, diferansiyasyon ve invazyon gibi hücresel aktivitelerinin yanı sıra mezenkimal hücre farklılaşması, desidualizasyonu ve anjiyogenezi sağlıklı bir gebelik süreci için en önemli etkenlerdir [151]. Ayrıca gebelik, genetik (örneğin maternal kalıtsal genler), çevresel (beslenme gibi) ve fizyolojik (inflamasyon, hipoksi) faktörler tarafından düzenlenerek değişim gösteren fizyolojik bir durumdur [140]. Yapılan birçok çalışma, bu değişikliklere yanıt olarak miRNA ekspresyonunun değiştiğini ileri sürmektedir [152,153]. Aynı zamanda, miRNA'ların gebelik sırasında değişen fizyolojik koşullara tepki verdikleri ve gebelik sürecinin sorunsuz geçirilmesine katkı sağladıkları bildirilmiştir. Buna karşılık miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimin gebelikte oluşabilecek hastalıklara neden olabileceği veya katkıda da bulunabileceği bildirilmektedir (Şekil 2.15) [140]. Bununla birlikte gebeliğin

düzenlenmesinde de önemli oldukları gösterilmiştir. Post-transkripsiyonel düzeyde protein kodlayan genlerin translasyonunu baskılayarak hücrel gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'lar, hücre gelişimi, çoğalması, iletişim ve doku farklılaşmasında da kritik öneme sahiptir [154]. Plasental gelişim, farklılaşma, göç, invazyon, angiogenezis, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok kritik sürece sahiptir [155]. miRNA'ların plasenta gelişimini düzenlediği ve bu süreçler boyunca işlev gördüğü gösterilmiştir [156].



Şekil 2.15. Plasenta ve uterustaki miRNA'ların, gebelik sürecinde genetik, çevresel ve fizyolojik faktörlerin etkilerine göre ekspresyon değişimleri [151].

MikroRNA'lar plasental sinsiyotrofoblastlardan maternal dolaşıma eksozomal partiküller vasıtasıyla salınırlar (Şekil 2.16) [140]. Plasental gelişimdeki miRNA'ların rolünden dolayı, maternal dolaşımdaki plasental miRNA'ların anormal ekspresyonunun, preeklampsi, [157] abortus [158], gestasyonel diyabet [159] gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.



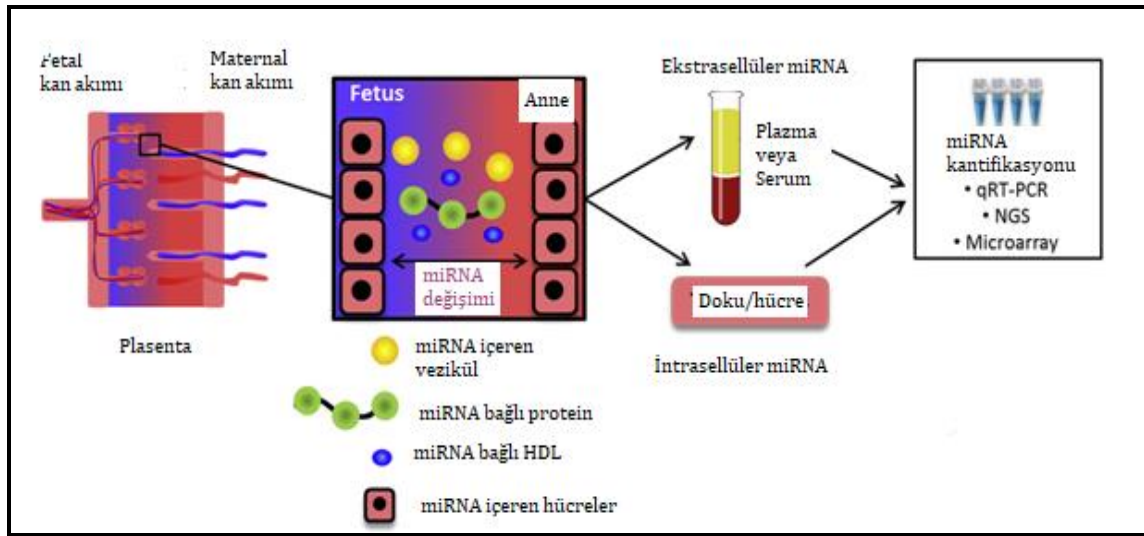
Şekil 2.16. Gebelikte fetus ile anne arasındaki miRNA'ların karşılıklı iletişimi ve gebelikte ilişkili maternal ve fetal bozukluklarla bağlantısı [140].

2.4.3.3. Non-invaziv prenatal taramada miRNA'ların kullanımı

Konjenital prenatal tanı yöntemlerinden olan CVS ve amniyosentez hem invaziv hem de riskli olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, invaziv olmayan yaklaşımlar geliştirmek son yıllarda giderek daha önem kazanmaya başlamıştır. Bu konudaki ilk yaklaşım maternal dolaşımdaki fetal hücreleri izole etmek ve analizdir. Ancak dolaşımdaki fetal hücrelerin nadir olması bu konudaki en büyük sorunu oluşturmaktadır [160]. Alternatif bir yaklaşım ise, fetal dolaşımdaki serbest nükleik asitlerin saptanmasıdır [161]. Fetal DNA, RNA'dan daha kararlı ve genotiplendirme yapmaya olanak sağlarken, RNA'nın avantajı, DNA'nın düşük kopya sayısına sahip olması olarak gösterilmektedir [162].

MikroRNA'lar, hamilelik veya fetus gelişimiyle ilişkili klinik koşulların erken tespitine potansiyel olarak yardımcı olabilirler. Yakın zamanlı yapılan çalışmada, plasenta trofoblastlarından eksprese olan miRNA'ların, genomun normal plasental ve embriyonik gelişimi için etkili bölgesi olan kromozom 19'da yaklaşık 100 kb miRNA gen kümesindeki miRNA'lar olduğu ortaya koyulmuştur [163]. Ayrıca, plasenta kökenli miRNA'lar maternal plazmada saptanmış ve bazı miRNA ekspresyon düzeylerinin, gebeliğin çeşitli aşamalarında arttığı, postnatal dönemde azaldığı gösterilmiştir [23,164]. Bununla birlikte, miR-141 gibi bazı miRNA'ların, plasental olarak eksprese edilen bir mRNA olan CSH1 ile karşılaştırıldığında daha stabil olduğu tespit edilmiştir. Bir trofoblast hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen in situ hibridizasyon çalışmasında, miR-517b'nin ekzozom aracılı salındığı kanıtlanmış olup, plasental

miRNA'ların maternal plazmaya geçişi gösterilmiştir. Bu nedenle, miRNA'ların gebelikle ilişkili fizyolojik süreçlerin izlenmesinde kullanılabileceği bildirilmektedir [22]. Ayrıca, miRNA ekspresyonundaki değişikliklerin, nöral tüp defekti veya etanol maruziyeti ile ilişkili teratojenik etkiler de dahil olmak üzere birçok doğuştan defekt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [165]. Bu veriler, konjenital anomali tespitinde, miRNA ekspresyon düzeylerinin doğru analizinin, geleneksel invaziv örnekleme yöntemlerinin bir parçası olarak kullanılabilir olmasının yanı sıra, maternal plazmadaki fetal miRNA'ların da noninvaziv bir yöntem olarak kullanılabileceğini de düşündürmektedir (Şekil 2.17)[165,166].



Şekil 2.17. Ekstrasellüler ve intrasellüler miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması [166].

Plasentanın gelişiminin kritik basamaklarındaki miRNA'nın rolü ve bu genetik materyalin maternal dolaşımında stabil bir şekilde bulunması, maternal ve fetusda gelişen çeşitli durumlarda spesifik ekspresyon düzeylerinin bulunması ve daha da önemlisi, bu miRNA'ların gebelik sırasında maternal plazmada saptanabilir, ancak postnatal dönemde plazmada saptanamaz olması, bu düzenleyici faktörlerin NIPT'de potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir [156]. Bütün bu verilerin ışığında, bu çalışmada konjenital anomali prenatal tanısında noninvaziv bir belirteç olarak miRNA profilinin belirlenmesi amaçlandı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

1. Mikro santrifüj (Hettich Mikro 200, Almanya)
2. Masaüstü tipi santrifüj (Nüve NF 800, Türkiye)
3. Otomatik ayarlanabilir pipet seti (Eppendorf -P20-P100-P200-P1000, Almanya)
4. -20 °C Derin dondurucu (Uğur Derin Dondurucu, Türkiye)
5. -80 °C Derin dondurucu (Elcold, Danimarka)
6. +4 °C Soğutucu (Bosch, Almanya)
7. 8 Kanallı mikropipet (Viaflo Voyager, Integra Biosciences, New Hampshire, USA)
8. Vorteks (HEIDOLPH, Almanya)
9. NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific)
10. Termal cycler (Genepro, TC-E-3846, Çin)
11. Plate karıştırıcı (JMC R&D, Kore)
12. Plate santrifuj (Ecomate, JCW48, Çin)
13. IFC controller (Fluidigm, USA)
14. Yüksek kapasiteli real time PCR (Biomark BMK-PKG-MH Fluidigm, USA)

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. 15 ml'lik polipropilen konikal tüp (Falkon-Sterile, Meksika)
2. 3 ml'lik %7,5 EDTA'lı tüp (BD, Vacutainer, İngiltere)
3. 2 mL DNA-RNAsız mikrosantrifüj tüp (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
4. Filtreli pipet ucu (Eppendorf- DNase, Rnase and Pyrogen free, Almanya)
5. Pipet ucu (12,5 µl, 125 µl, Voyager II- Integra Biosciences)
6. Isopropanol (% 100)
7. Ethanol (% 80)
8. 0,2 mL Thermo-Strip (8'li strip tüp, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
9. 96 well PCR plate (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
10. 96 well piko PCR plate (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
11. PCR plate film (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
12. 96.96 Dynamic Array (Fluidigm, Katalog no. BMK-M-96.96)

3.1.3. Kullanılan Kitler

1. miRNeasy Serum/Plazma Advanced Kit (QIAGEN, Katalog no./ID: 217204)
2. miScript II RT Kit (Qiagen, Katalog no.218161)
3. miScript Microfluidics PreAMP Kit (Qiagen, Katalog no.331455)
4. miScript Microfluidics PCR Kit (Qiagen, Katalog no.331431)
5. Assay Loading Reagent (Fluidigm, Katalog no.85000736)
6. DNA Binding Dye (Fluidigm, Katalog no.100-3738)

3.2. Çalışma Grubu

Bu çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran 25- 50 yaş arası ve ek medikal problemi olmayan 43 tekil gebelik taşıyan anne adayları dahil edildi ve gruplar şu şekilde oluşturuldu;

-Hasta grubu: Fizik muayene, ikili, üçlü test sonuçlarına göre konjenital anomalili fetus taşıma olasılığı olan ve ikili, üçlü test sonuçlarına göre amniyosentez endikasyonu saptanan ve amniyosentez sonucuna göre de konjenital anomalili fetus taşıdığı saptanan 14 gebe hasta grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

- Kontrol-1 grubu: Fizik muayene, ikili, üçlü test sonuçlarına göre konjenital anomalili fetus taşıma olasılığı olan ve ikili, üçlü test sonuçlarına göre amniyosentez endikasyonu saptanan ancak amniyosentez sonucuna göre konjenital anomalili fetus taşımadığı saptanmış 16 gebe kontrol-1 grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

- Kontrol-2 grubu: Tarama test sonuçlarına göre konjenital anomalili fetus taşıma olasılığı olmayan ancak ileri maternal yaş, down öyküsü gibi nedenlerden dolayı özellikle aile isteği üzerine amniyosentez yapılan ve amniyosentez sonucuna göre konjenital anomalili fetus taşımadığı saptanmış 13 gebe, kontrol-2 grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Bu çalışma, 14.01.2016 tarihli ve 2016/17 nolu Kurul Kararı ile Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup, çalışmaya katılan tüm gebelerden yazılı onam formu alınmıştır.

3.3. Örneklerin Alımı ve Saklanması

Bu çalışmada Tablo 3.1'de gösterilen 49 miRNA'nın analizi gerçekleştirildi. miRNA analizi için, çalışmaya katılan 43 gebeden 5 ml EDTA'lı tüpe venöz kan ve amniyotik sıvı örneği alındı. Kan örnekleri sadece 3-5 kez alt-üst edilerek, bekletilmeden 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen plazma dikkatli bir şekilde steril bir mikrosantrifüj tüpüne

alındı. Ayrılan plazma örneği tekrar 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve üst kısımdan alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine alıktlandı. Elde edilen plazma örnekleri miRNA izolasyonu için, çalışma gününe kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Tablo 3.1. Analizi gerçekleştirilen miRNA listesi.

hsa-miR-155-5p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-1301-3p
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-92a-2-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-16-5p
hsa-miR-629-5p	hsa-miR-1298-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-320b	hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-23c	hsa-let-7c-5p	hsa-miR-98-5p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-210-3p
hsa-miR-19b-2-5p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-513a-3p	hsa-miR-141-3p	hsa-let-7f-2-3p
hsa-miR-320c	hsa-miR-124-5p	hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-504-5p
hsa-miR-199b-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-92b-5p	hsa-miR-1233-3p
hsa-miR-802	hsa-miR-374b-3p	hsa-miR-4732-5p	hsa-miR-498	hsa-miR-374a
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-891b	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-3156-5p
hsa-miR-362-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-133b	hsa-miR-135b-5p	

Toplanan maternal plazma örneklerine ek olarak aynı gün alınan amniyotik sıvı örnekleri, literatürlerde uygun bir yöntem bulunamamasından dolayı, örnek toplanmaya başlanmasından itibaren farklı koşullarda saklandı. Yapılan literatür taramaları sonucu diğer biyolojik sıvıların saklama koşulları göz önüne alınarak, her bir amniyotik sıvı örneği için üç saklama koşulu belirlendi.

Birinci saklama koşulu; oda sıcaklığında 2 saatten daha uzun bekletilmeden, 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan süpernatantın tekrar 2000 g'de 10 dk santrifüj edilmesi ve temiz bir falcon tüpüne ayrılarak -80°C'lik derin dondurucuda saklanması,

İkinci saklama koşulu; oda sıcaklığında 2 saatten daha uzun bekletilmeden herhangi bir işlem uygulanmaksızın -80°C'lik derin dondurucuda saklanması,

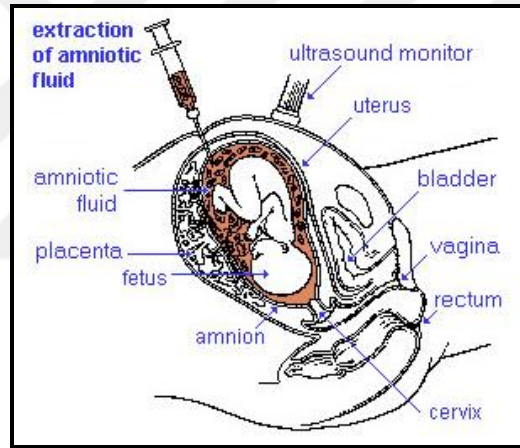
Üçüncü saklama koşulu; 2 saatten daha uzun bekletilmeden, 2000g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan süpernatantın üzerine 1:1 oranında RNAlater solüsyonu eklenerek -80°C'lik derin dondurucuda saklanması şeklinde üç yöntem belirlendi.

Örnek saklama koşullarının ve hangi yöntemin daha iyi sonuç verdiğinin belirlenmesi için seçilen 15 hastaya ait üç ayrı yöntemle saklanan toplam 45 örnek kullanılarak ön çalışma yapıldı. Bu örneklerdeki miRNA ekspresyon sonuçları değerlendirildi ve örneklerin saklama koşulu olarak, oda sıcaklığında 2 saatten daha uzun bekletilmeden, 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan süpernatantın tekrar 2000 g'de 10 dk santrifüj edilmesi ve temiz bir falcon tüpüne ayrılarak, çalışma gününe kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklanması olduğuna karar verildi ve çalışmada bu amniyotik sıvı örneklerinin analizi gerçekleştirildi.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Amniyosentez

Amniyosentez işlemi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran veya takibi yapılan gebelerden tarama testi riskli olan, ultrasonografi bulgusu bulunan, daha önceki gebeliklerinde Down sendromu öyküsü olan ya da ileri maternal yaşa sahip anne adaylarının kendi isteği doğrultusunda uzman hekimler tarafından gerçekleştirilmiştir. Amniyosentez, 16 ile 20. gebelik haftaları arasında uygulanmış olup, işlem sırasında gebelerden ultrasonografi eşliğinde transabdominal yol ile uterusu girilerek, 15-20 ml amniyon sıvısı alınmıştır. Alınan amniyotik sıvı örneği prenatal sitogenetik tanı amacıyla Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarına gönderilmiştir.



Şekil.3.1.Amniyosentez [44]

3.4.2. Sitogenetik Analiz

3.4.2.1. İn situ Kültür ve Harvest Yöntemi:

Her bir örnek için 4 adet in situ kültür ve bir adet yedek flask kültürü kurulmuş ve in situ kültür ve harvest yöntemi şu şekilde uygulanmıştır;

1. Asit-alkol ile temizlenen ve sterilize edilen 24x24 lameller 35 mm çapında steril petri (Greiner) içine konularak in situ kültür için hazırlanmıştır.
2. 15-20 ml amniyon sıvısından santrifügasyon sonrası elde edilen hücreler 5 ml BIO-AMF (BiologicalInd.) içinde süspanse edilerek petri içindeki her bir lamel üzerine 0.5 ml yayılmış ve bir gece bekletildikten sonra tüm petrilere 1.5 ml ortam eklenmiştir.

3. Beş ile 7 gün arasında süren ilk hücre yapışma periyodu sonrasında tüm kültürler gün aşırı 1/4, 1/2 veya 1/1 oranında beslenmiştir.
4. Yeterli koloni sayısı, koloni büyüklüğü ve mitotik indeks sağlanan kültürlerle over-night düşük konsantrasyonlu Kolçisin (Biological Ind.) uygulanmıştır.
5. Lameller petrilerden çıkarılmadan 20 dk sodyum sitratlı (Merck) hipotonik, pre-fiksasyon (Karnoy fiksatifi), fiksasyon (x3) ve hava ile patlatma aşamalarından oluşan in situ harvest yöntemi ile bantlamaya hazırlanmıştır.
6. GTG bantlama yöntemi ile lameller petriden çıkarılarak bantlanmıştır.

3.4.2.2. Karyotipik analiz

Tüm örneklerin karyotipik analizleri CytoVision 3.93 (Applied Imagine) görüntü analiz paket programı ile yapılmıştır. Analiz, her bir lameldeki ortalama 5-10 koloni olmak üzere her bir örneğe ait toplam 4 lamel üzerindeki 20-60 kolonideki metafaz alanları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm karyotip analizlerinde koloni düzeyinde değerlendirilme yapılmıştır. Mozaik olgularda ve analiz edilen hücre sayısının arttırılması gereken olgularda yedek flask kültüründen lamele pasajlama yöntemi ile elde edilen metafaz alanları karyotipik analize alınmıştır.

3.4.3. miRNA Ekspresyon Analizi

3.4.3.1. miRNA izolasyonu

mikroRNA izolasyonu aşamasında miRNeasy Serum/Plazma Advanced (QIAGEN, Katalog no:217204) kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol uygulandı. Deneyin tüm adımları oda ısısında gerçekleştirildi ve tamponların da kullanılmadan önce oda ısısında olmasına dikkat edildi.

İçerik:

- RNeasy UCP MinElute spin kolonları
- Collection tüpleri (1.5 ml)
- Collection tüpleri (2.0 ml)
- Tampon RPL
- Tampon RPP
- Tampon RWT
- Tampon RPE
- RNase içermeyen su

RWT ve RPE tamponlarına kullanımdan önce, şişe üzerinde yazan hacimde % 96-100 ethanol eklendi.

Prensip:

Ekstraselüler veziküllerde bulunan RNA da dahil olmak üzere plazma RNA içeriğinin tamamının eldesinde etkili bir şekilde lizizi sağlamak için öncelikle örnek ile Tampon RPL karıştırılmaktadır. Kit, plazma proteinleri gibi kirleticileri çökerten Tampon RPP'yi içermektedir ve santrifüj yardımıyla proteinler çökertilmektedir. RNA moleküllerinin (> 18 nükleotid) silis membrana bağlanması için uygun koşulları sağlamak amaçlı süpernatanta izopropanol eklenmektedir. Kitte, spin-kolon teknolojisine dayanan bir protokol uygulanmaktadır, bundan dolayı örnek daha sonra RNeasy UCP MinElute spin sütununa uygulanmaktadır; burada RNA, membrana bağlanır ve diğer kirleticiler yıkama tamponu olan Tampon RPE yardımı ile uzaklaştırılmaktadır. Son adımda, toplam RNA (> 18 nükleotid), RNaz içermeyen su kullanılarak elüe edilmektedir.

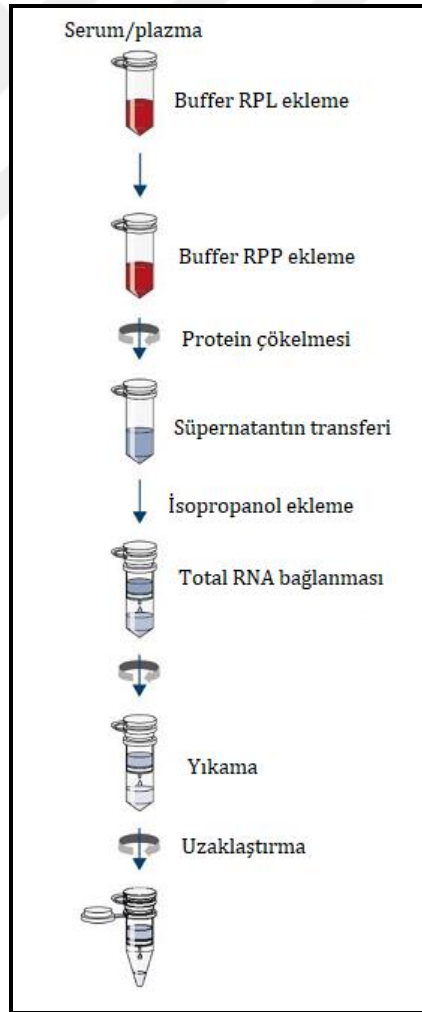
Cel_miR_39 spike in kontrol kullanımından önce aşağıdaki sulandırma protokolü izlendi;

1. Tüpe 300 µl RNase içermeyen su eklendi. (2×10^{10} kopya/stok)
2. Sulandırılan bu tüp porsiyonlanarak -80°C 'de saklandı.
3. 4 µl stok spike in kontrol üzerine 16 µl RNase içermeyen su eklendi. (4×10^9 kopya/µl)
4. 2 µl 4×10^9 kopya/µl spike in kontrol üzerine 48 µl RNase içermeyen su eklendi. (1.6×10^8 kopya/µl)

Protokol:

1. Plazma ve amniyotik sıvı örnekleri çözdürüldü.
2. Temiz bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µl örnek eklendi.
3. Örnek üzerine 60 µl tampon RPL eklendi ve >5 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
4. Tüpe 3.5 µl Spike-in kontrol (sulandırılan Ce_miR_39) eklendi ve vorteks ile iyice karışması sağlandı.
5. Tüpe 20 µl tampon RPP eklendi ve >20 saniye vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
6. Bekleme aşamasının bitiminde 12.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek pelletin çökmesi sağlandı.
7. Berrak ve renksiz görünümde olması gereken süpernatantdan yaklaşık 230 µl yeni bir tüpe alındı ve üzerine 1/1 hacimde izopropanol eklenerek vorteks ile iyice karıştırıldı.
8. Kolonlara, tüpün tüm içeriği aktarıldı ve ≥ 8.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi ve tüpteki süzüntü atıldı.

9. Kolona 700 µl tampon RWT eklendi ve ≥ 8.000 g'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra tüpteki süzöntü atıldı.
10. Kolona 500 µl tampon RPE eklenerek ≥ 8.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi ve tüpteki süzöntü atıldı.
11. Kolona 500 µl % 80'lik etil alkol eklendikten sonra ≥ 8.000 g'de (≥ 10.000 rpm) 2 dakika santrifüj edildi. Kolonu tüpten alırken süzöntü ile temas etmemesine dikkat edilerek tüpteki süzöntü atıldı.
12. Kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı ve tüp ağzı açık şekilde 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Böylece etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.
13. Kolon yeni bir 1.5 ml'lik tüp içerisine alındı ve membranın tam ortasına gelecek şekilde 20 µl RNase free sudan pipetlendikten sonra, tüpün kapağı açık halde 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
14. Bekleme süresi bitiminde, tüp maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilerek RNA'nın membrandan süzülmesi sağlandı.



Şekil 3.2. miRNA izolasyon kiti protokolü [167].

3.4.3.2. cDNA Reaksiyonunun Hazırlanması

cDNA eldesinde miScript II RT Kit (Qiagen, Katalog No.218161) kullanıldı. Bu aşamada uygulanan protokol;

1. Ölü hacimler dahil edilerek aşağıdaki karışım 90 örnek + 2 pozitif kontrol için hazırlandı.

5x miScript Hispec buffer	168	µl
10x miScript Nucleics mix	84	µl
DNase-RNase free su	84	µl
miScript Rev. Transcriptase mix	84	µl
TOPLAM		420 µl

2. Karışımdan 8'li strip tüpe her bir kuyuya 51 µl olacak şekilde dağıtıldı. Temiz bir piko plate kullanılarak izole edilen RNA örnekleri 3.5 µl olacak şekilde kuyulara pipetlendi. Örnek dağıtılan kuyular kontrol edildikten sonra 8'li strip tüpe dağıtılan cDNA karışımından 8 kanallı pipet yardımıyla 3.5 µl alınarak dağıtımı yapıldı. Mix dağıtılan kuyular kontrol edildi.
3. Piko plate, plate karıştırıcı da 2000 rpm'de 3 dk. karıştırıldıktan sonra vorteks üzerinde 2 sn karıştırıldı, 4-5 sn. beklenip bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 sn santrifüj edildi ve aşağıdaki termal programa alındı.

37 °C 60 dk
95 °C 5 dk
4 °C ω

4. Termal program sonunda plate, plate karıştırıcıda 60 saniye santrifüj edildi.
5. cDNA örnekleri 1/5 oranında sulandırması yapılarak bir sonraki işleme hazırlandı.

3.4.3.3. Preamplifikasyon Reaksiyonunun Hazırlanması:

Preamplifikasyon aşamasında miScript Microfluidics PreAMP Kit (Qiagen, katalog No:331455) kullanıldı. Uygulanan protokol aşağıdaki gibidir;

1. Primerler aşağıdaki gibi sulandırılarak 100 µM konsantrasyona getirilmesi sağlandı:
 - Primer tüpü 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
 - Tüpe 27.5 µl nuclease free su pipetlendi.
 - Tüp kısa aralıklarla bir süre vortekslenildi ve spin down yapıldı.

2. PreAmp Primer Pool hazırlanması:

Bu çalışmada 49 miRNA ve kontrol olarak Ctrl_miRTC ve Cel-miR-39 olmak üzere toplamda 51 primer ile çalışıldı.

- Her primerden bir tüpten 1 µl alınır ve böylece toplam hacim 51 µl olur.
- Primerlerin 500 kat sulandırılması gerektiğinden 51 µl stok primer olan tüpe 449 µl nuclease free su eklendi ve bu durumda toplam hacim 500 µl'ye tamamlandı.
- Tüp vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra preamp primer pool, preamp mixe eklenmeye hazır hale getirildi.

3. Aşağıdaki karışım 90 örnek + 2 pozitif kontrol ve ölü hacimlerde hesaplanarak hazırlandı:

5x miScript Preamp buffer	230 µl
Hot start taq DNA poly. (5U/µl)	92 µl
Preamp primer pool	230 µl
DNase-RNase free su	322 µl
miScript Preamp Univ. Primer	46 µl
TOPLAM	920 µl

4. Karışım 8'li strip tüpün her kuyusunda 113 µl olacak şekilde dağıtıldı.
5. Temiz bir piko plate alındı ve daha önce sulandırılmış olan cDNA örneklerinden 2'şer µl pipetlendi ve örnek dağıtılan kuyular kontrol edildi.
6. cDNA'lar üzerine hazırlanıp 8'li strip tüplere dağıtılan preamp karışımından 8'er µl pipetlendi ve mix dağıtılan kuyular tekrar kontrol edildi.
7. Piko plate, plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dk. karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 saniye tutulup, 4-5 saniye beklenildikten sonra bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 saniye santrifüj edilip aşağıdaki termal programa alındı:

95 °C 15 dk
94 °C 30 sn }
60 °C 3 dk } 12 döngü
4 °C ω

8. Termal program sonunda plate, plate karıştırıcıda 60 saniye santrifüj edildi.
9. Preamp örneklerinin 65 µl SR1 + 97.5 µl DNA suspension buffer pipetaj yapılarak karıştırılıp hazırlanan exonuclease karışımı 1 µl olarak pipetlendi.

10. Piko plate, plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dk. karıştırıldı. 2 saniye vorteks üzerinde tutuldu ve 4-5 saniye beklenip bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 saniye santrifüj edildi ve aşağıdaki termal programa alındı:

37 °C 15 dk

95 °C 5 dk

4 °C ω

11. Termal program sonunda plate, plate karıştırıcıda 60 saniye santrifüj edildikten sonra preamp örnekleri 1/5 oranında sulandırıldı.

3.4.3.4. RT-PCR Mix ve Primer Hazırlanması

Bu aşamada miScript Microfluidics PCR Kit (Qiagen, Katalog No: 331431) kullanıldı ve aşağıdaki protokol izlendi:

1. 100 µM konsantrasyondaki primerler, aşağıdaki gibi hazırlanarak Biomark'a yüklemeye hazır hale getirildi.

100 µM primer	1 µl
Nuclease free su	1.5 µl
Microfluidic universal primer	2.5 µl
2x Assay Loading Reagent	5 µl
TOPLAM	10 µl

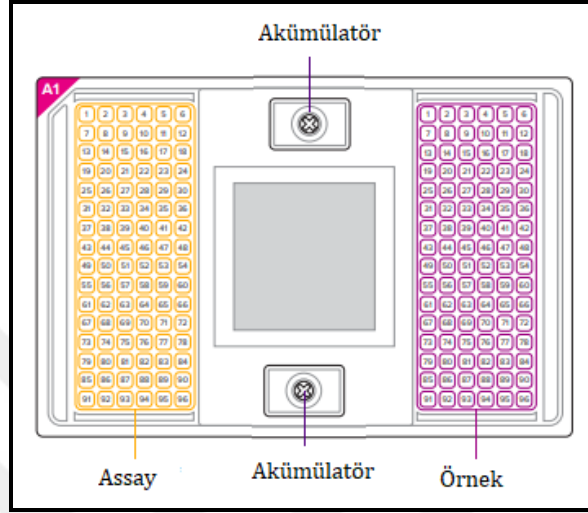
2. RT-PCR karışımı aşağıdaki gibi 24 örnek + 2 pozitif kontrol için hazırlandı (ölü hacimler hesaplanarak dahil edildi):

qPCR Master Mix	360 µl
20X DNA Binding Dye	36 µl
Nuclease free su	84 µl
TOPLAM	480 µl

3. Karışım 8'li strip tüpe 58'er µl olacak şekilde dağıtıldı.
4. Temiz bir piko plate alınarak, daha önce dilüye edilmiş preamplifiye örneklerinden 2'şer µl pipetlendi ve kuyular kontrol edildi.
5. Örnekler üzerine 4 µl hazırlanan ve 8'li strip tüpe alınan PCR karışımı dağıtılıp, karışımın dağıtıldığı kuyular kontrol edildi.

6. Piko plate, plate karıştırıcı da 2000 rpm'de 3 dk. karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 saniye daha karıştırılıp, 4-5 saniye beklendikten sonra bir kez daha vorteks uygulandı. Plate santrifüjünde 60 saniye santrifüj edildi.

3.4.3.5. Dynamic Array Hazırlanması



Şekil 3.3. Dynamic array 96.96 görüntüsü [168]

1. Dynamic Array'in PRIME Edilmesi:

Enjektör içinde gelen kontrol sıvıları, Dynamic Array'de "akümülatör" adı verilen küçük hücrelere enjekte edildi ve Dynamic Array IFC Controller'da PRIME edildi.

2. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması:

Hazırlanan primerler Dynamic Array'de "assay" kısmındaki kuyulara ve PCR karışımı "sample" kısmındaki kuyulara 4.75 µl olarak pipetlendi.

3. IFC Controller'da Dynamic Array'in Yüklmesi:

Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirildikten sonra "LOAD" seçilerek yükleme başlatıldı. Bu işlemi devam ederken BioMark Data Collection yazılımı başlatıldı ve BioMark'ın lambasının ısınması süresi 20 dakika olduğundan, "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak lambası çalıştırıldı.

4. Dynamic Array'in BioMark'da Çalışması:

Dynamic Array'in yükleme işi tamamlandıktan sonra IFC Controller'dan alındı ve Dynamic Array altındaki mavi filmin çıkarılıp, Chip yüzeyinin temizliği kontrol edilerek, Dynamic Array üzerindeki barcode kısmı dış tarafa bakacak şekilde BioMark'a yerleştirildi.

BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırıldı ve aşağıdaki termal programa alındı:

Biomark Termal Protokol:

50 °C 120 sn.	}	Thermal mix
70 °C 1800 sn.		
25 °C 600 sn.		
95 °C 600 sn.	}	Hot Start
94 °C 15 sn.	}	30 döngü
55 °C 30 sn.		
70 °C 30 sn.		
60-95 °C	}	Melting Curve

3.5. İstatistiksel Analiz

Analiz yönteminde; elde edilen RT-PCR sonuçlarının (Ct değerlerinin) analizleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile hesaplanmış, bu değerler hesaplandıktan sonra gruplar arası karşılaştırmaları yapmak için Basic student t test yöntemi kullanılmıştır. İstatistiksel analizde, qiagen veri analiz sitesinden (<http://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) faydalanılmış olup, global Ct mean normalization ile analiz gerçekleştirilmiştir.

Amniyon sıvısı ve plazmadan elde edilen Ct değerleri arasındaki ilişkinin saptanması amacıyla Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Analizler Statistica v.13.3 programı ile yapılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Gebelerin Tanımlayıcı Bilgilerine Ait Bulgular

Çalışma grubunu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran 43 tekil gebelik taşıyan anne adayları oluşturmuştur. Dahil edilme kriterlerine uygun bu gebelerin yaş ve gebelik haftalarına ait bulgular Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen gebelere ait yaş ve gebelik haftalarına ait bulgular

	n	Minimum	Maximum	Ortalama	Std. sapma
Yaş	43	19,0	43,0	34,442	5,0535
Gebelik haftası	43	14,0	21,0	17,256	1,4325

Tarama testlerine ve USG bulgularına göre amniyosentez endikasyonu gösteren ve kromozom analizi sonucunda konjenital anomalili fetus taşıyan 14 gebe (10 Down sendromu, 2 Klinefelter sendromu, 1 Turner sendromu, 1 Trizomi 18) hasta grubu olarak, tarama testlerine ve USG bulgularına göre amniyosentez endikasyonu olan fakat konjenital anomalili fetus taşımayan 16 gebe Kontrol-1 grubu olarak ve riskli tarama testi olmamasına rağmen ileri maternal yaş, down öyküsü gibi nedenlerden dolayı amniyosentez yapılan ve konjenital anomalili fetus taşımadığı saptanan 13 gebe Kontrol-2 grubu olarak belirlendi. Tarama testlerinin gruplara göre dağılımı Tablo 4.2'de ve amniyosentez istem nedenlerinin gruplara göre dağılımı Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Hasta, Kontrol-1 ve Kontrol-2 gruplarına ait tarama testi dağılımları

		Hasta (n=14) n (%)	Kontrol-1 (n=16) n (%)	Kontrol-2 (n=13) n (%)
Tarama testi	İkili	5 (%35,7)	10 (%62,5)	13 (%100)
	Üçlü	---	2 (%12,5)	----
	Dörtlü	1 (%7,1)	4 (%25,0)	----
	Harmony	1 (%7,1)	----	----
	YOK	7 (%50,0)	----	----

n, birey sayısı.

Tablo 4.3. Hasta, Kontrol-1 ve Kontrol-2 gruplarına ait amniyosentez istem nedenlerinin dağılımları

		Hasta (n=14) n (%)	Kontrol-1 (n=16) n (%)	Kontrol-2 (n=13) n (%)
Amniyosentez istem nedeni	Riskli ikili	3 (%21,4)	10 (%62,5)	---
	Riskli üçlü	---	2 (%12,5)	---
	Riskli dördü	1 (%7,1)	4 (%25,0)	---
	Harmony	1 (%7,1)	---	---
	USG (NT kalınlığı, CP kisti, konjenital kalp anomalisi bulgusu, vs)	7 (%50,0)	---	3 (%23,1)
	Down öyküsü	---	---	7 (%58,2)
	İleri maternal yaş	2 (%14,2)	---	3 (%23,1)

n, Birey sayısı; %,Yüzde; NT,Ense Kalınlığı; CP, Koroid Pleksus.

4.2. mikroRNA Analizine Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 43 gebeden maternal plazma ve amniyotik sıvı örneği alındı ve 49 miRNA'nın ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Plazma örneklerinin analizinde hsa-miR-802, hsa-miR-498, hsa-miR-891b, hsa-miR-1298-5p, hsa-miR-374a ve hsa-miR-3156-5p; amniyotik sıvı analizinde hsa-miR-498, hsa-miR-891b, hsa-miR-374a ve hsa-miR-3156-5p primerleri, amplifikasyon eğrilerinde farklı bölgelerde de eğri verdiği ve gerçek pikler belirlenemediğinden analiz dışı bırakıldı.

4.2.1. Plazma örneğindeki miRNA ekspresyon düzeylerine ait bulgular

Gebelerden alınan plazma örneklerinde, kontrol gruplarına karşı, hasta grubundaki 43 miRNA'nın ekspresyon değişimi saptandı (Tablo 4.4, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.9). Kontrol gruplarına göre, hasta grubunda bulunan farklı anomali gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri de analiz edildi, ancak Down sendromu hariç örneklem genişliği nedeni ile Klinefelter sendromu, Turner sendromu ve Trizomi 18 için belli düzeylerde artma ve azalma bulunmasına rağmen p değeri hesabı yapılamamıştır. Bu hasta gruplarına ait bulgular Tablo 4.5, Tablo 4.8 ve Tablo 4.10 verilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol-2 grubuna karşı hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

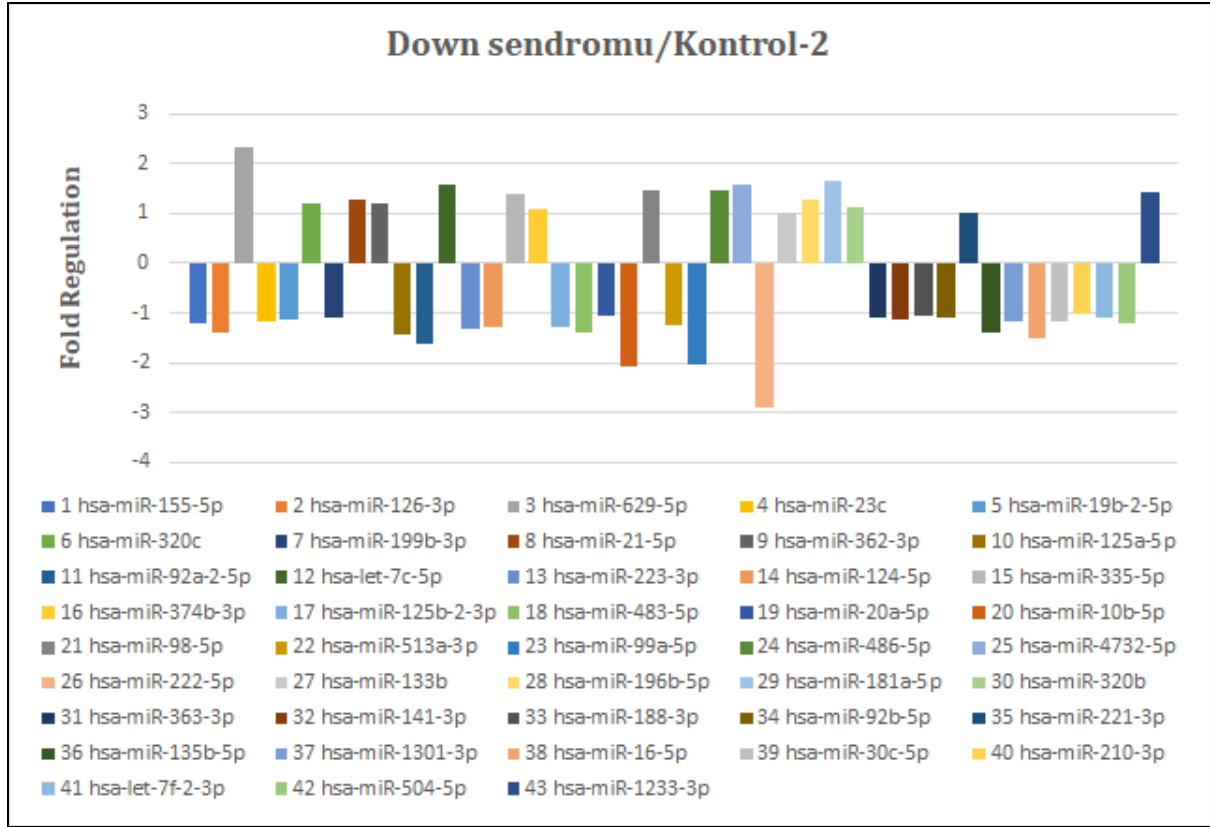
miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P değeri
hsa-miR-155-5p	0,9433	(0.17, 1.72)	-1,0601	0,337713
hsa-miR-126-3p	0,8644	(0.43, 1.30)	-1,1569	0,964832
hsa-miR-629-5p	1,76	(0.51, 3.01)	1,76	0,145101
hsa-miR-23c	0,9015	(0.21, 1.60)	-1,1093	0,678213
hsa-miR-19b-2-5p	0,9835	(0.26, 1.71)	-1,0167	0,378725
hsa-miR-320c	1,1862	(0.71, 1.66)	1,1862	0,214476
hsa-miR-199b-3p	1,0531	(0.43, 1.68)	1,0531	0,645992
hsa-miR-21-5p	1,1943	(0.86, 1.53)	1,1943	0,165432
hsa-miR-362-3p	1,0982	(0.66, 1.54)	1,0982	0,524644
hsa-miR-125a-5p	0,8806	(0.50, 1.26)	-1,1356	0,857094
hsa-miR-92a-2-5p	0,7301	(0.07, 1.39)	-1,3697	0,952039
hsa-let-7c-5p	1,3831	(0.61, 2.16)	1,3831	0,211525
hsa-miR-223-3p	0,8122	(0.50, 1.12)	-1,2312	0,794688
hsa-miR-124-5p	0,9322	(0.15, 1.71)	-1,0727	0,372315
hsa-miR-335-5p	1,0922	(0.52, 1.67)	1,0922	0,148513
hsa-miR-374b-3p	1,0571	(0.49, 1.62)	1,0571	0,386538
hsa-miR-125b-2-3p	0,928	(0.15, 1.71)	-1,0776	0,342738
hsa-miR-483-5p	0,7223	(0.21, 1.24)	-1,3845	0,894232
hsa-miR-20a-5p	0,9453	(0.35, 1.54)	-1,0578	0,454062
hsa-miR-10b-5p	0,5515	(0.25, 0.86)	-1,8132	0,061452
hsa-miR-98-5p	1,337	(0.59, 2.08)	1,337	0,245674
hsa-miR-513a-3p	0,9382	(0.15, 1.72)	-1,0659	0,348259
hsa-miR-99a-5p	0,6218	(0.28, 0.96)	-1,6082	0,097411
hsa-miR-486-5p	1,344	(0.56, 2.12)	1,344	0,223863
hsa-miR-4732-5p	1,189	(0.30, 2.08)	1,189	0,29633
hsa-miR-222-5p	0,3821	(0.02, 0.75)	-2,617	0,097101
hsa-miR-133b	1,0653	(0.17, 1.96)	1,0653	0,190757
hsa-miR-196b-5p	1,2921	(0.55, 2.04)	1,2921	0,204326
hsa-miR-181a-5p	1,3371	(0.53, 2.14)	1,3371	0,335673
hsa-miR-320b	1,1282	(0.64, 1.61)	1,1282	0,376351
hsa-miR-363-3p	0,8289	(0.26, 1.40)	-1,2064	0,942988
hsa-miR-141-3p	1,0222	(0.39, 1.65)	1,0222	0,517911
hsa-miR-188-3p	1,0325	(0.25, 1.81)	1,0325	0,370639
hsa-miR-92b-5p	0,9962	(0.20, 1.79)	-1,0038	0,550695
hsa-miR-221-3p	0,9782	(0.59, 1.36)	-1,0223	0,67727
hsa-miR-135b-5p	0,8383	(0.15, 1.53)	-1,1929	0,410043
hsa-miR-1301-3p	0,8085	(0.24, 1.37)	-1,2369	0,689178
hsa-miR-16-5p	0,7373	(0.28, 1.19)	-1,3563	0,911449
hsa-miR-30c-5p	0,9043	(0.57, 1.24)	-1,1058	0,839484
hsa-miR-210-3p	0,7885	(0.33, 1.25)	-1,2682	0,516636
hsa-let-7f-2-3p	0,9072	(0.25, 1.56)	-1,1023	0,486285
hsa-miR-504-5p	0,9488	(0.18, 1.72)	-1,0539	0,352616
hsa-miR-1233-3p	1,4062	(0.29, 2.53)	1,4062	0,253833

Hasta grubundaki 14 gebeye ait miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişim Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında 43 miRNA'dan 25 miRNA'nın downregüle olduğu, 18 miRNA'nın upregüle olduğu saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.5. Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	DS		Klinefelter	Turner	Trizomi 18
	FR	P değeri	FR	FR	FR
hsa-miR-155-5p	-1,2	0,268542	1,557	-1,2823	1,129
hsa-miR-126-3p	-1,3787	0,731737	1,3373	1,2659	1,0035
hsa-miR-629-5p	2,3425	0,064138	-1,454	-1,2175	2,5084
hsa-miR-23c	-1,1782	0,514153	1,3101	-1,5241	-1,0527
hsa-miR-19b-2-5p	-1,1272	0,307184	1,5572	-1,2822	1,1291
hsa-miR-320c	1,207	0,165098	1,1237	1,161	1,1748
hsa-miR-199b-3p	-1,0835	0,600624	1,4603	1,632	1,0158
hsa-miR-21-5p	1,2654	0,108198	-1,22	1,5157	1,2575
hsa-miR-362-3p	1,2129	0,272968	-1,1321	-1,0627	-1,1179
hsa-miR-125a-5p	-1,4283	0,18287	2,0422	1,3044	-1,4452
hsa-miR-92a-2-5p	-1,6076	0,866137	1,3108	-1,5591	-1,0769
hsa-let-7c-5p	1,5668	0,131496	-1,3486	1,5107	1,6243
hsa-miR-223-3p	-1,312	0,858231	-1,435	1,2421	1,2001
hsa-miR-124-5p	-1,2757	0,320709	1,5298	1,1632	1,1093
hsa-miR-335-5p	1,3832	0,053046	1,6779	-1,4046	-9,3141
hsa-miR-374b-3p	1,0892	0,270197	1,2828	-1,5565	-1,0751
hsa-miR-125b-2-3p	-1,2848	0,299952	1,6025	-1,2459	1,4693
hsa-miR-483-5p	-1,414	0,897299	-1,1173	1,3442	-3,3415
hsa-miR-20a-5p	-1,045	0,32151	-1,6167	-1,0105	1,9126
hsa-miR-10b-5p	-2,0822	0,081548	-1,2649	-1,0052	-2,2216
hsa-miR-98-5p	1,4426	0,141235	-1,0547	1,2755	1,5169
hsa-miR-513a-3p	-1,2396	0,288545	1,6346	-1,2215	1,1852
hsa-miR-99a-5p	-2,0395	0,076541	1,3837	-1,3154	-1,455
hsa-miR-486-5p	1,4738	0,149728	-1,1305	-1,1541	2,3008
hsa-miR-4732-5p	1,5743	0,18267	-2,6474	1,0948	1,3539
hsa-miR-222-5p	-2,918	0,218334	-1,634	-3,2625	-2,2535
hsa-miR-133b	1,0185	0,116918	1,5052	-1,3331	1,086
hsa-miR-196b-5p	1,2819	0,227308	-1,0859	-1,4178	4,9645
hsa-miR-181a-5p	1,6403	0,162166	1,3447	-1,3481	-2,1521
hsa-miR-320b	1,1201	0,359504	1,5699	-1,3426	-1,0692
hsa-miR-363-3p	-1,1103	0,546605	-2,0949	-1,3866	1,4788
hsa-miR-141-3p	-1,1313	0,702953	2,6423	-1,359	-1,471
hsa-miR-188-3p	-1,0433	0,289275	1,5436	-1,2935	1,1193
hsa-miR-92b-5p	-1,0864	0,425433	1,503	-1,3284	1,0898
hsa-miR-221-3p	1,0124	0,491637	-1,1207	-1,1852	1,0347
hsa-miR-135b-5p	-1,3927	0,333393	1,4719	-1,3565	1,0673
hsa-miR-1301-3p	-1,1602	0,385111	-1,2384	-2,2221	-1,1463
hsa-miR-16-5p	-1,5266	0,959993	-1,4757	-1,0805	1,7907
hsa-miR-30c-5p	-1,157	0,893442	1,0933	1,1478	-1,4282
hsa-miR-210-3p	-1,0275	0,734397	-1,1714	-6,7489	-1,5042
hsa-let-7f-2-3p	-1,0982	0,313914	1,2266	-1,8196	-1,2568
hsa-miR-504-5p	-1,2101	0,291205	1,6115	-1,239	1,1685
hsa-miR-1233-3p	1,415	0,162687	1,535	-1,0324	1,6289

FR, Fold Regulation.



Şekil 4.1. Kontrol-2 grubuna göre Down sendromu grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

Hasta grubu içerisinde Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu ve Trizomi 18 alt grupları oluşturularak Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında, Down sendromu grubunda 16 miRNA'nın upregüle, 27 miRNA'nın downregüle olduğu saptandı. Özellikle hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-99a-5p ve hsa-miR-222-5p'nin ekspresyonlarının yaklaşık 2 kat azaldığı bulunmasına rağmen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Şekil 4.1). Kontrol-2 grubu ile yapılan karşılaştırmada, Klinefelter sendromu grubunda hsa-miR-363-3p ve hsa-miR-4732-5p'nin; Turner sendromu grubunda hsa-miR-210-3p, hsa-miR-1301-3p ve hsa-miR-222-5p'nin; Trizomi 18 grubunda ise hsa-miR-335-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-222-5p ve hsa-miR-181a-5p'nin ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptandı (Tablo 4.5).

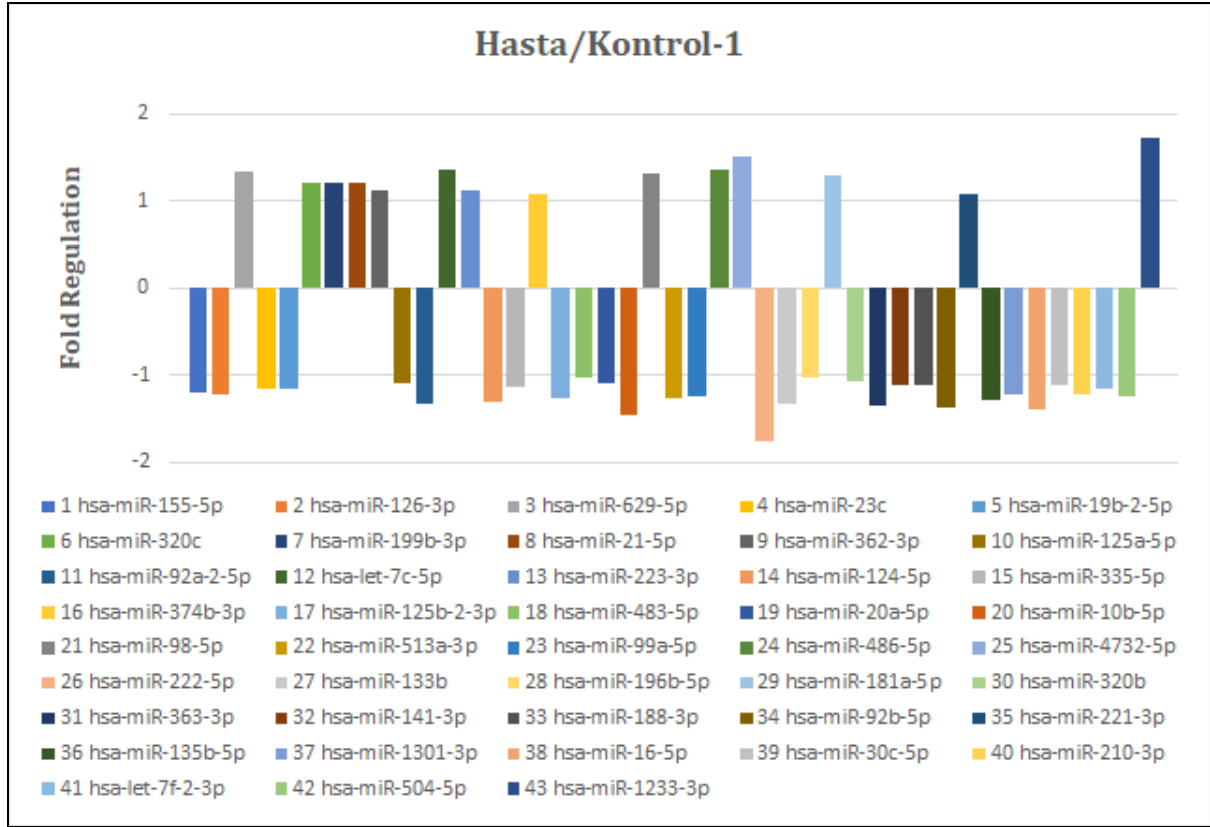
Tablo 4.6. Kontrol-2 grubuna göre Kontrol-1 grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P değeri
hsa-miR-155-5p	1,1304	(0.66, 1.60)	1,1304	0,572686
hsa-miR-126-3p	1,0534	(0.74, 1.36)	1,0534	0,560534
hsa-miR-629-5p	1,3224	(0.68, 1.97)	1,3224	0,411142
hsa-miR-23c	1,0373	(0.52, 1.56)	1,0373	0,937938
hsa-miR-19b-2-5p	1,1305	(0.64, 1.62)	1,1305	0,619946
hsa-miR-320c	0,9752	(0.74, 1.21)	-1,0254	0,821583
hsa-miR-199b-3p	0,868	(0.39, 1.35)	-1,1521	0,246924
hsa-miR-21-5p	0,9959	(0.83, 1.17)	-1,0042	0,910924
hsa-miR-362-3p	0,9888	(0.66, 1.31)	-1,0113	0,880843
hsa-miR-125a-5p	0,9598	(0.66, 1.26)	-1,0419	0,805919
hsa-miR-92a-2-5p	0,9636	(0.43, 1.50)	-1,0378	0,445806
hsa-let-7c-5p	1,0126	(0.72, 1.30)	1,0126	0,919802
hsa-miR-223-3p	0,7232	(0.58, 0.87)	-1,3827	0,004897
hsa-miR-124-5p	1,2137	(0.66, 1.76)	1,2137	0,432053
hsa-miR-335-5p	1,2386	(0.96, 1.51)	1,2386	0,083388
hsa-miR-374b-3p	0,974	(0.63, 1.32)	-1,0267	0,890523
hsa-miR-125b-2-3p	1,1703	(0.68, 1.66)	1,1703	0,530309
hsa-miR-483-5p	0,7392	(0.35, 1.13)	-1,3529	0,685926
hsa-miR-20a-5p	1,0229	(0.62, 1.43)	1,0229	0,663612
hsa-miR-10b-5p	0,8086	(0.40, 1.22)	-1,2368	0,506719
hsa-miR-98-5p	1,0111	(0.55, 1.47)	1,0111	0,859179
hsa-miR-513a-3p	1,1867	(0.68, 1.70)	1,1867	0,508689
hsa-miR-99a-5p	0,7684	(0.38, 1.16)	-1,3014	0,222348
hsa-miR-486-5p	0,9865	(0.62, 1.35)	-1,0137	0,879463
hsa-miR-4732-5p	0,7914	(0.42, 1.16)	-1,2636	0,65176
hsa-miR-222-5p	0,6711	(0.17, 1.18)	-1,49	0,132438
hsa-miR-133b	1,4168	(0.67, 2.16)	1,4168	0,265084
hsa-miR-196b-5p	1,3401	(0.80, 1.88)	1,3401	0,201606
hsa-miR-181a-5p	1,029	(0.52, 1.53)	1,029	0,883935
hsa-miR-320b	1,2047	(0.83, 1.58)	1,2047	0,34066
hsa-miR-363-3p	1,1194	(0.54, 1.70)	1,1194	0,577553
hsa-miR-141-3p	1,142	(0.66, 1.62)	1,142	0,766586
hsa-miR-188-3p	1,1394	(0.63, 1.65)	1,1394	0,630092
hsa-miR-92b-5p	1,3698	(0.68, 2.06)	1,3698	0,529921
hsa-miR-221-3p	0,9039	(0.67, 1.14)	-1,1063	0,258152
hsa-miR-135b-5p	1,0712	(0.64, 1.50)	1,0712	0,668673
hsa-miR-1301-3p	0,9928	(0.53, 1.46)	-1,0073	0,780378
hsa-miR-16-5p	1,0266	(0.70, 1.36)	1,0266	0,667861
hsa-miR-30c-5p	1,0025	(0.70, 1.30)	1,0025	0,895182
hsa-miR-210-3p	0,9628	(0.58, 1.34)	-1,0387	0,350893
hsa-let-7f-2-3p	1,0579	(0.61, 1.50)	1,0579	0,846953
hsa-miR-504-5p	1,1699	(0.68, 1.66)	1,1699	0,523435
hsa-miR-1233-3p	0,8207	(0.24, 1.40)	-1,2185	0,872474

Çalışmaya dahil edilen ve kontrol grubu olarak seçilen Kontrol-1 ve Kontrol-2 arasındaki farklılık Kontrol-1 grubundaki gebelerin tarama testlerinin riskli olmasıdır. Bu nedenle iki grup miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol-2 grubuna göre hsa-miR-223-3p ekspresyonunun Kontrol-1 grubunda 1,38 kat azaldığı bulundu ($p=0,0049$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.7. Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P değeri
hsa-miR-155-5p	0,8345	(0.16, 1.51)	-1,1983	0,44973
hsa-miR-126-3p	0,8206	(0.39, 1.25)	-1,2186	0,638919
hsa-miR-629-5p	1,331	(0.50, 2.16)	1,331	0,154969
hsa-miR-23c	0,869	(0.23, 1.51)	-1,1507	0,60024
hsa-miR-19b-2-5p	0,87	(0.25, 1.49)	-1,1494	0,480668
hsa-miR-320c	1,2163	(0.75, 1.69)	1,2163	0,141609
hsa-miR-199b-3p	1,2133	(0.71, 1.72)	1,2133	0,28176
hsa-miR-21-5p	1,1992	(0.87, 1.53)	1,1992	0,101921
hsa-miR-362-3p	1,1106	(0.69, 1.53)	1,1106	0,410576
hsa-miR-125a-5p	0,9175	(0.54, 1.30)	-1,09	0,993305
hsa-miR-92a-2-5p	0,7577	(0.13, 1.38)	-1,3198	0,5339
hsa-let-7c-5p	1,3659	(0.63, 2.10)	1,3659	0,1575
hsa-miR-223-3p	1,1231	(0.70, 1.54)	1,1231	0,231046
hsa-miR-124-5p	0,7681	(0.14, 1.40)	-1,302	0,577543
hsa-miR-335-5p	0,8818	(0.40, 1.36)	-1,134	0,721504
hsa-miR-374b-3p	1,0854	(0.49, 1.68)	1,0854	0,396354
hsa-miR-125b-2-3p	0,793	(0.14, 1.45)	-1,2611	0,472599
hsa-miR-483-5p	0,9772	(0.26, 1.70)	-1,0234	0,812563
hsa-miR-20a-5p	0,9241	(0.32, 1.53)	-1,0821	0,570945
hsa-miR-10b-5p	0,6821	(0.31, 1.05)	-1,466	0,193147
hsa-miR-98-5p	1,3222	(0.65, 1.99)	1,3222	0,158636
hsa-miR-513a-3p	0,7906	(0.14, 1.44)	-1,2649	0,49011
hsa-miR-99a-5p	0,8092	(0.43, 1.19)	-1,2358	0,364885
hsa-miR-486-5p	1,3623	(0.59, 2.14)	1,3623	0,154429
hsa-miR-4732-5p	1,5024	(0.29, 2.72)	1,5024	0,221712
hsa-miR-222-5p	0,5694	(0.10, 1.03)	-1,7564	0,514213
hsa-miR-133b	0,7519	(0.07, 1.43)	-1,33	0,757927
hsa-miR-196b-5p	0,9642	(0.47, 1.46)	-1,0372	0,458689
hsa-miR-181a-5p	1,2994	(0.56, 2.04)	1,2994	0,188156
hsa-miR-320b	0,9365	(0.56, 1.32)	-1,0678	0,921573
hsa-miR-363-3p	0,7405	(0.27, 1.21)	-1,3504	0,735552
hsa-miR-141-3p	0,8951	(0.39, 1.40)	-1,1171	0,592825
hsa-miR-188-3p	0,9062	(0.24, 1.57)	-1,1035	0,473822
hsa-miR-92b-5p	0,7272	(0.19, 1.27)	-1,3751	0,797898
hsa-miR-221-3p	1,0822	(0.70, 1.47)	1,0822	0,367569
hsa-miR-135b-5p	0,7826	(0.14, 1.42)	-1,2778	0,498288
hsa-miR-1301-3p	0,8144	(0.23, 1.40)	-1,228	0,813944
hsa-miR-16-5p	0,7182	(0.26, 1.17)	-1,3923	0,668235
hsa-miR-30c-5p	0,9021	(0.57, 1.24)	-1,1086	0,755659
hsa-miR-210-3p	0,819	(0.43, 1.21)	-1,221	0,980867
hsa-let-7f-2-3p	0,8575	(0.29, 1.42)	-1,1661	0,388247
hsa-miR-504-5p	0,8111	(0.17, 1.46)	-1,233	0,489082
hsa-miR-1233-3p	1,7134	(0.34, 3.09)	1,7134	0,2028



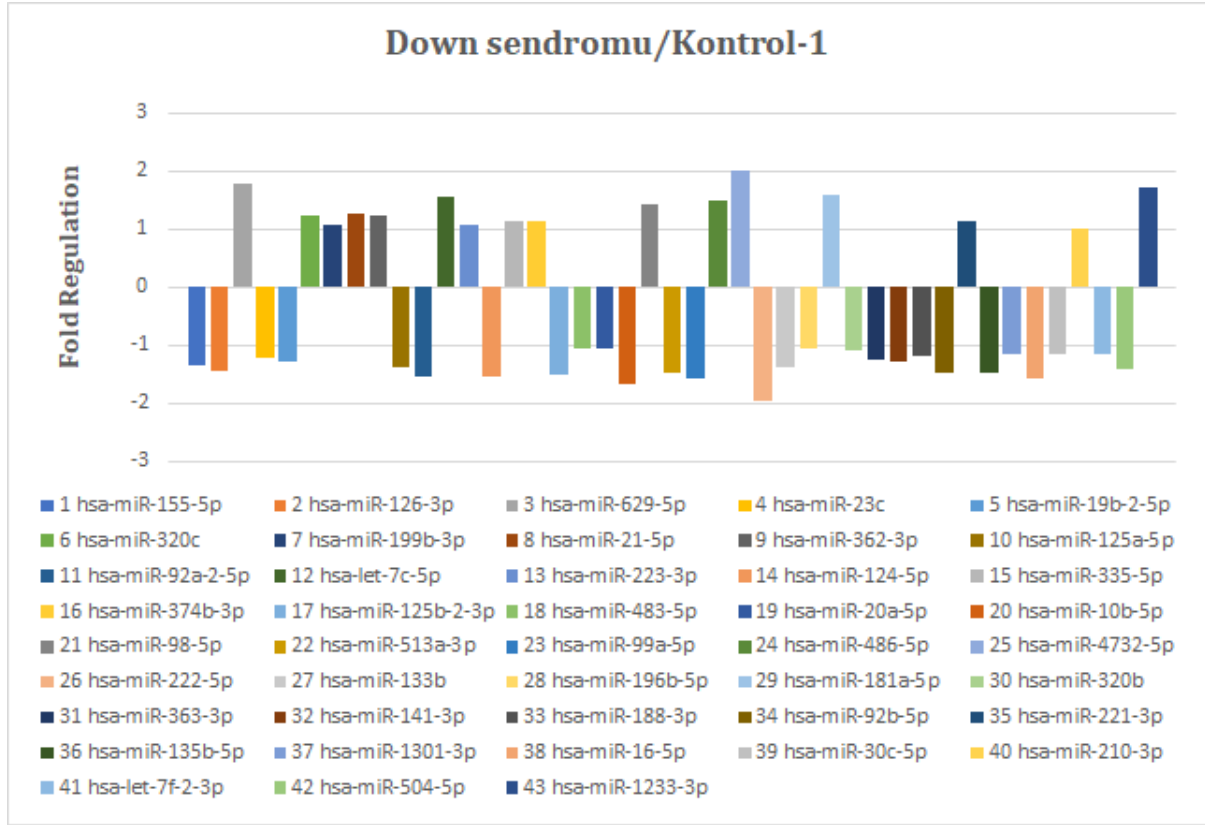
Şekil 4.2 Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

Tarama testi riskli olmasına rağmen amniyosentez sonucunda herhangi bir anomalili fetus taşımadığı belirlenen 16 gebenin dahil edildiği Kontrol-1 grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda 43 miRNA'dan 15 miRNA'nın upregüle, 28 miRNA'nın downregüle olduğu saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Tablo 4.7) (Şekil 4.2).

Tablo 4.8. Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	DS		Klinefelter	Turner	Trizomi 18
	FR	P değeri	FR	FR	FR
hsa-miR-155-5p	-1,3564	0,335155	1,3775	-1,4495	-1,0012
hsa-miR-126-3p	-1,4523	0,474841	1,2695	1,2018	-1,0497
hsa-miR-629-5p	1,7714	0,057216	-1,9227	-1,61	1,8969
hsa-miR-23c	-1,2222	0,431523	1,2629	-1,581	-1,092
hsa-miR-19b-2-5p	-1,2743	0,367809	1,3775	-1,4495	-1,0012
hsa-miR-320c	1,2377	0,106684	1,1523	1,1905	1,2046
hsa-miR-199b-3p	1,0633	0,555165	1,6823	1,8802	1,1703
hsa-miR-21-5p	1,2707	0,05974	-1,2149	1,522	1,2627
hsa-miR-362-3p	1,2267	0,187323	-1,1195	-1,0508	-1,1053
hsa-miR-125a-5p	-1,3708	0,234627	2,1278	1,3591	-1,387
hsa-miR-92a-2-5p	-1,5491	0,414246	1,3604	-1,5023	-1,0376
hsa-let-7c-5p	1,5473	0,088698	-1,3656	1,4919	1,6041
hsa-miR-223-3p	1,0539	0,300484	-1,0378	1,7174	1,6594
hsa-miR-124-5p	-1,5483	0,459713	1,2605	-1,0434	-1,0941
hsa-miR-335-5p	1,1167	0,387302	1,3546	-1,7397	-11,5364
hsa-miR-374b-3p	1,1183	0,267189	1,317	-1,516	-1,0471
hsa-miR-125b-2-3p	-1,5036	0,385006	1,3693	-1,4581	1,2554
hsa-miR-483-5p	-1,0452	0,675717	1,2109	1,8186	-2,4699
hsa-miR-20a-5p	-1,0689	0,387737	-1,6538	-1,0337	1,8697
hsa-miR-10b-5p	-1,6836	0,198432	-1,0227	1,2304	-1,7963
hsa-miR-98-5p	1,4267	0,081322	-1,0665	1,2615	1,5002
hsa-miR-513a-3p	-1,471	0,377924	1,3775	-1,4495	-1,0012
hsa-miR-99a-5p	-1,5672	0,137001	1,8007	-1,0108	-1,118
hsa-miR-486-5p	1,4939	0,094586	-1,1152	-1,1386	2,3323
hsa-miR-4732-5p	1,9894	0,12536	-2,0951	1,3834	1,7109
hsa-miR-222-5p	-1,9584	0,770744	-1,0967	-2,1896	-1,5124
hsa-miR-133b	-1,3911	0,996829	1,0624	-1,8888	-1,3046
hsa-miR-196b-5p	-1,0454	0,514712	-1,4552	-1,9	3,7046
hsa-miR-181a-5p	1,5941	0,062038	1,3068	-1,3872	-2,2145
hsa-miR-320b	-1,0756	0,807601	1,3031	-1,6175	-1,2881
hsa-miR-363-3p	-1,2429	0,80318	-2,3451	-1,5521	1,3211
hsa-miR-141-3p	-1,2919	0,793715	2,3138	-1,552	-1,6799
hsa-miR-188-3p	-1,1888	0,348178	1,3547	-1,4738	-1,018
hsa-miR-92b-5p	-1,4882	0,569367	1,0972	-1,8197	-1,2569
hsa-miR-221-3p	1,1201	0,258413	-1,013	-1,0713	1,1447
hsa-miR-135b-5p	-1,4918	0,38563	1,3741	-1,4531	-1,0037
hsa-miR-1301-3p	-1,1518	0,457961	-1,2295	-2,2061	-1,138
hsa-miR-16-5p	-1,5671	0,748815	-1,5149	-1,1092	1,7444
hsa-miR-30c-5p	-1,1599	0,82345	1,0905	1,1449	-1,4318
hsa-miR-210-3p	1,0109	0,645504	-1,1277	-6,4976	-1,4482
hsa-let-7f-2-3p	-1,1619	0,230208	1,1594	-1,925	-1,3296
hsa-miR-504-5p	-1,4157	0,376814	1,3775	-1,4495	-1,0012
hsa-miR-1233-3p	1,7242	0,130658	1,8704	1,1802	1,9848

FR, Fold Regulation

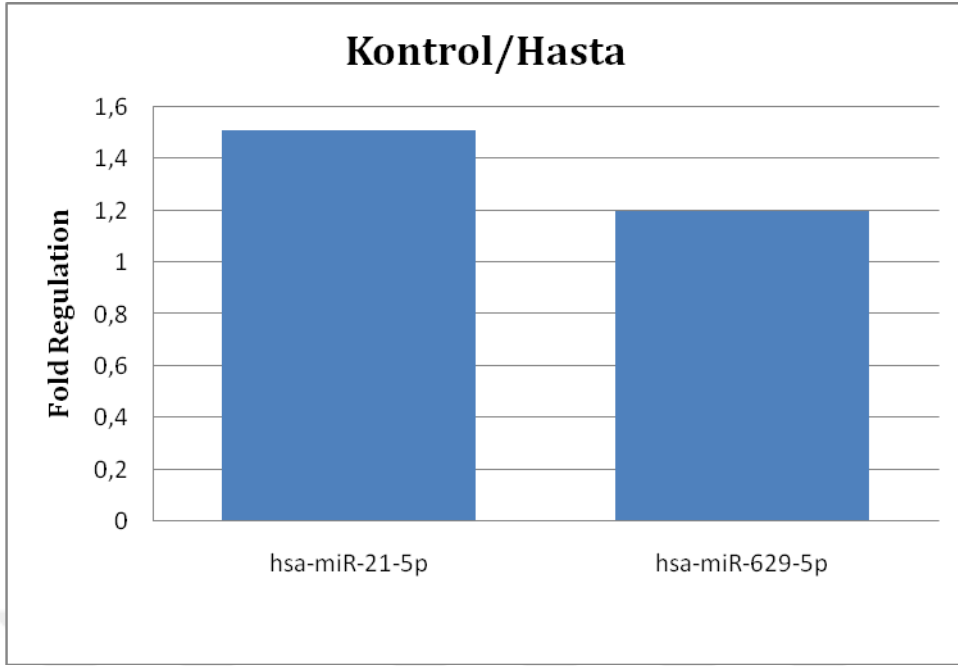


Şekil 4.3 Kontrol-1 grubuna göre Down sendromu grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

Kontrol-1 ile hasta grubu içerisindeki alt gruplar karşılaştırıldığında, Kontrol-1'e göre Klinefelter sendromu grubunda hsa-miR-363-3p ve hsa-miR-4732-5p'nin; Turner sendromu grubunda hsa-miR-210-3p, hsa-miR-1301-3p ve hsa-miR-222-5p'nin; Trizomi 18 grubunda ise hsa-miR-335-5p, hsa-miR-483-5p ve hsa-miR-181a-5p'nin ekspresyon düzeylerinin belirgin azaldığı saptandı (Tablo 4.8) (Şekil 4.3).

Tablo 4.9. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P değeri
hsa-miR-155-5p	0,8817	(0.18, 1.58)	-1,1342	0,250504
hsa-miR-126-3p	0,84	(0.42, 1.26)	-1,1905	0,76584
hsa-miR-629-5p	1,5086	(0.57, 2.44)	1,5086	0,043237
hsa-miR-23c	0,8834	(0.26, 1.51)	-1,132	0,542918
hsa-miR-19b-2-5p	0,9192	(0.28, 1.56)	-1,0879	0,287617
hsa-miR-320c	1,2027	(0.75, 1.65)	1,2027	0,066721
hsa-miR-199b-3p	1,1387	(0.66, 1.62)	1,1387	0,923236
hsa-miR-21-5p	1,197	(0.88, 1.51)	1,197	0,043426
hsa-miR-362-3p	1,105	(0.72, 1.49)	1,105	0,356936
hsa-miR-125a-5p	0,9007	(0.55, 1.25)	-1,1102	0,922732
hsa-miR-92a-2-5p	0,7452	(0.14, 1.35)	-1,3419	0,754042
hsa-let-7c-5p	1,3736	(0.65, 2.10)	1,3736	0,058448
hsa-miR-223-3p	0,9712	(0.61, 1.33)	-1,0296	0,515304
hsa-miR-124-5p	0,8377	(0.17, 1.51)	-1,1937	0,338904
hsa-miR-335-5p	0,9706	(0.46, 1.48)	-1,0303	0,284399
hsa-miR-374b-3p	1,0726	(0.52, 1.62)	1,0726	0,246476
hsa-miR-125b-2-3p	0,8509	(0.17, 1.53)	-1,1752	0,264466
hsa-miR-483-5p	0,8534	(0.27, 1.43)	-1,1718	0,927672
hsa-miR-20a-5p	0,9336	(0.36, 1.50)	-1,0712	0,385451
hsa-miR-10b-5p	0,6201	(0.32, 0.92)	-1,6126	0,088794
hsa-miR-98-5p	1,3288	(0.70, 1.96)	1,3288	0,090345
hsa-miR-513a-3p	0,8536	(0.17, 1.54)	-1,1715	0,276519
hsa-miR-99a-5p	0,7191	(0.40, 1.03)	-1,3906	0,170153
hsa-miR-486-5p	1,3541	(0.62, 2.09)	1,3541	0,066457
hsa-miR-4732-5p	1,3528	(0.34, 2.36)	1,3528	0,104971
hsa-miR-222-5p	0,4762	(0.10, 0.86)	-2,1001	0,203575
hsa-miR-133b	0,879	(0.14, 1.61)	-1,1376	0,859935
hsa-miR-196b-5p	1,0994	(0.54, 1.65)	1,0994	0,186368
hsa-miR-181a-5p	1,3162	(0.62, 2.01)	1,3162	0,156051
hsa-miR-320b	1,018	(0.62, 1.41)	1,018	0,587128
hsa-miR-363-3p	0,7789	(0.31, 1.25)	-1,2839	0,846781
hsa-miR-141-3p	0,95	(0.43, 1.47)	-1,0526	0,444151
hsa-miR-188-3p	0,9608	(0.28, 1.64)	-1,0408	0,283026
hsa-miR-92b-5p	0,8374	(0.23, 1.44)	-1,1942	0,589307
hsa-miR-221-3p	1,0343	(0.67, 1.40)	1,0343	0,356043
hsa-miR-135b-5p	0,8071	(0.17, 1.45)	-1,239	0,31246
hsa-miR-1301-3p	0,8117	(0.27, 1.35)	-1,232	0,687365
hsa-miR-16-5p	0,7267	(0.29, 1.17)	-1,3761	0,721001
hsa-miR-30c-5p	0,9031	(0.60, 1.21)	-1,1073	0,750641
hsa-miR-210-3p	0,8052	(0.41, 1.20)	-1,2419	0,689706
hsa-let-7f-2-3p	0,8795	(0.30, 1.46)	-1,137	0,28275
hsa-miR-504-5p	0,8702	(0.20, 1.54)	-1,1492	0,278193
hsa-miR-1233-3p	1,5681	(0.44, 2.69)	1,5681	0,124521

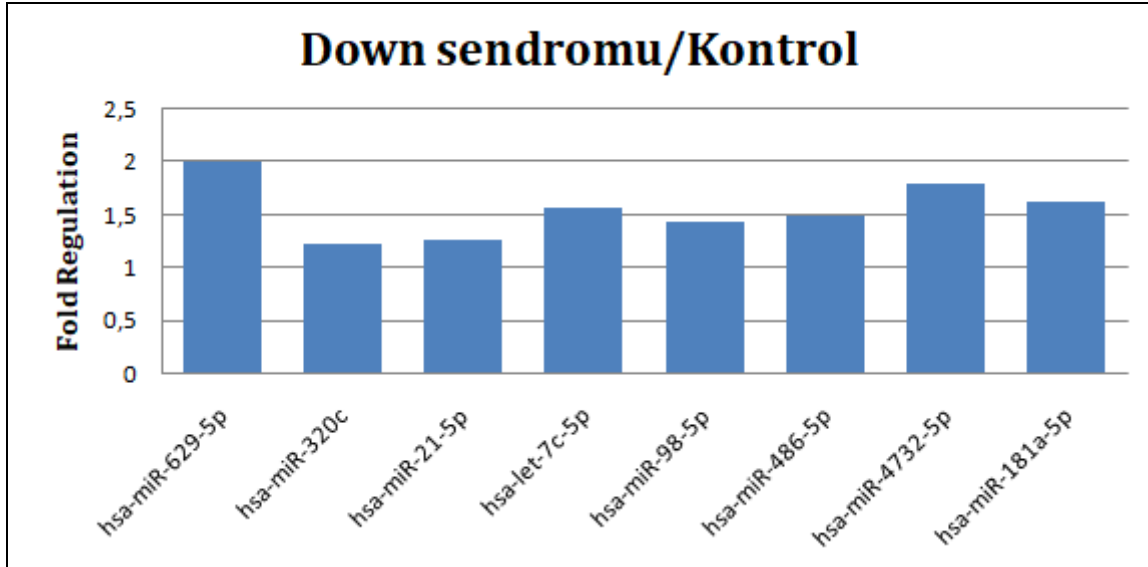


Şekil 4.4. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeylerindeki kat farkı

Konjenital anomalili fetus taşımadığı belirlenen her iki kontrol grubu ile hasta grubu miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırmasında; 43 miRNA'dan 28 miRNA'nın downregüle olduğu, 15 miRNA'nın upregüle olduğu tespit edildi (Tablo 4.9). Hasta grubunda, bu miRNA'lardan hsa-miR-629-5p'nin 1,51 kat ($p=0,043$) ve hsa-miR-21-5p'nin 1,19 kat ($p=0,043$) arttığı saptandı (Şekil 4.4).

Tablo 4.10. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki plazma miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	DS		Klinefelter	Turner	Trizomi 18
	FR	P değeri	FR	FR	FR
hsa-miR-155-5p	-1,2839	0,162169	1,4552	-1,372	1,0552
hsa-miR-126-3p	-1,4188	0,5147	1,2995	1,2301	-1,0255
hsa-miR-629-5p	2,0078	0,008226	-1,6963	-1,4205	2,15
hsa-miR-23c	-1,2023	0,350349	1,2839	-1,5552	-1,0742
hsa-miR-19b-2-5p	-1,2061	0,194125	1,4553	-1,372	1,0553
hsa-miR-320c	1,2238	0,041638	1,1394	1,1772	1,1911
hsa-miR-199b-3p	-1,0021	0,892672	1,5789	1,7646	1,0983
hsa-miR-21-5p	1,2683	0,01994	-1,2172	1,5191	1,2604
hsa-miR-362-3p	1,2205	0,129549	-1,1251	-1,0561	-1,1109
hsa-miR-125a-5p	-1,3963	0,153836	2,089	1,3343	-1,4128
hsa-miR-92a-2-5p	-1,575	0,567314	1,338	-1,5275	-1,0551
hsa-let-7c-5p	1,556	0,021994	-1,3579	1,5003	1,6131
hsa-miR-223-3p	-1,0972	0,555181	-1,2001	1,4852	1,4351
hsa-miR-124-5p	-1,4195	0,247861	1,3748	1,0453	-1,0032
hsa-miR-335-5p	1,2291	0,097427	1,491	-1,5806	-10,4812
hsa-miR-374b-3p	1,1051	0,133147	1,3016	-1,534	-1,0596
hsa-miR-125b-2-3p	-1,4012	0,19857	1,4693	-1,3589	1,3471
hsa-miR-483-5p	-1,1968	0,731929	1,0574	1,5882	-2,8283
hsa-miR-20a-5p	-1,0581	0,21858	-1,6371	-1,0233	1,8888
hsa-miR-10b-5p	-1,8519	0,106092	-1,1249	1,1186	-1,9758
hsa-miR-98-5p	1,4338	0,034251	-1,0612	1,2677	1,5077
hsa-miR-513a-3p	-1,3624	0,190362	1,4873	-1,3425	1,0784
hsa-miR-99a-5p	-1,7636	0,09678	1,6001	-1,1375	-1,2582
hsa-miR-486-5p	1,4849	0,030051	-1,122	-1,1455	2,3182
hsa-miR-4732-5p	1,7913	0,039677	-2,3267	1,2456	1,5405
hsa-miR-222-5p	-2,3417	0,385201	-1,3113	-2,6182	-1,8085
hsa-miR-133b	-1,19	0,635025	1,2419	-1,6157	-1,116
hsa-miR-196b-5p	1,0907	0,238049	-1,2762	-1,6663	4,2241
hsa-miR-181a-5p	1,6146	0,044677	1,3236	-1,3696	-2,1863
hsa-miR-320b	1,0107	0,516651	1,4165	-1,4879	-1,185
hsa-miR-363-3p	-1,1816	0,614465	-2,2294	-1,4756	1,3896
hsa-miR-141-3p	-1,2172	0,68133	2,4557	-1,4623	-1,5828
hsa-miR-188-3p	-1,1212	0,180117	1,4364	-1,3901	1,0415
hsa-miR-92b-5p	-1,2924	0,38224	1,2635	-1,5803	-1,0916
hsa-miR-221-3p	1,0705	0,203376	-1,0599	-1,1209	1,094
hsa-miR-135b-5p	-1,4465	0,213573	1,4171	-1,409	1,0275
hsa-miR-1301-3p	-1,1555	0,299735	-1,2335	-2,2132	-1,1417
hsa-miR-16-5p	-1,5488	0,804796	-1,4972	-1,0963	1,765
hsa-miR-30c-5p	-1,1586	0,824274	1,0918	1,1462	-1,4302
hsa-miR-210-3p	-1,0062	0,995793	-1,1471	-6,6091	-1,473
hsa-let-7f-2-3p	-1,1329	0,12777	1,1891	-1,877	-1,2965
hsa-miR-504-5p	-1,3196	0,190956	1,4778	-1,3511	1,0716
hsa-miR-1233-3p	1,578	0,06442	1,7118	1,0802	1,8165



Şekil 4.5 Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre Down sendromu grubundaki plazma miRNA ekspresyon düzeylerindeki kat farkı

Tablo 4.10’da verilen hasta alt grupları ile tüm kontrol grubu (Kontrol-1 ve Kontrol-2) karşılaştırmasında ise kontrol grubuna göre Down sendromu grubunda hsa-miR-629-5p 2 kat ($p=0,008$), hsa-miR-320c 1,22 kat ($p=0,042$), hsa-miR-21-5p 1,27 kat ($p=0,019$), hsa-let-7c-5p 1,56 kat ($p=0,022$), hsa-miR-98-5p 1,43 kat ($p=0,034$), hsa-miR-486-5p 1,49 kat ($p=0,03$), hsa-miR-4732-5p 1,79 kat ($p=0,04$) ve hsa-miR-181a-5p 1,61 kat ($p=0,045$) arttığı bulundu (Şekil 4.5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Klinefelter sendromu grubunda hsa-miR-363-3p ve hsa-miR-4732-5p’nin; Turner sendromu grubunda hsa-miR-210-3p, hsa-miR-1301-3p ve hsa-miR-222-5p’nin; Trizomi 18 grubunda ise hsa-miR-335-5p, hsa-miR-483-5p ve hsa-miR-181a-5p’nin ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirlendi.

4.2.2. Amniyotik sıvı örneğindeki miRNA ekspresyon düzeylerine ait bulgular

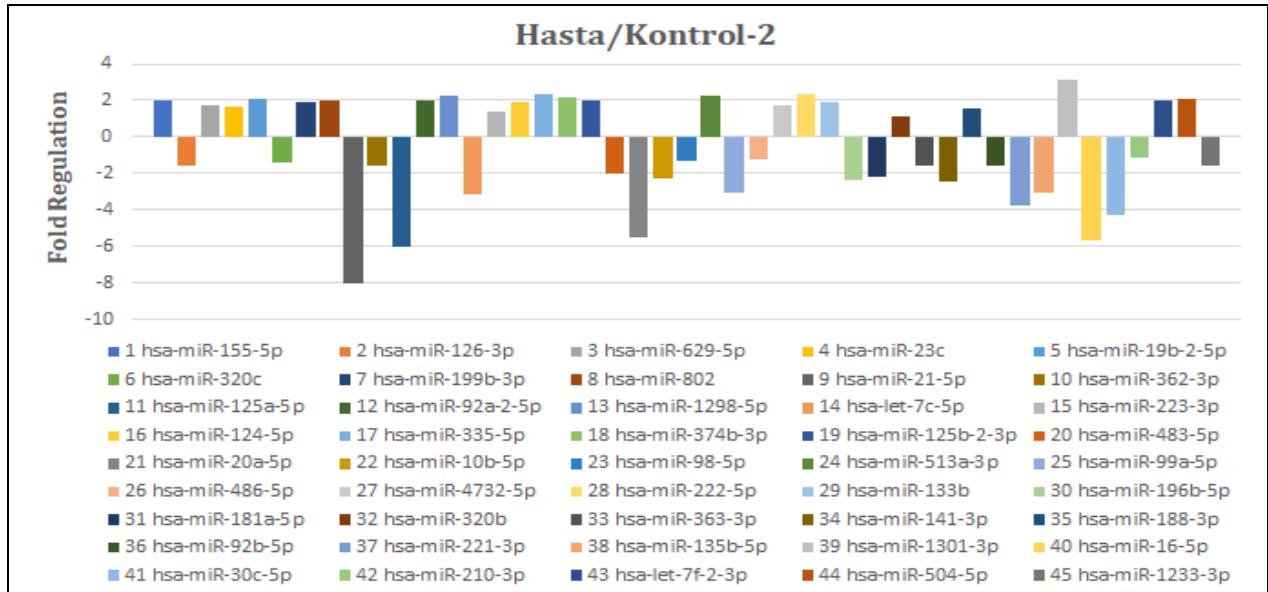
Plazma örneklerinin elde edildiği aynı gebelerden amniyosentez ile alınan amniyotik sıvı örneklerinde de, kontrol gruplarına karşı, hasta grubundaki 45 miRNA’nın ekspresyon değişiminin analizi gerçekleştirildi (Tablo 4.11, Tablo 4.14, Tablo 4.16). Plazma örneklerinde yapılan gruplandırmalara paralel şekilde yapılan değerlendirmelerde, hasta alt gruplarının kontrol gruplarına göre miRNA ekspresyon düzeylerinde belli farklılıklar olmasına rağmen Down sendromu hariç örneklem genişliği nedeni ile Klinefelter sendromu, Turner sendromu ve Trizomi 18 için istatistiksel bir hesaplama yapılamamıştır. Hasta alt gruplarına ait bulgular Tablo 4.12, Tablo 4.15, Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri

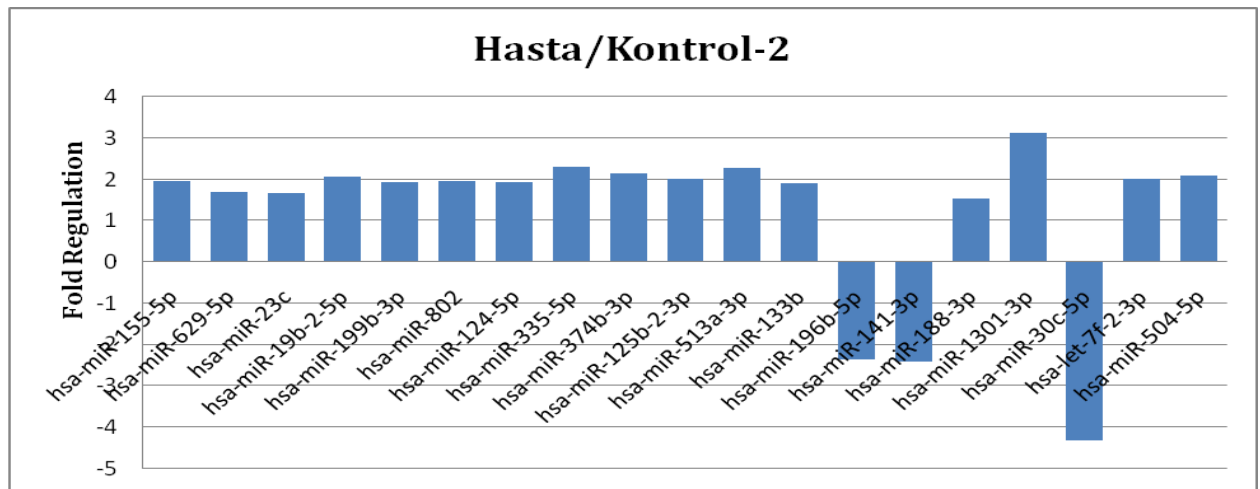
miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P değeri
hsa-miR-155-5p	1,9628	(0.71, 3.21)	1,9628	0,016299
hsa-miR-126-3p	0,6191	(0.21, 1.03)	-1,6152	0,161854
hsa-miR-629-5p	1,7068	(0.83, 2.58)	1,7068	0,027341
hsa-miR-23c	1,6617	(0.92, 2.41)	1,6617	0,037312
hsa-miR-19b-2-5p	2,0688	(0.66, 3.48)	2,0688	0,018112
hsa-miR-320c	0,7267	(0.34, 1.11)	-1,3761	0,311621
hsa-miR-199b-3p	1,9312	(0.95, 2.92)	1,9312	0,01812
hsa-miR-802	1,9674	(0.63, 3.30)	1,9674	0,025744
hsa-miR-21-5p	0,1239	(0.00001, 0.30)	-8,0729	0,066704
hsa-miR-362-3p	0,6499	(0.31, 0.99)	-1,5388	0,064651
hsa-miR-125a-5p	0,165	(0.00001, 0.41)	-6,0593	0,606743
hsa-miR-92a-2-5p	2,0224	(0.65, 3.39)	2,0224	0,020228
hsa-miR-1298-5p	2,2726	(0.75, 3.79)	2,2726	0,01228
hsa-let-7c-5p	0,3197	(0.00001, 0.69)	-3,1277	0,625464
hsa-miR-223-3p	1,3872	(0.80, 1.97)	1,3872	0,22233
hsa-miR-124-5p	1,9457	(0.55, 3.34)	1,9457	0,023788
hsa-miR-335-5p	2,3128	(1.01, 3.62)	2,3128	0,003774
hsa-miR-374b-3p	2,1363	(0.70, 3.58)	2,1363	0,015004
hsa-miR-125b-2-3p	2,0035	(1.05, 2.96)	2,0035	0,006924
hsa-miR-483-5p	0,505	(0.11, 0.90)	-1,98	0,407358
hsa-miR-20a-5p	0,1805	(0.00001, 0.40)	-5,5393	0,066885
hsa-miR-10b-5p	0,4425	(0.12, 0.76)	-2,2596	0,16539
hsa-miR-98-5p	0,7696	(0.26, 1.28)	-1,2993	0,661376
hsa-miR-513a-3p	2,2672	(0.75, 3.79)	2,2672	0,012384
hsa-miR-99a-5p	0,3272	(0.00001, 0.67)	-3,0565	0,626583
hsa-miR-486-5p	0,8438	(0.43, 1.26)	-1,1851	0,523072
hsa-miR-4732-5p	1,7132	(0.96, 2.46)	1,7132	0,064273
hsa-miR-222-5p	2,3411	(0.12, 4.56)	2,3411	0,080816
hsa-miR-133b	1,9138	(1.16, 2.67)	1,9138	0,007222
hsa-miR-196b-5p	0,4273	(0.16, 0.69)	-2,3401	0,004132
hsa-miR-181a-5p	0,4621	(0.11, 0.82)	-2,1639	0,222009
hsa-miR-320b	1,1261	(0.67, 1.59)	1,1261	0,712629
hsa-miR-363-3p	0,621	(0.20, 1.04)	-1,6103	0,21008
hsa-miR-141-3p	0,4153	(0.15, 0.68)	-2,4079	0,00928
hsa-miR-188-3p	1,5344	(0.67, 2.40)	1,5344	0,039637
hsa-miR-92b-5p	0,6429	(0.29, 1.00)	-1,5555	0,169879
hsa-miR-221-3p	0,2673	(0.01, 0.52)	-3,7418	0,084847
hsa-miR-135b-5p	0,33	(0.03, 0.63)	-3,0298	0,119945
hsa-miR-1301-3p	3,1281	(0.37, 5.89)	3,1281	0,014646
hsa-miR-16-5p	0,1759	(0.00001, 0.39)	-5,6854	0,199186
hsa-miR-30c-5p	0,2315	(0.00, 0.46)	-4,3189	0,029495
hsa-miR-210-3p	0,9093	(0.62, 1.20)	-1,0997	0,440055
hsa-let-7f-2-3p	2,0263	(0.65, 3.41)	2,0263	0,021761
hsa-miR-504-5p	2,0817	(0.73, 3.44)	2,0817	0,01695
hsa-miR-1233-3p	0,643	(0.36, 0.93)	-1,5553	0,058856

Amniyotik sıvıdaki miRNA ekspresyon düzeyleri Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda 22 miRNA'nın downregüle, 23 miRNA'nın upregüle olduğu belirlendi (Şekil 4.6).

İstatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenen miRNA'lardan ekspresyon düzeyi artış gösterenler, hsa-miR-155-5p 1,97 kat ($p=0,016$), hsa-miR-629-5p 1,71kat ($p=0,027$), hsa-miR-23c 1,67 kat ($p=0,037$), hsa-miR-19b-2-5p 2,07 kat ($p=0,018$), hsa-miR-199b-3p 1,93 kat ($p=0,018$), hsa-miR-802 1,97 kat ($p=0,026$), hsa-miR-92a-2-5p 2,02 kat ($p=0,02$), hsa-miR-1298-5p 2,27 kat ($p=0,012$), hsa-miR-335-5p 2,31 kat ($p=0,004$), hsa-miR-374b-3p 2,14 kat ($p=0,015$), hsa-miR-125b-2-3p 2 kat ($p=0,007$), hsa-miR-124-5p 1,95 kat ($p=0,024$), hsa-miR-513a-3p 2,27kat ($p=0,012$), hsa-miR-133b 1,91kat ($p=0,007$), hsa-miR-188-3p 1,53 kat ($p=0,039$), hsa-miR-1301-3p 3,13 kat ($p=0,015$), hsa-let-7f-2-3p 2,03 kat ($p=0,022$), hsa-miR-504-5p 2,08 kat ($p=0,017$); azalış gösterenler ise, hsa-miR-141-3p -2,41 kat ($p=0,009$), hsa-miR-196b-5p 2,3401 kat ($p=0,004$) ve hsa-miR-30c-5p 4,32 kat ($p=0,029$) olarak tespit edildi (Tablo 4.11)(Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri

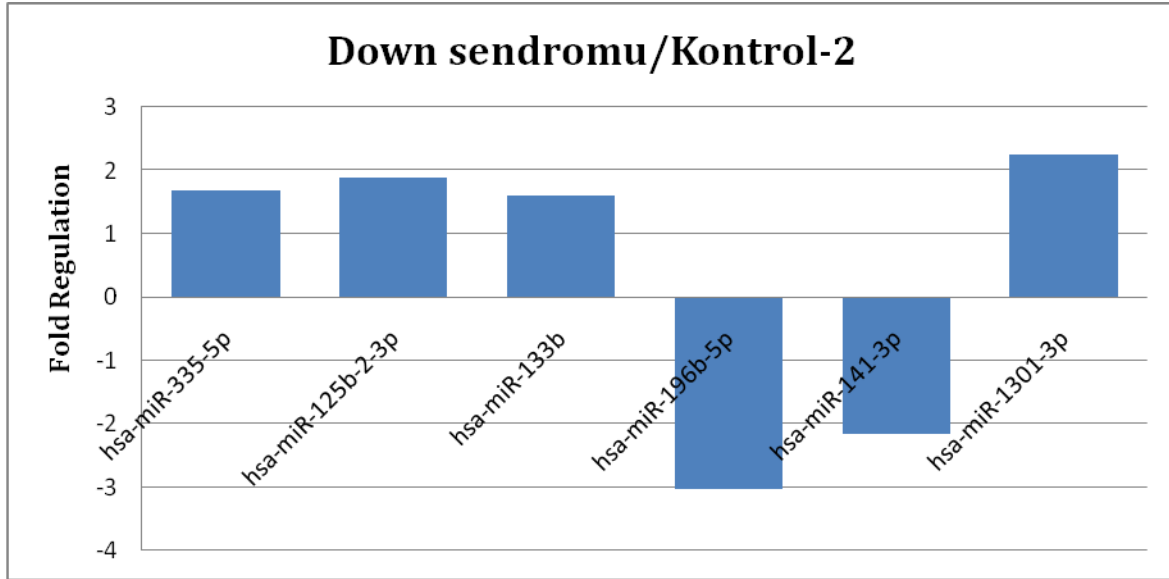


Şekil 4.7. Kontrol-2 grubuyla karşılaştırıldığında, hasta grubu amniyotik sıvısındaki ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişim olan miRNA'lar

Tablo 4.12. Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	DS		Klinefelter	Turner	Trizomi 18
	FR	P value	FR	FR	FR
hsa-miR-155-5p	1,4883	0,086756	5,0754	4,0618	1,2983
hsa-miR-126-3p	-1,5526	0,241098	-2,5021	-3,1266	2,0969
hsa-miR-629-5p	1,5533	0,080488	3,6651	2,9332	-2,1851
hsa-miR-23c	1,4791	0,133284	2,599	2,08	1,3766
hsa-miR-19b-2-5p	1,6653	0,07482	5,6789	4,5447	-1,4103
hsa-miR-320c	-1,3814	0,363464	-1,3749	-2,6205	1,4249
hsa-miR-199b-3p	1,7424	0,05834	4,0759	3,2619	-1,7106
hsa-miR-802	1,4727	0,136336	5,0221	4,0191	1,4995
hsa-miR-21-5p	-5,2511	0,061166	-44,3808	-153,9762	2,2883
hsa-miR-362-3p	-1,6861	0,120001	-1,2606	-1,476	-1,1502
hsa-miR-125a-5p	-4,1724	0,970082	-34,9	-45,2244	2,0656
hsa-miR-92a-2-5p	1,6279	0,082835	5,5514	4,4427	-1,4427
hsa-miR-1298-5p	1,825	0,053046	6,2235	4,9806	-1,2508
hsa-let-7c-5p	-1,9016	0,206943	-18,1142	-22,6347	1,4492
hsa-miR-223-3p	1,2058	0,650397	1,8723	2,4009	1,3493
hsa-miR-124-5p	1,5137	0,10679	5,1224	5,9859	-1,471
hsa-miR-335-5p	1,6861	0,036317	4,8917	5,9821	2,5051
hsa-miR-374b-3p	1,7196	0,06303	5,8643	4,6931	-1,3657
hsa-miR-125b-2-3p	1,8799	0,017687	4,0475	3,2392	-1,9787
hsa-miR-483-5p	-1,5531	0,995086	-4,1159	-6,8564	1,0828
hsa-miR-20a-5p	-4,5304	0,081565	-13,4567	-57,3951	2,2101
hsa-miR-10b-5p	-1,7939	0,435435	-5,7366	-7,1682	1,4277
hsa-miR-98-5p	-1,0064	0,247207	-3,0837	-3,8532	1,6649
hsa-miR-513a-3p	1,825	0,053046	6,2235	4,9806	-1,2869
hsa-miR-99a-5p	-1,91	0,67411	-14,1024	-17,6217	-1,071
hsa-miR-486-5p	-1,0853	0,800939	-1,6224	-2,2085	1,4582
hsa-miR-4732-5p	1,4139	0,120271	3,5066	2,6714	1,2188
hsa-miR-222-5p	1,5534	0,120052	4,1233	32,774	1,4345
hsa-miR-133b	1,6124	0,044755	3,4487	2,76	1,6095
hsa-miR-196b-5p	-3,0236	0,006976	-1,3165	-1,645	-1,3538
hsa-miR-181a-5p	-1,6585	0,669897	-4,8397	-7,9289	1,0088
hsa-miR-320b	1,0039	0,935148	1,7679	1,8202	-1,4103
hsa-miR-363-3p	-2,0795	0,185741	1,3175	1,0544	-1,5913
hsa-miR-141-3p	-2,1489	0,030362	-4,2826	-4,7698	1,0468
hsa-miR-188-3p	1,2591	0,146623	3,4542	2,7643	-1,2237
hsa-miR-92b-5p	-1,371	0,468184	-1,9857	-2,4812	-1,6425
hsa-miR-221-3p	-2,4943	0,372401	-16,8694	-17,5767	-1,0052
hsa-miR-135b-5p	-2,2771	0,318208	-9,7954	-14,046	1,6276
hsa-miR-1301-3p	2,2529	0,034347	9,0788	23,4585	-1,4619
hsa-miR-16-5p	-3,6888	0,662956	-22,8842	-56,5014	-1,1243
hsa-miR-30c-5p	-3,1355	0,128789	-21,5566	-11,2825	1,163
hsa-miR-210-3p	1,0158	0,856993	-1,1308	-2,1196	-1,3089
hsa-let-7f-2-3p	1,6402	0,08785	5,5001	4,4017	-1,4561
hsa-miR-504-5p	1,6927	0,069865	5,5996	4,4813	-1,4302
hsa-miR-1233-3p	-1,6948	0,091944	-1,2851	-1,6058	-1,1098

Farklı anomaliler içeren hasta alt grupları ile Kontrol-2 grubunun amniyotik sıvıdaki miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında (Tablo 4.12), Down sendromu grubunda hsa-miR-1301-3p'in 2,25 kat ($p=0,034$), hsa-miR-125b-2-3p'in 1,88 kat ($p=0,018$), hsa-miR-133b'in 1,61 kat ($p=0,045$) ve hsa-miR-335-5p'in 1,69 kat ($p=0,036$) ekspresyonunun arttığı saptanırken, hsa-miR-196b-5p'in 3,02 kat ($p=0,007$) ve hsa-miR-141-3p'in 2,15 kat ($p=0,03$) ekspresyon düzeyinin azaldığı bulundu (Şekil 4.8).

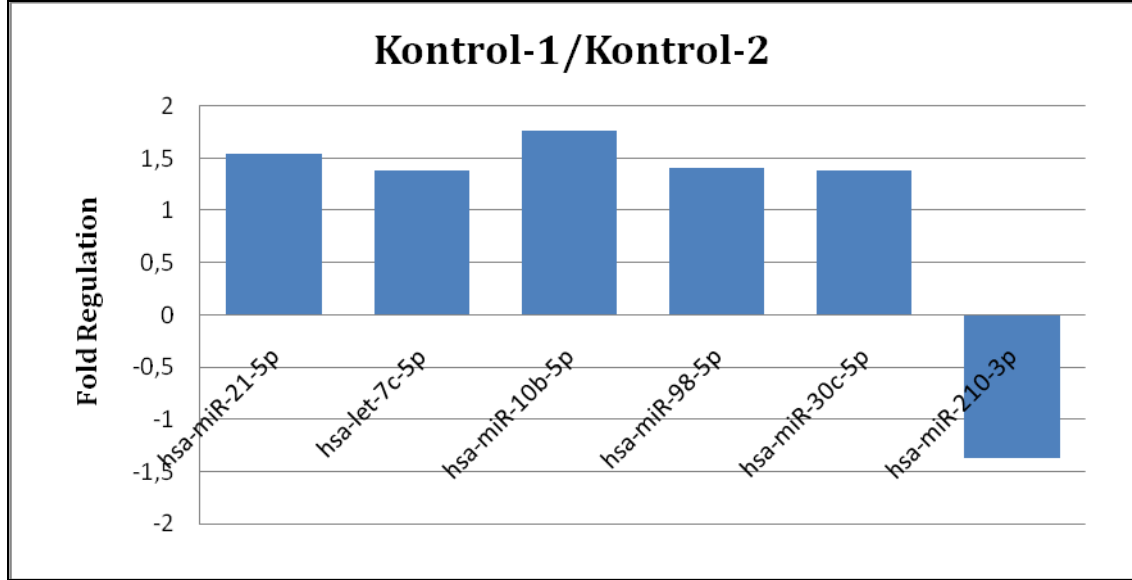


Şekil 4.8. Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında Down sendromu grubunun amniyotik sıvıdaki miRNA ekspresyon düzeyleri

Tablo 4.13. Kontrol-2 grubuna göre Kontrol-1 grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P value
hsa-miR-155-5p	1,1866	(0.70, 1.68)	1,1866	0,314908
hsa-miR-126-3p	1,4934	(0.47, 2.52)	1,4934	0,253351
hsa-miR-629-5p	1,0581	(0.63, 1.49)	1,0581	0,506459
hsa-miR-23c	1,5547	(0.94, 2.17)	1,5547	0,056464
hsa-miR-19b-2-5p	0,8193	(0.50, 1.14)	-1,2205	0,128556
hsa-miR-320c	1,1158	(0.66, 1.57)	1,1158	0,77161
hsa-miR-199b-3p	0,8338	(0.45, 1.22)	-1,1993	0,941493
hsa-miR-802	1,2295	(0.65, 1.80)	1,2295	0,510213
hsa-miR-21-5p	1,5392	(0.94, 2.13)	1,5392	0,021023
hsa-miR-362-3p	1,2046	(0.61, 1.80)	1,2046	0,591597
hsa-miR-125a-5p	1,406	(0.85, 1.97)	1,406	0,125597
hsa-miR-92a-2-5p	0,9313	(0.49, 1.37)	-1,0737	0,820902
hsa-miR-1298-5p	0,9359	(0.59, 1.28)	-1,0685	0,502822
hsa-let-7c-5p	1,3814	(0.97, 1.79)	1,3814	0,04092
hsa-miR-223-3p	0,9029	(0.41, 1.39)	-1,1076	0,766617
hsa-miR-124-5p	0,789	(0.43, 1.15)	-1,2674	0,270845
hsa-miR-335-5p	1,2963	(0.94, 1.65)	1,2963	0,077686
hsa-miR-374b-3p	0,8636	(0.55, 1.18)	-1,1579	0,206493
hsa-miR-125b-2-3p	0,7043	(0.49, 0.92)	-1,4199	0,137617
hsa-miR-483-5p	1,0691	(0.73, 1.41)	1,0691	0,966051
hsa-miR-20a-5p	1,158	(0.71, 1.61)	1,158	0,634168
hsa-miR-10b-5p	1,771	(1.13, 2.41)	1,771	0,009224
hsa-miR-98-5p	1,4137	(0.97, 1.85)	1,4137	0,040024
hsa-miR-513a-3p	0,8911	(0.57, 1.21)	-1,1221	0,313882
hsa-miR-99a-5p	1,1762	(0.74, 1.62)	1,1762	0,664609
hsa-miR-486-5p	0,8634	(0.45, 1.28)	-1,1582	0,601095
hsa-miR-4732-5p	1,1309	(0.64, 1.62)	1,1309	0,387348
hsa-miR-222-5p	0,8535	(0.38, 1.33)	-1,1717	0,505958
hsa-miR-133b	1,1219	(0.81, 1.43)	1,1219	0,38682
hsa-miR-196b-5p	1,2716	(0.64, 1.91)	1,2716	0,407362
hsa-miR-181a-5p	0,9124	(0.54, 1.29)	-1,0961	0,360019
hsa-miR-320b	0,8871	(0.60, 1.18)	-1,1273	0,304883
hsa-miR-363-3p	0,8425	(0.41, 1.27)	-1,1869	0,26868
hsa-miR-141-3p	1,0332	(0.42, 1.65)	1,0332	0,937219
hsa-miR-188-3p	0,9083	(0.51, 1.31)	-1,1009	0,782984
hsa-miR-92b-5p	1,2681	(0.56, 1.98)	1,2681	0,34241
hsa-miR-221-3p	1,0808	(0.72, 1.44)	1,0808	0,700572
hsa-miR-135b-5p	1,0878	(0.68, 1.49)	1,0878	0,756485
hsa-miR-1301-3p	1,0315	(0.63, 1.43)	1,0315	0,634624
hsa-miR-16-5p	1,1484	(0.77, 1.53)	1,1484	0,54314
hsa-miR-30c-5p	1,3843	(0.97, 1.80)	1,3843	0,049808
hsa-miR-210-3p	0,7295	(0.51, 0.95)	-1,3707	0,037891
hsa-let-7f-2-3p	0,9303	(0.56, 1.30)	-1,0749	0,407952
hsa-miR-504-5p	0,9761	(0.60, 1.36)	-1,0245	0,753197
hsa-miR-1233-3p	0,8906	(0.45, 1.33)	-1,1229	0,942804

Tablo 4.13’de amniyotik sıvıdaki Kontrol-2 grubuna göre Kontrol-1’deki miRNA ekspresyon düzeyleri verildi. Elde edilen bulgulara göre, upregüle olan miRNA’lar hsa-miR-21-5p (1,54 kat, p=0,02), hsa-let-7c-5p (1,38 kat, p=0,041), hsa-miR-10b-5p (1,77 kat, p=0,01), hsa-miR-98-5p (1,41 kat, p=0,04) ve hsa-miR-30c-5p (1,38 kat, p=0,049); downregüle olan miRNA ise hsa-miR-210-3p (1,37 kat, p=0,038) olarak belirlendi (Şekil 4.9).

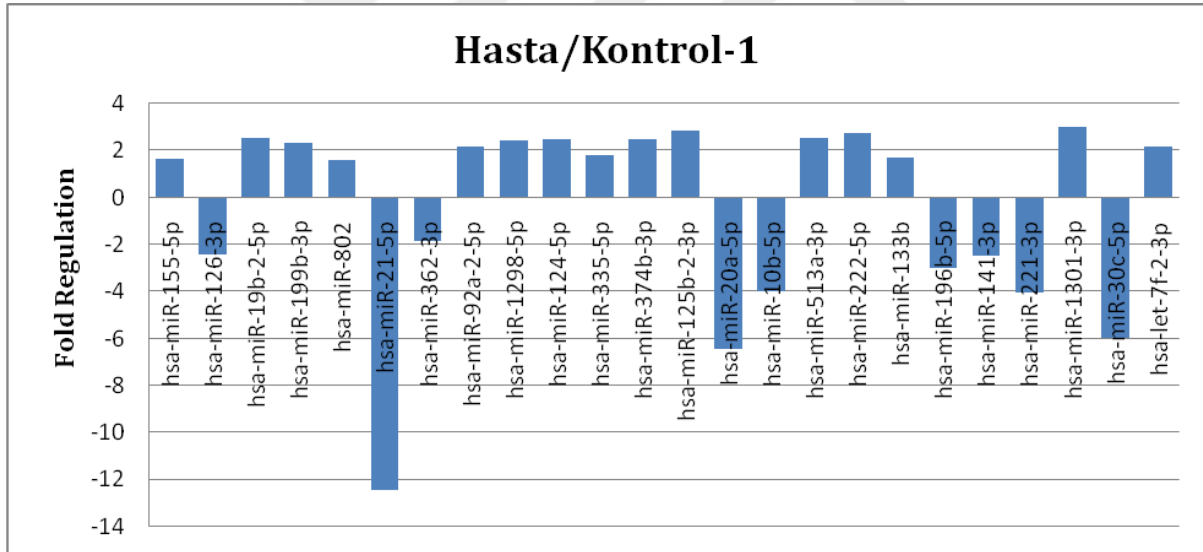


Şekil 4.9. Kontrol-1 grubundaki amniyotik sıvıda bulunan miRNA ekspresyon düzeyleri

Tablo 4.14. Amniyotik sıvı örneğindeki Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P value
hsa-miR-155-5p	1,6542	(0.59, 2.72)	1,6542	0,036022
hsa-miR-126-3p	0,4146	(0.15, 0.68)	-2,4121	0,009229
hsa-miR-629-5p	1,613	(0.73, 2.49)	1,613	0,058258
hsa-miR-23c	1,0688	(0.65, 1.49)	1,0688	0,624548
hsa-miR-19b-2-5p	2,525	(0.94, 4.11)	2,525	0,002678
hsa-miR-320c	0,6513	(0.33, 0.97)	-1,5354	0,122318
hsa-miR-199b-3p	2,3161	(1.03, 3.60)	2,3161	0,035026
hsa-miR-802	1,6002	(0.59, 2.61)	1,6002	0,040561
hsa-miR-21-5p	0,0805	(0.00001, 0.19)	-12,426	0,000919
hsa-miR-362-3p	0,5395	(0.31, 0.77)	-1,8537	0,012105
hsa-miR-125a-5p	0,1174	(0.00001, 0.29)	-8,5195	0,103447
hsa-miR-92a-2-5p	2,1714	(0.68, 3.67)	2,1714	0,030071
hsa-miR-1298-5p	2,4282	(0.90, 3.95)	2,4282	0,003262
hsa-let-7c-5p	0,2314	(0.00001, 0.50)	-4,3207	0,606394
hsa-miR-223-3p	1,5364	(0.78, 2.29)	1,5364	0,579137
hsa-miR-124-5p	2,4659	(0.80, 4.13)	2,4659	0,00408
hsa-miR-335-5p	1,7842	(0.79, 2.78)	1,7842	0,005573
hsa-miR-374b-3p	2,4737	(0.93, 4.02)	2,4737	0,002787
hsa-miR-125b-2-3p	2,8447	(1.46, 4.23)	2,8447	0,00087
hsa-miR-483-5p	0,4724	(0.12, 0.82)	-2,1169	0,334891
hsa-miR-20a-5p	0,1559	(0.00001, 0.34)	-6,4145	0,011969
hsa-miR-10b-5p	0,2499	(0.08, 0.42)	-4,0017	0,00089
hsa-miR-98-5p	0,5444	(0.19, 0.90)	-1,8369	0,40257
hsa-miR-513a-3p	2,5441	(0.95, 4.14)	2,5441	0,002623
hsa-miR-99a-5p	0,2782	(0.00001, 0.56)	-3,5951	0,392499
hsa-miR-486-5p	0,9773	(0.52, 1.44)	-1,0233	0,872556
hsa-miR-4732-5p	1,5149	(0.82, 2.21)	1,5149	0,165673
hsa-miR-222-5p	2,743	(0.24, 5.25)	2,743	0,04127
hsa-miR-133b	1,7059	(1.05, 2.36)	1,7059	0,008404
hsa-miR-196b-5p	0,3361	(0.15, 0.52)	-2,9757	0,00031
hsa-miR-181a-5p	0,5065	(0.14, 0.87)	-1,9742	0,453023
hsa-miR-320b	1,2695	(0.85, 1.69)	1,2695	0,069696
hsa-miR-363-3p	0,7371	(0.29, 1.18)	-1,3567	0,582738
hsa-miR-141-3p	0,402	(0.18, 0.62)	-2,4878	0,015564
hsa-miR-188-3p	1,6892	(0.66, 2.72)	1,6892	0,085952
hsa-miR-92b-5p	0,507	(0.22, 0.79)	-1,9725	0,102411
hsa-miR-221-3p	0,2473	(0.02, 0.48)	-4,0443	0,037646
hsa-miR-135b-5p	0,3034	(0.04, 0.57)	-3,296	0,062565
hsa-miR-1301-3p	3,0325	(0.51, 5.56)	3,0325	0,005719
hsa-miR-16-5p	0,1532	(0.00001, 0.34)	-6,5288	0,057522
hsa-miR-30c-5p	0,1673	(0.00, 0.33)	-5,9787	0,000292
hsa-miR-210-3p	1,2464	(0.92, 1.57)	1,2464	0,106044
hsa-let-7f-2-3p	2,1781	(0.82, 3.53)	2,1781	0,004821
hsa-miR-504-5p	2,1327	(0.81, 3.46)	2,1327	0,006222
hsa-miR-1233-3p	0,722	(0.38, 1.06)	-1,3851	0,135492

Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvıda bulunan miRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde 23 miRNA'nın upregüle ve 22 miRNA'nın downregüle olduğu bulundu (Tablo 4.14). Bu miRNA'lardan hsa-miR-155-5 (1,65 kat, $p=0,036022$), hsa-miR-19b-2-5p (2,52 kat, $p=0,003$), hsa-miR-199b-3p (2,32 kat, $p=0,035$), hsa-miR-802 (1,6 kat, $p=0,041$), hsa-miR-92a-2-5p (2,17 kat, $p=0,03$), hsa-miR-1298-5p (2,43 kat, $p=0,003$), hsa-miR-124-5p (2,47 kat, $p=0,004$), hsa-miR-335-5p (1,78 kat, $p=0,006$), hsa-miR-374b-3 (2,47 kat, $p=0,003$), hsa-miR-125b-2-3p (2,84 kat, $p=0,0009$), hsa-miR-513a-3p (2,54 kat, $p=0,003$), hsa-miR-222-5p (2,74 kat, $p=0,041$), hsa-miR-133b (1,71 kat, $p=0,008$), hsa-miR-1301-3p (3,03 kat, $p=0,006$), hsa-let-7f-2-3p (2,18 kat, $p=0,005$) ve hsa-miR-504-5p (2,13 kat, $p=0,006$) anlamlı düzeyde artış gösterirken, hsa-miR-126-3p (2,41 kat, $p=0,009$), hsa-miR-21-5p (12,43 kat, $p=0,0009$), hsa-miR-362-3p (1,85 kat, $p=0,012$), hsa-miR-20a-5p (6,41 kat, $p=0,012$), hsa-miR-10b-5p (4 kat, $p=0,0009$), hsa-miR-196b-5p (2,98 kat, $p=0,0003$), hsa-miR-141-3p (2,49 kat, $p=0,016$), hsa-miR-221-3p (4,04 kat, $p=0,038$) ve hsa-miR-30c-5p (5,98 kat, $p=0,0003$) ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığı bulundu (Şekil 4.10).

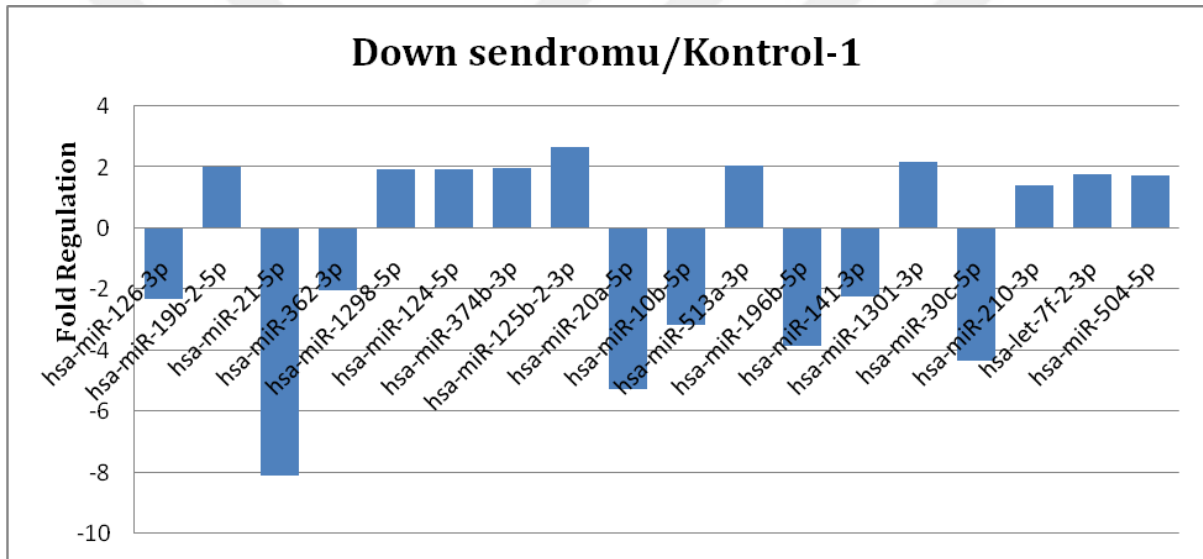


Şekil 4.10. Amniyotik sıvı örneğindeki kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri

Tablo 4.15. Amniyotik sıvı örneğindeki Kontrol-1 grubuna göre Down sendromu grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	DS		Klinefelter	Turner	Trizomi 18
	FR	P değeri	FR	FR	FR
hsa-miR-155-5p	1,2543	0,194463	4,2773	3,4231	1,0942
hsa-miR-126-3p	-2,3187	0,027864	-3,7367	-4,6692	1,4041
hsa-miR-629-5p	1,468	0,183792	3,4638	2,772	-2,3122
hsa-miR-23c	-1,0511	0,987856	1,6717	1,3378	-1,1294
hsa-miR-19b-2-5p	2,0325	0,015561	6,9312	5,5469	-1,1555
hsa-miR-320c	-1,5413	0,159596	-1,5341	-2,9239	1,277
hsa-miR-199b-3p	2,0897	0,129276	4,8884	3,9121	-1,4263
hsa-miR-802	1,1978	0,223776	4,0847	3,2689	1,2196
hsa-miR-21-5p	-8,0827	0,002508	-68,3121	-237,0044	1,4867
hsa-miR-362-3p	-2,0312	0,034867	-1,5186	-1,7781	-1,3855
hsa-miR-125a-5p	-5,8665	0,340531	-49,0701	-63,5865	1,4691
hsa-miR-92a-2-5p	1,7479	0,138241	5,9607	4,7702	-1,3436
hsa-miR-1298-5p	1,9499	0,019036	6,6497	5,3217	-1,1707
hsa-let-7c-5p	-2,627	0,691189	-25,0238	-31,2685	1,0491
hsa-miR-223-3p	1,3356	0,966451	2,0737	2,6592	1,4944
hsa-miR-124-5p	1,9185	0,024845	6,4922	7,5866	-1,1606
hsa-miR-335-5p	1,3007	0,069601	3,7736	4,6147	1,9325
hsa-miR-374b-3p	1,9912	0,016128	6,7904	5,4343	-1,1794
hsa-miR-125b-2-3p	2,6692	0,003049	5,747	4,5992	-1,3936
hsa-miR-483-5p	-1,6604	0,984821	-4,4005	-7,3304	1,0128
hsa-miR-20a-5p	-5,2463	0,014649	-15,5829	-66,4636	1,9086
hsa-miR-10b-5p	-3,1769	0,010101	-10,1593	-12,6946	-1,2405
hsa-miR-98-5p	-1,4227	0,959644	-4,3594	-5,4473	1,1777
hsa-miR-513a-3p	2,0479	0,015265	6,9837	5,589	-1,1468
hsa-miR-99a-5p	-2,2466	0,807253	-16,5872	-20,7266	-1,2597
hsa-miR-486-5p	1,0671	0,854792	-1,4008	-1,9069	1,6888
hsa-miR-4732-5p	1,2502	0,687041	3,1007	2,3622	1,0778
hsa-miR-222-5p	1,8201	0,056356	4,8311	38,4003	1,6808
hsa-miR-133b	1,4372	0,063003	3,074	2,4601	1,4346
hsa-miR-196b-5p	-3,8449	0,000937	-1,6741	-2,0919	-1,7216
hsa-miR-181a-5p	-1,5132	0,874897	-4,4155	-7,234	1,1057
hsa-miR-320b	1,1316	0,291479	1,9929	2,0519	-1,2511
hsa-miR-363-3p	-1,752	0,309278	1,5638	1,2515	-1,3406
hsa-miR-141-3p	-2,2202	0,045362	-4,4247	-4,9281	1,0132
hsa-miR-188-3p	1,3862	0,287906	3,8028	3,0433	-1,1115
hsa-miR-92b-5p	-1,7386	0,260688	-2,518	-3,1464	-2,0828
hsa-miR-221-3p	-2,6959	0,236943	-18,2332	-18,9977	-1,0865
hsa-miR-135b-5p	-2,4771	0,210974	-10,6559	-15,2799	1,4962
hsa-miR-1301-3p	2,1841	0,014264	8,8012	22,7414	-1,508
hsa-miR-16-5p	-4,2361	0,364701	-26,2792	-64,8837	-1,2911
hsa-miR-30c-5p	-4,3405	0,004221	-29,8409	-15,6185	-1,1903
hsa-miR-210-3p	1,3924	0,030555	1,2122	-1,5463	1,0473
hsa-let-7f-2-3p	1,7631	0,026809	5,9123	4,7316	-1,3546
hsa-miR-504-5p	1,7342	0,034113	5,7369	4,5912	-1,396
hsa-miR-1233-3p	-1,5093	0,182997	-1,1445	-1,4301	1,0118

Amniyotik sıvı örneklerinde Kontrol-1 grubuna karşı başta Down sendromu olmak üzere hasta alt gruplarına ait miRNA'ların ekspresyon düzeyleri Tablo 4.15'te verildi. Down sendromu hasta alt grubunda, hsa-miR-19b-2-5p 2,03 kat ($p=0,016$), hsa-miR-1298-5p 1,95 kat ($p=0,019$), hsa-miR-124-5p 1,92 kat ($p=0,025$), hsa-miR-374b-3p 1,99 kat ($p=0,016$), hsa-miR-125b-2-3p 2,67 kat ($p=0,003$), hsa-miR-513a-3p 2,05 kat ($p=0,015$), hsa-miR-1301-3p 2,18 kat ($p=0,014$), hsa-miR-210-3p 1,39 kat ($p=0,031$), hsa-let-7f-2-3p 1,76 kat ($p=0,027$) ve hsa-miR-504-5p 1,73 kat ($p=0,034$) ekspresyonunun arttığı, hsa-miR-126-3p 2,32 ($p=0,028$), hsa-miR-21-5p 8,08 kat ($p=0,0025$), hsa-miR-362-3p 2,03 kat ($p=0,035$), hsa-miR-20a-5p 5,25 kat ($p=0,015$), hsa-miR-10b-5p 3,18 kat ($p=0,01$), hsa-miR-196b-5p 3,85 kat ($p=0,0009$), hsa-miR-141-3p 2,22 kat ($p=0,045$) ve hsa-miR-30c-5p 4,34 kat ($p=0,004$) ekspresyonunun azalmış olduğu saptandı (Şekil 4.11).

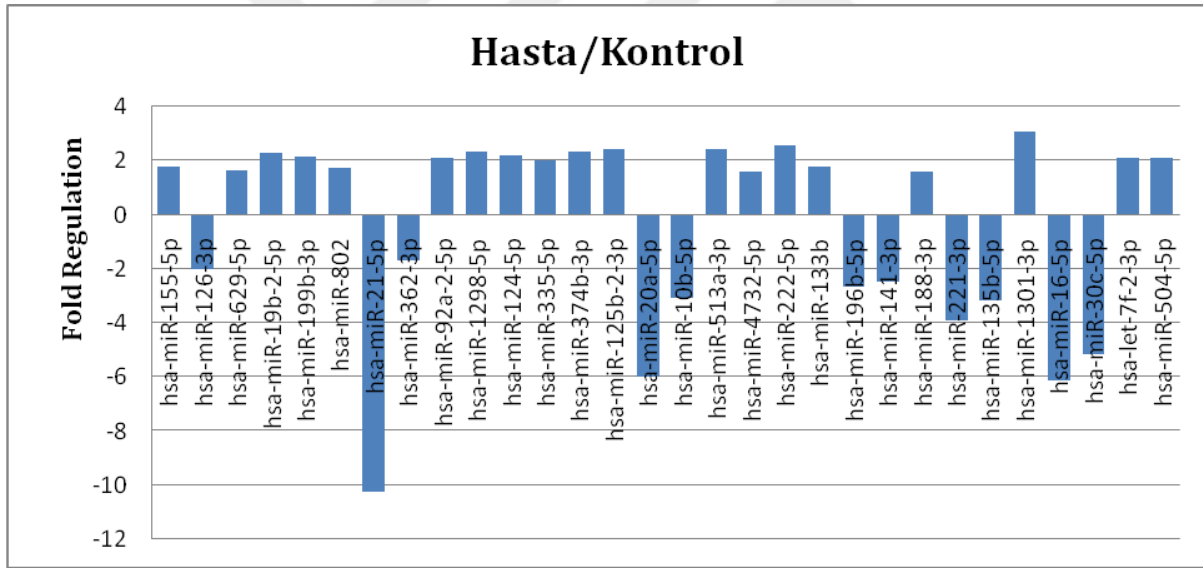


Şekil 4.11. Amniyotik sıvı örneğindeki Kontrol-1 grubuna göre Down sendromu grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri

Tablo 4.16. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	95% CI	Fold Regulation	P value
hsa-miR-155-5p	1,786	(0.70, 2.87)	1,786	0,002587
hsa-miR-126-3p	0,4962	(0.22, 0.77)	-2,0152	0,026481
hsa-miR-629-5p	1,6544	(0.84, 2.47)	1,6544	0,007486
hsa-miR-23c	1,3026	(0.81, 1.79)	1,3026	0,157663
hsa-miR-19b-2-5p	2,3092	(0.87, 3.75)	2,3092	0,000188
hsa-miR-320c	0,6841	(0.37, 1.00)	-1,4618	0,145459
hsa-miR-199b-3p	2,1349	(1.10, 3.17)	2,1349	0,005021
hsa-miR-802	1,7554	(0.68, 2.83)	1,7554	0,004587
hsa-miR-21-5p	0,0976	(0.00001, 0.23)	-10,2416	0,002643
hsa-miR-362-3p	0,5864	(0.35, 0.83)	-1,7052	0,016933
hsa-miR-125a-5p	0,1367	(0.00001, 0.33)	-7,3126	0,164279
hsa-miR-92a-2-5p	2,1033	(0.76, 3.45)	2,1033	0,00336
hsa-miR-1298-5p	2,3572	(0.90, 3.82)	2,3572	0,00015
hsa-let-7c-5p	0,2675	(0.00001, 0.58)	-3,738	0,937567
hsa-miR-223-3p	1,4676	(0.92, 2.01)	1,4676	0,393848
hsa-miR-124-5p	2,2174	(0.76, 3.68)	2,2174	0,000429
hsa-miR-335-5p	2,0043	(0.91, 3.10)	2,0043	0,000095
hsa-miR-374b-3p	2,3163	(0.88, 3.75)	2,3163	0,000156
hsa-miR-125b-2-3p	2,4311	(1.31, 3.55)	2,4311	0,000037
hsa-miR-483-5p	0,4868	(0.12, 0.85)	-2,0544	0,24733
hsa-miR-20a-5p	0,1665	(0.00001, 0.36)	-6,0063	0,009669
hsa-miR-10b-5p	0,3229	(0.10, 0.55)	-3,0973	0,00566
hsa-miR-98-5p	0,6358	(0.23, 1.04)	-1,5728	0,748298
hsa-miR-513a-3p	2,416	(0.92, 3.91)	2,416	0,000123
hsa-miR-99a-5p	0,2991	(0.00001, 0.61)	-3,3428	0,381431
hsa-miR-486-5p	0,915	(0.53, 1.30)	-1,0929	0,660815
hsa-miR-4732-5p	1,6008	(0.97, 2.23)	1,6008	0,037091
hsa-miR-222-5p	2,5549	(0.29, 4.82)	2,5549	0,007186
hsa-miR-133b	1,7961	(1.14, 2.45)	1,7961	0,000305
hsa-miR-196b-5p	0,3743	(0.18, 0.57)	-2,6718	0,000361
hsa-miR-181a-5p	0,4861	(0.14, 0.83)	-2,0571	0,226676
hsa-miR-320b	1,2031	(0.81, 1.60)	1,2031	0,259091
hsa-miR-363-3p	0,6826	(0.28, 1.08)	-1,4651	0,313133
hsa-miR-141-3p	0,4079	(0.20, 0.62)	-2,4517	0,008222
hsa-miR-188-3p	1,618	(0.73, 2.50)	1,618	0,01777
hsa-miR-92b-5p	0,5639	(0.29, 0.84)	-1,7733	0,117532
hsa-miR-221-3p	0,256	(0.02, 0.49)	-3,9058	0,017739
hsa-miR-135b-5p	0,3151	(0.04, 0.59)	-3,1739	0,033403
hsa-miR-1301-3p	3,075	(0.51, 5.64)	3,075	0,00024
hsa-miR-16-5p	0,163	(0.00001, 0.36)	-6,1363	0,043287
hsa-miR-30c-5p	0,1935	(0.01, 0.38)	-5,1677	0,000587
hsa-miR-210-3p	1,0821	(0.81, 1.35)	1,0821	0,781761
hsa-let-7f-2-3p	2,1087	(0.81, 3.41)	2,1087	0,000404
hsa-miR-504-5p	2,1097	(0.84, 3.38)	2,1097	0,000378
hsa-miR-1233-3p	0,6854	(0.42, 0.95)	-1,459	0,085158

Çalışmaya dahil edilen iki kontrol grubuna karşılık hasta grubunun amniyotik sıvı örneklerindeki miRNA ekspresyon düzeylerinin analizi sonucu elde edilen verilere göre 23 miRNA'nın upregüle, 22 miRNA'nın downregüle olduğu saptandı (Tablo 4.16). Bu miRNA'lardan Şekil 4.12'de gösterildiği gibi hsa-miR-155-5p, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-802, hsa-miR-92a-2-5p, hsa-miR-1298-5p, hsa-miR-124-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-374b-3p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-4732-5p, hsa-miR-222-5p, hsa-miR-133b, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-1301-3p, hsa-let-7f-2-3p ve hsa-miR-504-5p'nin ekspresyon düzeylerinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). Bununla birlikte kontrol grubuna karşı hasta grubunda hsa-miR-126-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-16-5p ve hsa-miR-30c-5p'nin ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu ve bu azalma oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4.12).

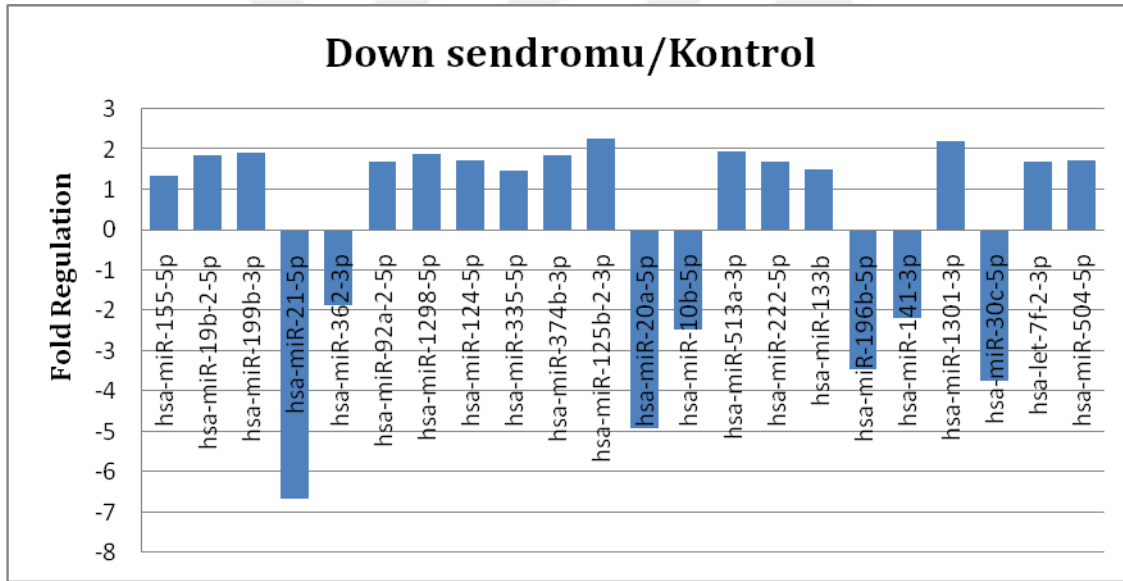


Şekil 4.12. Amniyotik sıvı örneğindeki iki kontrol grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri

Tablo 4.17. Kontrol-1 ve Kontrol-2 grubuna göre hasta grubundaki farklı anomalilerdeki amniyotik sıvı miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	DS		Klinefelter	Turner	Trizomi 18
	FR	P değeri	FR	FR	FR
hsa-miR-155-5p	1,3543	0,049082	4,6183	3,6959	1,1814
hsa-miR-126-3p	-1,9371	0,065195	-3,1218	-3,9009	1,6806
hsa-miR-629-5p	1,5057	0,054148	3,5526	2,8431	-2,2543
hsa-miR-23c	1,1595	0,45363	2,0374	1,6305	1,0791
hsa-miR-19b-2-5p	1,8588	0,003437	6,3388	5,0729	-1,2635
hsa-miR-320c	-1,4675	0,199522	-1,4606	-2,7838	1,3413
hsa-miR-199b-3p	1,9262	0,042832	4,5059	3,606	-1,5474
hsa-miR-802	1,314	0,08064	4,4811	3,5862	1,3379
hsa-miR-21-5p	-6,6618	0,007901	-56,3033	-195,3409	1,8038
hsa-miR-362-3p	-1,8685	0,043713	-1,397	-1,6357	-1,2746
hsa-miR-125a-5p	-5,0354	0,547216	-42,1188	-54,5788	1,7116
hsa-miR-92a-2-5p	1,693	0,042746	5,7736	4,6205	-1,3871
hsa-miR-1298-5p	1,8929	0,002814	6,4551	5,166	-1,2059
hsa-let-7c-5p	-2,2727	0,298425	-21,6493	-27,052	1,2126
hsa-miR-223-3p	1,2758	0,850907	1,9809	2,5401	1,4275
hsa-miR-124-5p	1,7251	0,009442	5,8379	6,822	-1,2907
hsa-miR-335-5p	1,4612	0,00727	4,2391	5,1841	2,1709
hsa-miR-374b-3p	1,8645	0,002848	6,3584	5,0886	-1,2596
hsa-miR-125b-2-3p	2,2811	0,000297	4,9112	3,9304	-1,6307
hsa-miR-483-5p	-1,6114	0,993463	-4,2706	-7,114	1,0436
hsa-miR-20a-5p	-4,9124	0,018885	-14,5911	-62,2335	2,0383
hsa-miR-10b-5p	-2,4589	0,049509	-7,8632	-9,8254	1,0416
hsa-miR-98-5p	-1,2182	0,483792	-3,7327	-4,6642	1,3754
hsa-miR-513a-3p	1,9448	0,002284	6,6321	5,3076	-1,2076
hsa-miR-99a-5p	-2,089	0,672911	-15,4234	-19,2723	-1,1713
hsa-miR-486-5p	-1,0009	0,97818	-1,4961	-2,0367	1,5812
hsa-miR-4732-5p	1,3211	0,382421	3,2765	2,4961	1,1388
hsa-miR-222-5p	1,6953	0,015078	4,4999	35,7677	1,5655
hsa-miR-133b	1,5133	0,009344	3,2367	2,5903	1,5106
hsa-miR-196b-5p	-3,4522	0,000955	-1,5031	-1,8782	-1,5457
hsa-miR-181a-5p	-1,5767	0,867609	-4,6009	-7,5376	1,0612
hsa-miR-320b	1,0725	0,677772	1,8887	1,9446	-1,3201
hsa-miR-363-3p	-1,8919	0,218073	1,4481	1,1589	-1,4477
hsa-miR-141-3p	-2,1879	0,029138	-4,3604	-4,8565	1,0281
hsa-miR-188-3p	1,3277	0,133119	3,6423	2,9149	-1,1604
hsa-miR-92b-5p	-1,563	0,313502	-2,2637	-2,8286	-1,8725
hsa-miR-221-3p	-2,6036	0,202698	-17,6087	-18,347	-1,0493
hsa-miR-135b-5p	-2,3853	0,174129	-10,2612	-14,7139	1,5537
hsa-miR-1301-3p	2,2147	0,001212	8,9246	23,0601	-1,4871
hsa-miR-16-5p	-3,9814	0,400292	-24,6991	-60,9824	-1,2134
hsa-miR-30c-5p	-3,7517	0,011043	-25,793	-13,4998	-1,0288
hsa-miR-210-3p	1,2089	0,398633	1,0524	-1,7811	-1,0999
hsa-let-7f-2-3p	1,7069	0,006872	5,7239	4,5807	-1,3992
hsa-miR-504-5p	1,7155	0,006411	5,6749	4,5416	-1,4113
hsa-miR-1233-3p	-1,5898	0,124217	-1,2055	-1,5064	-1,041

Amniyotik sıvı örneklerinde farklı anomalili fetus taşıyan gebelerin dahil edildiği hasta alt gruplarının kontrol grubuna göre miRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde özellikle Down sendromu hasta alt grubunda hsa-miR-155-5p (1,35 kat, $p=0,049$), hsa-miR-19b-2-5p (1,86 kat, $p=0,0034$), hsa-miR-199b-3p (1,92 kat, $p=0,043$), hsa-miR-92a-2-5p (1,69 kat, $p=0,043$), hsa-miR-1298-5p (1,89 kat, $p=0,0028$), hsa-miR-124-5p (1,73 kat, $p=0,0094$), hsa-miR-335-5p (1,46 kat, $p=0,007$), hsa-miR-374b-3p (1,87 kat, $p=0,0028$), hsa-miR-125b-2-3p (2,28 kat, $p=0,0003$), hsa-miR-513a-3p (1,95 kat, $p=0,0023$), hsa-miR-222-5p (1,69 kat, $p=0,015$), hsa-miR-133b (1,51 kat, $p=0,009$), hsa-miR-1301-3p (2,21 kat, $p=0,0012$), hsa-let-7f-2-3p (1,71 kat, $p=0,007$) ve hsa-miR-504-5p'nin (1,72 kat, $p=0,006$) upregüle olduğu saptandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Down sendromu hasta alt grubunda hsa-miR-30c-5p (3,75 kat, $p=0,011$), hsa-miR-20a-5p (4,91 kat, $p=0,019$), hsa-miR-10b-5p (2,46 kat, $p=0,049$), hsa-miR-196b-5p (3,45 kat, $p=0,0009$), hsa-miR-141-3p (2,19 kat, $p=0,029$), hsa-miR-21-5p (6,66 kat, $p=0,0079$) ve hsa-miR-362-3p'nin (1,87 kat, $p=0,043$) downregüle olduğu bulundu (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Amniyotik sıvı örneğindeki iki kontrol grubuna göre Down sendromu grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri

4.2.3. Plazma ve amniyotik sıvı örneğindeki miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiye ait bulgular

Plazma örneklerinde, Down sendromu hasta alt grubunda ekspresyon düzeyleri anlamlı artış göstermiş olan, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-320c, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-4732-5p ve hsa-miR-181a-5p'nin amniyotik sıvı örneklerindeki ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi.

Plazma ve amniyotik sıvı örneklerinde eksprese olan ve aralarında anlamlı ilişki bulunan miRNA'lar;

- ✓ hsa-miR-629-5p (R=-0,900 ; p= 0,037),
- ✓ hsa-miR-320c (R=-0,738 ; p= 0,037),
- ✓ hsa-miR-486-5p (R=-0,829 ; p= 0,042)

TARTIŞMA

Prenatal ve postnatal morbidite ve mortalite ile mental retardasyonun başlıca genetik nedeni olan kromozomal anöploidinin dünya genelinde en sık görüleni Down sendromudur [169]. Prenatal tanıda invaziv yöntemlerin fetal kayıp riskini arttırmasından dolayı, yüksek düzeyde duyarlılık ve ihmal edilebilir yanlış pozitif oranına sahip noninvaziv anöploidi tarama testlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, maternal periferik kanda fetal nükleik asitlerin varlığının gösterilmesi, noninvaziv prenatal tanı (NIPT) alanında büyük ilgi uyandırmaktadır. Memelilerde miRNA'ların tüm protein kodlayıcı genlerin % 50'sinin aktivitesini kontrol etmesi ve çeşitli biyolojik ve patolojik süreçlerde temel bir rol oynadığının gösterilmesi ve bununla birlikte kanda oldukça stabil olması, miRNA'ları noninvaziv tanı amaçlı kullanılması için ideal bir aday haline getirmektedir [170]. Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada, konjenital anomalilerin prenatal tanısında bir belirteç olarak değerlendirilebilecek miRNA'ların belirlenmesi ve bu miRNA'ların maternal plazmadaki düzeylerinin noninvaziv bir yöntem olarak kullanılabilirliğinin saptanması amaçlandı. Çalışmada, hasta grubuna dahil edilen tüm örneklerin kromozom anomalili fetus taşıyan gebelerden elde edilmesinden dolayı, veriler en sık görülen konjenital anomalilerden olan kromozomal anomaliler çerçevesinde incelendi. Noninvaziv tanı amaçlı kullanılacak miRNA'ların belirlenmesinde, örneklem büyüklüğü nedeni ile istatistiksel olarak değerlendirilebilen hasta grubu Down sendromlu fetus taşıyan gebelerden oluşturuldu.

Maternal kanda nükleik asitlerin kullanımının, mevcut olan noninvaziv yöntemlerden daha kolay ve daha az karmaşık bir prosedüre sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir [171]. Pettit ve ark., [172] ileri maternal yaşı ile ilişkili yapılan amniyosentez ve rutin koryon villus örnekleme yerine, dolaşımdaki serbest fetal DNA'nın noninvaziv prenatal bir test olarak kullanılabilirliğinin etkisini değerlendirmiştir. Bu çalışma sonucunda ileri maternal yaşa sahip olan gebelerin, maternal kanda fetal DNA kullanarak yapılan noninvaziv yöntemi tercih ettikleri gösterilmiştir. Bu tercih ile bağlantılı olarak, maternal kandaki fetal DNA üzerine yapılan çalışmalar artış göstermiş ve özellikle 2010 yılından sonra yayınlanmaya başlanmıştır [107, 173]. Bununla birlikte, miRNA'lar da fetal DNA çalışmalarına paralel olarak dikkat çekmiştir ve maternal plazmada plasental miRNA'ların keşfi ile de noninvaziv tanıda kullanılacak bir biyobelirteç olarak önerilmeye başlanışlardır [21, 174]. Bu konu ile ilgili ilk çalışma Go ve ark. tarafından 2008 yılında rapor edilmiştir ve trizomi 21 ile ilişkili plasental RNA'yı temsil eden sinsityotrofoblast RNA ürünlerinin taramasının yapıldığı in vitro bir yöntem tarif edilmiştir [175].

Gebelikle ilişkili miRNA'ların ekspresyon düzeyleri ile ilgili çalışmalar sıklıkla preeklampsi üzerine olmakla birlikte fetal konjenital kalp defektleri, nöral tüp defektleri, fetal büyüme ve trizomi 21 arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar da mevcuttur. Buna karşın noninvaziv prenatal testlerde miRNA'ların kullanımına ilişkin mevcut veriler literatürde yetersizdir [21,164,170,176-178].

Kuhn ve arkadaşları [179], DS'li bireylerden alınan fetal hipokampus ve kalp örneklerinde, kromozom 21 türevli genler tarafından kodlanan olgun miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 ve miR-802'nin, yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, miRNA ekspresyon profili, RT-PCR ve in situ hibridizasyon deneyleri ile gösterilmiştir. Yaptıkları çalışmada, araştırmacılar, trizomi 21 ile indüklenen kromozom 21 türevli miRNA'ların artan ekspresyonunun, spesifik hedef proteinlerin ekspresyonunun azalmasıyla sonuçlanabileceğini ve nöronal ve kardiyak DS fenotipinin özelliklerine katkıda bulunacağını öne sürmüşlerdir. Bu hipotez daha sonra, aynı grup tarafından, kromozom 21 türevli miRNA / mRNA hedef çiftlerini tanımlayan deneyler ile doğrulanmış ve miR-155 ve miR-802'nin metil-CpG bağlayıcı proteinin (MeCP2) ifadesini düzenleyebileceği ve hatta DS'li beyin örneklerinde bu proteinin ekspresyonunun düşük olduğu gösterilmiştir. DS'li bireylerin beyinlerinde gözlenen nörokimyasal anormalliğe de, proteinin ekspresyon düzeylerindeki bu azalmanın katkıda bulunabileceği, çalışma sonucu olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, mir-99a, let-7c ve miR-125b-2'nin, C21orf34 geninin intronunda kodlanan bölgede yer aldığı ve q21.1'in başlangıcında yer alan bu gen tarafından kodlanan bir proteinin karakterize edilmediği de bildirilmiştir [179].

Elton ve arkadaşları [180] tarafından da benzer şekilde, özellikle beyin ve kalp başta olmak üzere DS ile ilişkili dokularda, kromozom 21 türevli let-7c, miR-99a ve miR-125b-2'nin yüksek düzeyde ekspresyonu bildirilmiştir.

Down sendromuyla ilişkili olduğu savunulan kromozom 21 türevli miRNA'ların (miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 ve miR-802) konsantrasyonları ve ekspresyon profillerinin belirlenmesi üzerine yapılan başka bir çalışma da Kotlabova ve arkadaşları [181] tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacı, öploidili ve DS'li fetus taşıyan gebelerde, kromozom 21 türevli bu beş miRNA'nın noninvaziv olarak ayırt etme yeteneklerini doğrulamak olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda çalışmaya, DS'li fetus taşıma riski olan 12 gebe, 12 normal gebe ve 10 gebe olmayan kadın dahil edilmiş ve kromozom 21 türevli beş miRNA'nın ekspresyon düzeyleri real time PCR kullanılarak değerlendirilmiştir. Stimülasyon deneyleri için gebe olmayan sağlıklı kadınlardan ve anöploid amniyotik sıvı örneklerinden RNA havuzu oluşturulmuş ve DS için spesifik olan yüksek düzeyde eksprese edilmiş kromozom 21 türevli miRNA'ların tespit sınırını belirlemek amacıyla 1: 1 ila 1000:1 arasında değişen seyreltme oranı kullanılmıştır. Aynı grup çalışmalarının başlangıcında, plasental dokularda tüm kromozom 21

türevli miRNA'ların varlığını doğruladıktan sonra, gebe ve gebe olmayan kadınlarda let-7c, miR-99a, miR-125b-2 ve miR-155 gibi ekstrasellüler kromozom 21 türevli miRNA'ların dolaşımdaki düzeyleri de rapor etmişlerdir. Gebe olmayan kadınlara göre miR-99a ve miR-125b-2'nin plazma konsantrasyonlarının ve miR-99a, miR-125b-2 ve miR-155 ekspresyon düzeylerinin gebe kadınlarda anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Öte yandan, ekstrasellüler let-7c'nin konsantrasyon ve ekspresyon seviyesinin değişmediği saptanmış ve bunun sonucu olarak da let-7c'nin hamilelikten bağımsız olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, normal gebeliği olan kadınlara kıyasla, riskli grup gebelerde ekstrasellüler kromozom 21 türevli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir. Ancak, aynı çalışmada, riskli gebeliğinden dolayı çalışmaya dahil edilen gebelerin tanı testleri sonrasında, DS tanımlanan gebelik sayısı beş olduğundan elde edilen verilerden doğru bir sonuca ulaşmak oldukça zordur. Dahil edilme kriterlerimize göre hasta grubu olarak belirlediğimiz ve tanı alan 10 DS'li fetus taşıyan gebenin dahil edildiği çalışmamızda bu beş miRNA'dan sadece let-7c'nin ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,02$ FR=1,56).

Ertürk ve arkadaşları [171] tarafından yapılan çalışmada, DS'li fetus taşıyan ve taşımayan gebelerin maternal plazmasındaki kromozom 21 türevli 14 miRNA'nın ekspresyon düzeyinin karşılaştırması yapılmıştır. 14 miRNA'dan, miR-99a ve miR-3156'nın ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir.

Kromozom 21 türevli bu beş miRNA'nın (hsa-miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 ve miR-802) DS'nin değişken fenotipleri ile ilişkili olabileceği gösterilmekle birlikte, DS'li fetusların genom çapında miRNA ifadesinde yer alan değişiklikler henüz tam olarak belirlenmemiştir [182]. Sayısal kromozom anomalisi içerisinde yer alan DS ile kromozom 21'den eksprese edilen miRNA'lar arasındaki ilişkiyi tanımlama adına yapılan çalışmalardan ziyade, miRNA'ların birden fazla geni regüle ettiği ve birden fazla miRNA'nın aynı geni regüle edebilmesinden dolayı, sadece kromozom 21'de lokalize olanların değil, tüm miRNA'ların araştırılması önerilmiştir [183]. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada, noninvasiv bir yöntem olarak kullanılacak miRNA'ları belirler iken sadece plesantal kökenli ya da kromozom 21 türevli miRNA'ların bulunduğu bir panel ile sınırlı kalınmadı. Bu miRNA'ların da dahil edildiği ancak bununla birlikte kromozomal anomaliler ile ilişkili olabileceği düşünülen ve farklı kromozomlarda lokalize olan miRNA'lar da analize dahil edildi.

Kamhieh-Milz ve arkadaşlarının [170] yüksek verimli kantitatif PCR (HT-qPCR) kullanarak yaptıkları çalışmada, yedi DS'li fetus taşıyan gebe ile fetal cinsiyet eşleştirmesi yapılarak belirlenen kontrol grubunda, maternal plazmada 1043 miRNA düzeyi analiz edilmiştir. Altı yüz doksan beş miRNA tanımlanmış, bunlardan otuz altısının (hsa-mir-512-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-888-3p, hsa-mir-3676-3p, hsa-mir-3918, hsa-mir-500a-5p, hsa-mir-30c-5p, hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-627, hsa-mir-5893p, hsa-mir-181a-3p, hsa-mir-362-5p, hsa-

mir-518c-5p, hsa-mir-3667-5p, hsa-mir-195-3p, hsa-mir-124-5p, hsa-mir-498, hsa-mir-18b-3p, hsa-mir-1249, hsa-mir-93-5p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-4328, hsa-mir-92a-3p, hsa-mir-92b-3p, hsa-mir-3652, hsa-mir-25-3p, hsa-mir-623, hsa-mir-3195, hsa-mir-423-5p, hsa-mir-27b-3p, hsa-mir-3135a, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-3180-5p, hsa-mir-629-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-3907) ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur. Bu 36 olgun miRNA'nın yolak analizleri yapılmış ve DS patolojileri ile ilişkili olan yollar tanımlanmıştır. Analizi gerçekleştirilen miRNA'ların, musin-tip-O-glikanlar (β -HCG ile ilişkili), ECM-reseptör etkileşimleri, TGF-beta sinyal yolağı ve endositoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Musin tipindeki O-glikanın hsa-mir-498, hsa-mir-30c-5p, hsa-mir-629-5p ve hsa-mir-195-3p ile yakından ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Bu veriler sonucunda araştırmacılar tarafından, miRNA'ların, DS'nin noninvasiv taraması için güvenilir, düşük maliyetli bir tanı aracı olabilecek ümit verici ve stabil biyobelirteç olabilecekleri önerilmiştir [170]. Çalışmamızda, bu miRNA'lardan miR-629-5p'nin (FR=2,01; p= 0,001), miR-486-5p'nin (FR=1,43; p= 0,04) ve hsa-miR-181a-5p (FR=1,61; p= 0,044) kontrol grubuna göre DS'li fetus taşıyan gebelerin plazmalarında upregüle olduğu tespit edildi.

Down sendromlu fetuslerin gelişimi sırasında miRNA'ların ekspresyon karakteristiğini araştırmak ve kromozom 21'de daha önceki çalışmalarda belirlenen miRNA'ların dışında farklı miRNA genlerinin bulunup bulunmadığını belirlemek için yapılan bir çalışmada, DS ve normal fetal kordon kanı mononükleer hücrelerinde (CBMCs) miRNA ekspresyon profillerini tanımlamak amacıyla, Illumina yüksek verimli sekanslama teknolojisi kullanılmıştır [182]. Çalışmada 395 tanımlı miRNA ve 181 yeni aday miRNA'nın analizi yapılmıştır. Hsa-mir-483-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-mir-98-5p, hsa-mir-181a ve hsa-mir-155 dahil olmak üzere, 149 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinde anlamlı ölçüde değişiklik olduğu bildirilmiştir. Aday miRNA'lardan 2'sinin kromozom 21'in 'kritik bölgesi' içinde lokalize olduğu rapor edilmiştir. Xu ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, hsa-miR-99a, let-7c, miR-125b-2 ve miR-155'nin downregüle olduğu bulunurken, miR-802'nin upregüle olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmaya da dahil ettiğimiz kromozom 21 türevli bu beş miRNA'dan sadece let-7c'nin anlamlı düzeyde upregüle olduğu bulundu. Down sendromunun karmaşık ve değişken fenotiplerine katkıda bulunduğu belirlenmiş kromozom 21 türevli bu miRNA'ların ekspresyon düzeyleri rapor edilen literatürlerde birbirinden farklılık göstermektedir [171,179,180,181].

Down sendromu fenotipleri arasında yer alan bilişsel bozukluğa neden olan MeCP2 geninin ifadesini baskılamayan yanı sıra Bach1, Sla, Cutl1, Csf1r, Jarid2, Cebp- β , PU.1, Arntl, Hif1- α ve Picalm genlerini de düzenleyerek, inflamasyon sırasında immünoisitlerin gelişiminde de önemli oldukları belirlenen kromozom 21 türevli bu beş miRNA'nın hematopoietik kök hücrelerindeki (HSC) sürekli eksprese edilmelerinin bir sonucu olarak, miyeloproliferatif bozukluğa da yol açabildikleri gösterilmiştir [179,184,185]. Ayrıca, hsa-miR-99a, let-7c ve miR-

125b'nin tümör baskılayıcı olarak etki göstererek, DS hastalarında solid tümörlerin insidansını azaltabilecekleri bildirilmiştir [186].

Down sendromuyla ilişkilendirilen kromozom 21 türevli miRNA'ların dışında, genom geneli DS ile ilişkili miRNA ekspresyon profilinin araştırılması, miRNA'ların DS fetusun gelişimindeki rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Kromozom 21 türevli olmayan ancak DS ile ilişkili olduğu belirlenen çok sayıda tanımlanmış ve farklı şekilde düzenlenmiş miRNA'nın, hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz, granülosit olgunlaşması ve aktivasyonu gibi çeşitli hücre işlemlerinde yer aldığı bildirilmiştir. Örneğin, miyeloid-spesifik bir miRNA olan hsa-miR-233, miyeloid progenitör proliferasyonunu, granülosit farklılaşmasını ve aktivasyonunu negatif olarak düzenler ve nötrofillerin fonksiyonunun korunmasında rol oynamaktadır [187]. Ayrıca, hsa-miR-196b ve miR-21'in granülopoezise dahil olduğu bulunmuş ve bu miRNA'ların ortak ifadesi neticesinde G-CSF'nin neden olduğu granülopoezi tamamen bloke edebildikleri gösterilmiştir [188]. Ek olarak, hsa-miR-21'in downregülasyonu, mononükleer hücrelerin oluşumunu ve dendritik hücrelerin farklılaşmasını da engellemektedir [189]. Çalışmamızda da kontrol grubuna göre hasta grubunda hsa-miR-21'in upregüle olduğu bulundu.

Down sendromunda ekspresyon düzeyleri farklılık gösteren miRNA'ların hedef genleri incelendiğinde, mRNA hedeflerinin çoğunluğu, Süperoksit dismutaz-1 (SOD1), MAX dimerization protein 4 (MXD4), Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 (PBX1), Bcl-2 ilişkili faktör 1 (BCLAF 1) ve Forkhead BOX O1 (FOXO1) gibi immün modülasyonu ile ilişkili genler olup, bu genler sırasıyla hsa-miR-1, miR-320b, miR-196b, miR-4732-5p ve miR-486-5p ile hedeflenmiştir [182].

Çalışmamızda, DS'li fetus taşıyan gebelerin plazmalarında, kontrol grubu gebelere göre upregüle olduğu bulunan hsa-miR-486-5p'nin hedef geni olan, BCLAF1, T ve B hücre soylarının uygun homeostazisi ve aktivasyonunu tetiklediği T hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olan bir nükleer protein olarak tanımlanmaktadır [190]. Yine yaptığımız çalışmada upregüle olduğu bulunan diğer bir miRNA olan miR-4732-5p'nin ($p=0,04$; $FR=1,79$) hedef geni olan FOXO1, bağışıklık sistemi homeostazının korunmasında önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir ve olgun periferik T ve B hücrelerinde eksprese edilmektedir. Yapılan çalışmalarda FOXO1 eksikliği olan olgun B hücrelerinin, IgG üretiminde ortaya çıkan sınıf değişikliği rekombinasyonunu geçiremediğini göstermektedir [191]. Hedef genleri de göz önüne alındığında, farklı düzeylerde eksprese olan bu miRNA'lar, yeni doğan ve DS'li fetuslarda görülen hemopoietik anomalilere ve immün defektlerine neden olarak gösterilmektedir [182].

Lim ve arkadaşları [192] yaptıkları çalışmada, çalışmamızın amacına paralel bir amaçla DS'nin noninvaziv prenatal testinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçler olarak miRNA'ların panelini oluşturmayı ve biyoinformatik araçlar kullanarak belirlenen bu

biyobelirteçlerin biyolojik fonksiyonlarını belirlemeyi hedeflemişlerdir. Çalışmada, öploid ve DS'li fetus taşıyan gebelerin plazma ve plasenta örnekleri karşılaştırılmıştır. Tam kanı plasentadan önemli ölçüde ayırabilen 299 miRNA belirlenmiş, tanımlanan miRNA'lar arasında, 150 miRNA'nın plasentada upregüle olduğu ve 149 miRNA'nın downregüle olduğu rapor edilmiştir. Plasentada upregüle olmuş miRNA'ların çoğunun, mir-498, mir-379 ve mir-127 kümelerinin üyesi olduğu ve bu miRNA'lardan mir-1973 ve mir-3196'nın, DS'li plasentasında, öploid plasentasından daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği bildirilmiştir. İki miRNA'nın, potansiyel olarak beyin ve sinir sistemi gelişiminde yer alan 203 hedef geni düzenlediği ve bu genlerin, konjenital anormallikler, ruhsal bozukluklar ve sinir sistemi hastalıkları gibi DS ile ilişkili bozukluklarla önemli ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu veriler doğrultusunda da fetal DS'nin noninvasiv tanısında plasenta spesifik miRNA'ların potansiyel biyobelirteçler olabilecekleri ileri sürülmüştür [192].

Dahil edilme kriterlerine göre belirlediğimiz hasta ve kontrol grubu örneklerinin eş zamanlı plazma ve amniyotik sıvı örneklerini kullandığımız çalışmamızda, plazma örneklerinde gruplar arası analiz ayrı, amniyotik sıvı örneklerindeki analiz ayrı gerçekleştirilmiş olup, birbirinden farklı miRNA'lar ve farklı ekspresyon düzeyleri elde edildi. Plazma ve amniyotik sıvı örnekleri arasındaki korelasyona bakıldığında, hsa-miR-629-5p ($R=-0,900$; $p= 0,037$), hsa-miR-320c ($R=-0,738$; $p= 0,037$), hsa-miR-486-5p ($R=-0,829$; $p= 0,042$) arasındaki ilişki anlamlı bulundu.

Çalışmamızda noninvasiv tanıda kullanılacak miRNA'lar, hasta grubu plazma örneklerindeki ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucu elde edildi. Lim ve arkadaşları [192] çalışmalarında, tam kana karşı plasentadaki miRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında artış gösteren miRNA'lardan anjiyogenez ile ilişkili olduğu belirlenen hsa-miR-21-5p'nin çalışmamızda da upregüle olduğu ($p=0,02$; $FR=1,27$) belirlenirken, hsa-miR-320c ile X-kromozal miRNA'lar arasında bulunan hsa-miR-98-5p'nin de ($p=0,03$; $FR=1,43$), Xu ve ark'nın [182] çalışmalarındaki sonuçlardan farklı olarak upregüle olduğu bulundu.

Diferansiyel miRNA ekspresyonunun birçok hastalıkta olduğu gibi DS ile de ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, maternal plazmadaki miRNA ekspresyonundaki değişimlerin nedeni tam olarak belirlenemediği gibi, DS fetal plasentalarında gerçekleşen miRNA ekspresyonundaki genom çapında meydana gelen değişiklikler ve bu değişikliklerin işlevi de henüz tam olarak belirlenememiştir. Mikroarray teknolojisi kullanılarak öploid veya DS fetuslarından elde edilen plasenta örneklerinde genom çapında miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen bir çalışmada, 34 miRNA'nın, DS plasentasında normal plasentaya göre (16 upregüle ve 18 downregüle) anlamlı olarak farklı şekilde eksprese edildiği ve kromozom 21 türevli miRNA ekspresyonlarının ise değişmediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, ekspresyon düzeylerinde değişiklik olan miRNA'ların belirlenen 7434 hedef

geni arasından 76'sının, kromozom 21 üzerinde lokalize olduğu ve bu hedef genlerin, mental retardasyon, nörodavranışsal belirtiler ve konjenital anormallikler gibi DS ve DS ile ilişkili bozukluklarla anlamlı düzeyde ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bu 76 geni hedefleyen 6'sı upregüle (miR-504, miR-320c, miR-1298, miR-1297, miR-891b, miR-513a-3p), 4'i downregüle (miR-133b, miR-188-3p, miR-1301 miR-1233) olmak üzere 10 miRNA tanımlanmıştır. Upregüle miRNA'ların hedeflediği genlerden 20'sinin DS ile anlamlı derecede ilişkili olduğu ve bu genlerin ayrıca mental retardasyon, nörodavranışsal belirtiler ve konjenital anormallikler gibi DS komplikasyonlarıyla da ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu genlerin, miR-504, miR-320c, miR-1298, miR-1297, miR-891b ve miR-513a-3p ile potansiyel olarak düzenlendiği ve özellikle BACE2, CBS, RUNX1 ve CRYAA genlerinin Alzheimer hastalığı, lösemi ve katarakt gibi tipik DS semptomları ile ilişkili olduğu yapılan analizler ile gösterilmiştir. Aynı çalışmada, downregüle olmuş miRNA'lar tarafından hedeflenen 10 genden 5'i DS ile ilişkilendirilmiş ve bununla birlikte bu genlerin mental retardasyon, nörodavranışsal belirtiler, nörolojik bulgular ve konjenital anomaliler gibi yine DS komplikasyonlarıyla da ilişkisi gösterilmiştir. Ayrıca, bu genlerin miR-133b, miR-188-3p ve miR-1301 ile hedeflendiği belirtilmiştir [193].

Bilişsel bozukluk, konjenital kalp defektleri ve immün sistem defektleri gibi fenotiplerin dahil olduğu bir spektruma sahip olan Down sendromunun bunlara ek olarak, koryoamniyotik membranda ayrılma, koryoamniyotik membranların gecikmiş füzyonu, sinsityotrofoblast oluşumundaki bozukluklar ve amniyosit senesansı gibi fetal membran anomalileriyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kromozom 21 türevli genler tarafından kodlanan miRNA'ların DS'nin çeşitli bilişsel ve nörolojik fenotiplerinde rol oynadığını gösteren literatürlerin dışında fetal membran anomalilerindeki rolü de araştırılmıştır. Modi ve ark. tarafından yapılan çalışmada, koryoamniyotik membranlarda, hsa-miR-99a, hsa-miR-125b ve hsa-let-7c'nin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Kromozom 21'deki trizomiye bağlı olarak artan gen dozajına rağmen, kültürlenmiş DS amniyositlerinde öploid amniyositlere kıyasla üç miRNA'nın ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. Bu üç miRNA'nın, fetal membran rüptüründe ve trizomi 21 ile ilişkili fetal membran defektlerinde potansiyel bir rol oynadığı ileri sürülmüştür [194].

Maternal plazma örnekleri ile eş zamanlı olarak çalıştığımız amniyotik sıvı örneklerinde, hasta grubu kontrol grubuna göre kıyaslandığında 15'i (hsa-miR-155-5p (p=0,049), hsa-miR-19b-2-5p (p=0,0034), hsa-miR-199b-3p (p=0,043), hsa-miR-92a-2-5p (p=0,043), hsa-miR-1298-5p(p=0,0028), hsa-miR-124-5p (p=0,0094), hsa-miR-335-5p (p=0,007), hsa-miR-374b-3p (p=0,0028), hsa-miR-125b-2-3p (p=0,0003), hsa-miR-513a-3p (p=0,0023), hsa-miR-222-5p (p=0,015), hsa-miR-133b (p=0,009), hsa-miR-1301-3p (p=0,0012), hsa-let-7f-2-3p (p=0,007) ve hsa-miR-504-5p (p=0,006)) upregüle, 7'si (hsa-miR-30c-5p (p=0,011), hsa-miR-20a-5p (p=0,019), hsa-miR-10b-5p (p=0,049), hsa-miR-196b-5p (p=0,0009), hsa-miR-141-3p (p=0,029), hsa-miR-21-5p (p=0,0079) ve hsa-miR-362-3p (p=0,043)) downregüle olmak üzere

toplam 22 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık olduğu bulundu. Upregüle olan miRNA'lar arasında bulunan hsa-miR-504, hsa-miR-1298 ve hsa-miR-513 örnek farklılığı olmasına rağmen Lim ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile paralellik göstermektedir. İnvaziv bir yöntem olan, ancak tanı için gerekli olan amniyosentez sonucu elde edilen amniyotik sıvı örneklerini kullanma amacımız, amniyotik sıvıda da bir miRNA ekspresyon profili belirlemenin yanı sıra, eş zamanlı alınan plazma örnekleri ile korelasyonunu da değerlendirmektir. Literatür taraması sonucunda, amniyotik sıvıdaki miRNA ekspresyon düzeylerine ait bilinen bir veri bulunmadığı tespit edildi. Dolayısıyla, elde ettiğimiz verilerin daha ileri çalışmalarla genişletilerek amniyotik sıvıdaki miRNA ekspresyon profilinin oluşturulabilmesine öncülük edeceğini düşünmekteyiz. Ayrıca belirlenen miRNA'ların kullanımının, tanı amaçlı uygulanan amniyosentez işleminde alınan kromozom analizi için gerekli görülen örnek miktarından çok daha azının kullanılmasına ve çok daha kısa bir süreçte sonuç verilmesine katkı sağlayabileceğini öngörmekteyiz.

Down sendromuna, kromozom 21'in tamamı veya bir kısmının fazladan bir kopyası neden olmaktadır. Dolayısıyla genlerin dengesiz ekspresyonunun, kromozom 21 üzerindeki potansiyel etkileri, bu hastalığın ana etiyolojisi olarak kabul görmektedir. Bununla birlikte, gen ekspresyonu, miRNA'lar gibi çevresel değişikliklerden etkilenebilirler. miRNA'ların ilk tanımından bu yana, gen ekspresyonundaki düzenleyici rolleri gösterilmiş olup, birçok biyolojik süreçte yer aldığı bilinmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların, DS'nin moleküler mekanizmasının anlaşılmasındaki rolü göz ardı edilemez. Ancak bugüne kadar, DS'deki miRNA ekspresyonundaki değişiklikler öncelikle kromozom 21 türevli miRNA'lar kullanılarak araştırılmıştır ve çoğu çalışmada, DS komplikasyonlarında kromozom 21 türevli miRNA'ların anormal ekspresyonuna odaklanılmıştır [193]. Bununla birlikte, miRNA'lar tarafından potansiyel olarak düzenlenen genler belirli bir kromozomla sınırlı olmayıp, genom boyunca çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu etkileyebilirler. Diğer bir deyişle, başka kromozom türevli miRNA'lar, kromozom 21 üzerinde lokalize olan hedef genleri aracılığıyla DS fenotiplerine katkıda bulunabilirler. Bu nedenle, DS'de farklı olarak ifade edilen çeşitli miRNA'ları tanımlamayı amaçladığımız çalışmamızda, sadece kromozom 21 türevli miRNA'lar değil, farklı miRNA'ların ekspresyon düzeyleri de analiz edildi.

Genel olarak, çalışma sonuçları paralellik göstermekle birlikte, çalışmamızda elde edilen veriler de dahil olmak üzere, daha önceki çalışmalardan elde edilen veri farklılıklarının birçok nedeni olabilir. Farklı örnekler (kordon kan hücresi ve fetal dokular), farklı örnek eldesi, örnek hazırlama, örneklem büyüklüğü ve ekspresyon düzeylerini belirlemede kullanılan yöntem farklılığı dahil olmak üzere çalışma tasarımlarındaki sayısız farklılıklar nedeniyle oluşan bu durum aslında ileri çalışmaların temelini oluşturmaktadır.

Gebelikle ilişkili hastalıklar ile miRNA'ların ilişkisini belirlemek için birçok çalışma mevcuttur. Ancak çalışmamızda temel amacımız DS'li fetus taşıyan gebelerin erken, kolay ve noninvasiv bir yöntem ile belirlenmesi için miRNA profili oluşturmaktır ki Down sendromunun noninvasiv prenatal tanısı amacıyla kromozom 21 türevli yada başka miRNA'ların uygulanmasını gösterdiği belirlenmiş bir literatür henüz bulunmamaktadır. Elbette belirlenen miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimin nedeni de belirlenmelidir. Bu nedenle, bu çalışmaya ek olarak bu konuda yapılacak ileri çalışmalar büyük bir önem arz etmektedir.

Mevcut haliyle NIPT, özellikle kromozom 13, 18 ve 21'in dahil olduğu koşullara özel olmasına rağmen, bu yöntemin kapsamının genişletilmesi ve tarama programlarının iyileştirilmesi gerekmektedir. Özellikle, kromozom anomalilerinin, gebeliğin erken evrelerinde noninvasiv bir şekilde saptanması için, hızlı, ucuz, doğru ve klinik rutin uygulamaya entegre olan bir NIPT testinde miRNA'ların kullanımı için hala daha fazla veriye ihtiyaç duyulmasına rağmen, özellikle miRNA'ların Down sendromunun noninvasiv prenatal tanısında önemli bir yere sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamıza dahil edilen gruplar;

- ✓ Hasta grubu; 10 Down sendromu, 2 Klinefelter sendromu, 1 Turner sendromu, 1 Trizomi 18 olmak üzere konjenital anomalili fetus taşıyan 14 gebe,
- ✓ Kontrol-1 grubu; Tarama testlerine ve USG bulgularına göre riskli bulunan, fakat amniyosentez sonucu konjenital anomalili fetus taşımadığı saptanan 16 gebe,
- ✓ Kontrol-2 grubu; Tarama testi riskli olmamasına rağmen ileri maternal yaş, down öyküsü gibi nedenlerden dolayı amniyosentez yapılan ve konjenital anomalili fetus taşımadığı saptanan 13 gebe olarak belirlendi.

Çalışmamızın sonucunda,

➤ Plazma örneklerinde;

1. Hasta grubu miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişim Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında, 25 miRNA'nın downregüle olduğu, 18 miRNA'nın upregüle olduğu saptandı ancak anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$).
2. Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu ve Trizomi 18 olarak oluşturulan alt gruplar ile Kontrol-2 grubu karşılaştırıldığında, Down sendromunda hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-99a-5p ve hsa-miR-222-5p'nin ekspresyonlarının yaklaşık 2 kat azaldığı, fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$).
3. Kontrol-1 ve Kontrol-2 arasındaki miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol-2 grubuna göre hsa-miR-223-3p ekspresyonunun Kontrol-1 grubunda 1,38 kat azaldığı bulundu ($p=0,0049$).
4. Kontrol-1 grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda 15 miRNA'nın upregüle, 28 miRNA'nın downregüle olduğu saptandı, ancak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$).
5. Kontrol-1 ile hasta grubu içerisindeki alt gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$).
6. Her iki kontrol grubu ile hasta grubu miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırmasında 43 miRNA'dan 28 miRNA'nın downregüle olduğu, 15 miRNA'nın upregüle olduğu ve hasta grubunda, bu miRNA'lardan hsa-miR-629-5p'nin 1,51 kat ($p=0,043$) ve hsa-miR-21-5p'nin 1,19 kat ($p=0,043$) arttığı tespit edildi.
7. Down sendromu grubu, tüm kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hsa-miR-629-5p 2 kat ($p=0,008$), hsa-miR-320c 1,22 kat ($p=0,042$), hsa-miR-21-5p 1,27 kat ($p=0,019$), hsa-let-7c-5p 1,56 kat ($p=0,022$), hsa-miR-98-5p 1,43 kat ($p=0,034$), hsa-miR-486-5p 1,49 kat

(p=0,03), hsa-miR-4732-5p 1,79 kat (p=0,04) ve hsa-miR-181a-5p 1,61 kat (p=0,045) artmış olarak bulundu.

➤ Amniyotik sıvı örneklerinde,

1. Hasta grubu Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında, hsa-miR-155-5p 1,97 kat (p=0,016), hsa-miR-629-5p 1,71kat (p=0,027), hsa-miR-23c 1,67 kat (p=0,037), hsa-miR-19b-2-5p 2,07 kat (p=0,018), hsa-miR-199b-3p 1,93 kat (p=0,018), hsa-miR-802 1,97 kat (p=0,026), hsa-miR-92a-2-5p 2,02 kat (p=0,02), hsa-miR-1298-5p 2,27 kat (p= 0,012), hsa-miR-335-5p 2,31 kat (p=0,004), hsa-miR-374b-3p 2,14 kat (p=0,015), hsa-miR-125b-2-3p 2 kat (p=0,007), hsa-miR-124-5p 1,95 kat (p=0,024), hsa-miR-513a-3p 2,27kat (p=0,012), hsa-miR-133b 1,91kat (p=0,007), hsa-miR-188-3p 1,53 kat (p=0,039), hsa-miR-1301-3p 3,13 kat (p=0,015), hsa-let-7f-2-3p 2,03 kat (p=0,022), hsa-miR-504-5p 2,08 kat (p=0,017) upregüle; hsa-miR-141-3p -2,41 kat (p=0,009), hsa-miR-196b-5p 2,3401 kat (p=0,004) ve hsa-miR-30c-5p 4,32 kat (p=0,029) downregüle olarak belirlendi.
2. Down sendromu grubu, Kontrol-2 grubu ile karşılaştırıldığında, hsa-miR-1301-3p'in 2,25 kat (p=0,034), hsa-miR-125b-2-3p'nin 1,88 kat (p=0,018), hsa-miR-133b'in 1,61 kat (p=0,045) ve hsa-miR-335-5p'in 1,69 kat (p=0,036) ekspresyonunun arttığı saptanırken, hsa-miR-196b-5p'in 3,02 kat (p=0,007) ve hsa-miR-141-3p'nin 2,15 kat (p=0,03) ekspresyon düzeyinin azaldığı bulundu.
3. Kontrol-2 grubuna göre, Kontrol-1'deki miRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında, hsa-miR-21-5p (1,54 kat, p=0,02), hsa-let-7c-5p (1,38 kat, p=0,041), hsa-miR-10b-5p (1,77 kat, p=0,01), hsa-miR-98-5p (1,41 kat, p=0,04) ve hsa-miR-30c-5p (1,38 kat, p=0,049) upregüle; hsa-miR-210-3p (1,37 kat, p=0,038) ise downregüle olarak belirlendi.
4. Kontrol-1 grubuna göre hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, upregüle olan miRNA'lar, hsa-miR-155-5 (1,65 kat, p=0,036022), hsa-miR-19b-2-5p (2,52 kat, p=0,003), hsa-miR-199b-3p (2,32 kat, p=0,035), hsa-miR-802 (1,6 kat, p=0,041), hsa-miR-92a-2-5p (2,17 kat, p=0,03), hsa-miR-1298-5p (2,43 kat, p=0,003), hsa-miR-124-5p (2,47 kat, p=0,004), hsa-miR-335-5p (1,78 kat, p=0,006), hsa-miR-374b-3 (2,47 kat, p=0,003), hsa-miR-125b-2-3p (2,84 kat, p=0,0009), hsa-miR-513a-3p (2,54 kat, p=0,003), hsa-miR-222-5p (2,74 kat, p=0,041), hsa-miR-133b (1,71 kat, p=0,008), hsa-miR-1301-3p (3,03 kat, p=0,006), hsa-let-7f-2-3p (2,18 kat, p=0,005) ve hsa-miR-504-5p (2,13 kat, p=0,006) iken; downregüle olan miRNA'lar ise, hsa-miR-126-3p (2,41 kat, p=0,009), hsa-miR-21-5p (12,43 kat, p=0,0009), hsa-miR-362-3p (1,85 kat, p=0,012), hsa-miR-20a-5p (6,41 kat, p=0,012), hsa-miR-10b-5p (4 kat, p=0,0009), hsa-

- miR-196b-5p (2,98 kat, p=0,0003), hsa-miR-141-3p (2,49 kat, p=0,016), hsa-miR-221-3p (4,04 kat, p=0,038) ve hsa-miR-30c-5p (5,98 kat, p=0,0003) olarak tespit edildi.
5. Down sendromu hasta alt grubunda, Kontrol-1 grubuna karşı, hsa-miR-19b-2-5p 2,03 kat (p= 0,016), hsa-miR-1298-5p 1,95 kat (p= 0,019), hsa-miR-124-5p 1,92 kat (p= 0,025), hsa-miR-374b-3p 1,99 kat (p= 0,016), hsa-miR-125b-2-3p 2,67 kat (p= 0,003), hsa-miR-513a-3p 2,05 kat (p= 0,015), hsa-miR-1301-3p 2,18 kat (p= 0,014), hsa-miR-210-3p 1,39 kat (p= 0,031), hsa-let-7f-2-3p 1,76 kat (p= 0,027) ve hsa-miR-504-5p 1,73 kat (p= 0,034) ekspresyonunun arttığı, hsa-miR-126-3p 2,32 (p= 0,028), hsa-miR-21-5p 8,08 kat (p= 0,0025), hsa-miR-362-3p 2,03 kat (p= 0,035), hsa-miR-20a-5p 5,25 kat (p= 0,015), hsa-miR-10b-5p 3,18 kat (p= 0,01), hsa-miR-196b-5p 3,85 kat (p= 0,0009), hsa-miR-141-3p 2,22 kat (p= 0,045) ve hsa-miR-30c-5p 4,34 kat (p= 0,004) ekspresyonunun azaldığı saptandı.
8. İki kontrol grubuna karşılık hasta grubundaki miRNA ekspresyon düzeylerinin analizi sonucu elde edilen verilere göre 23 miRNA'nın upregüle, 22 miRNA'nın downregüle olduğu ve bu farklılığın anlamlı olduğu saptandı (p<0,05).
9. Down sendromu hasta alt grubu, tüm kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hsa-miR-155-5p (1,35 kat, p=0,049), hsa-miR-19b-2-5p (1,86 kat, p=0,0034), hsa-miR-199b-3p (1,92 kat, p= 0,043), hsa-miR-92a-2-5p (1,69 kat, p=0,043), hsa-miR-1298-5p (1,89 kat, p=0,0028), hsa-miR-124-5p (1,73 kat, p=0,0094), hsa-miR-335-5p (1,46 kat, p=0,007), hsa-miR-374b-3p (1,87 kat, p=0,0028), hsa-miR-125b-2-3p (2,28 kat, p=0,0003), hsa-miR-513a-3p (1,95 kat, p=0,0023), hsa-miR-222-5p (1,69 kat, p=0,015), hsa-miR-133b (1,51 kat, p=0,009), hsa-miR-1301-3p (2,21 kat, p=0,0012), hsa-let-7f-2-3p (1,71 kat, p=0,007) ve hsa-miR-504-5p'nin (1,72 kat, p=0,006) upregüle; hsa-miR-30c-5p (3,75 kat, p=0,011), hsa-miR-20a-5p (4,91 kat, p=0,019), hsa-miR-10b-5p (2,46 kat, p=0,049), hsa-miR-196b-5p (3,45 kat, p=0,0009), hsa-miR-141-3p (2,19 kat, p=0,029), hsa-miR-21-5p (6,66 kat, p=0,0079) ve hsa-miR-362-3p'nin (1,87 kat, p=0,043) downregüle olduğu bulundu.
- Plazma örneklerindeki Down sendromu hasta alt grubu ile tüm kontrol grubu karşılaştırması sonucu ekspresyon düzeyleri anlamlı artış göstermiş olan, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-320c, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-4732-5p ve hsa-miR-181a-5p'nin amniyotik sıvı örneklerindeki ekspresyon düzeyleri ile arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, hsa-miR-629-5p (R=-0,900; p= 0,037), hsa-miR-320c (R=-0,738; p= 0,037), hsa-miR-486-5p (R=-0,829; p= 0,042)'nin anlamlı olduğu bulundu.

Çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde, başta hsa-miR-629-5p, hsa-miR-320c, hsa-miR-486-5p olmak üzere hsa-miR-21-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-4732-5p ve hsa-miR-181a-5p'nin ileri çalışmalarla desteklenerek özellikle Down sendromu prenatal tanısında miRNA'ların noninvasiv bir yöntem olarak kullanılabilmesini düşünmekteyiz.

Son olarak, Down sendromu dışındaki diğer konjenital anomalilere ait daha büyük örneklem genişliği olan ve gebeliğin erken dönemlerinde elde edilen örnekler ile genom çapında miRNA ekspresyon düzeylerinin analiz edileceği araştırmaların planlamasını önermekteyiz. Böylece miRNA'ların kullanıldığı kolay, çok daha erken bir dönemde ve fetüs kaybı riski olmadan noninvasiv bir prenatal tanı yönteminin geliştirilebileceğini öngörmekteyiz.



KAYNAKLAR

- [1]. Murray, C.J.L., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A.D., Michaud, C., et al. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*, 15;380(9859), 2197-2223.
- [2]. WHO/World Health Organization/Congenital anomalies. (2016) 23 Ekim 2017 tarihinde www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370 adresinden erişildi.
- [3]. Khoury MJ. (1989). Epidemiology of birth defects. *Epidemiol Rev*, 11, 244-248.
- [4]. Patel ZM., Adhia RA. (2005). Birth defects surveillance study. *Indian J Pediatr*, 72, 489-491.
- [5]. Corsello G., Giuffrè M. (2012). Congenital malformations. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1, 25-29. doi: 10.3109/14767058.2012.664943.
- [6]. Jones, K.L. Dysmorphology. (2008). In: Berman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia: WB Saunders, 616-623.
- [7]. Kyu, H.H., Pinho, C., Wagner, J.A., Brown, J.C., Bertozzi Villa A., et al. (2016). Global and National Burden of Diseases and Injuries Among Children and Adolescents Between 1990 and 2013: Findings From the Global Burden of Disease 2013 Study. *JAMA Pediatr*, 170(3), 267-287.
- [8]. Penchaszadeh, VB. (2002). Preventing congenital anomalies in developing countries. *Community Genet*, 5(1), 61-69.
- [9]. Christianson, A., Modell, B. (2004). Medical genetics in developing countries. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 5, 219-265.
- [10]. Christianson, A., Howson, CP., Modell, B. (2006). Dimes global report on birth defects. 30 Ekim 2017 tarihinde http://www.marchofdimes.com/downloads/Birth_Defects_Report-PF.pdf. Adresinden erişildi.
- [11]. Bale, J.R., Stoll, B.J., Lucas, A.O. (Ed.). (2003). IOM. *Reducing birth defects. Meeting the challenge in the developing world*. Board on International Health, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Washington, DC: National Academy Press.
- [12]. Zeitlin, J., Mohangoo, A., Cuttini, M., Committee, E.R.W., Alexander, S., Barros, H., et al. (2009). The European Perinatal Health Report: comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe. *J Epidemiol Community Health*, 63, 681-682.
- [13]. Hamilton, B.A., Wynshaw-Boris A. (2009). *Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*. Philadelphia: Elsevier.
- [14]. Guyer, B., Martin, J.A., MacDorman, M.F., Anderson, R.N., Strobino, D.M. (1996). Annual summary of vital statistics. *Pediatrics*, 100(6), 905-918.

- [15]. Spencer, K., Souter, V., Tul, N., Snijders, R., Nicolaides, K.H. (1999). A screening program for trisomy 21 at 10–14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 13, 231–237.
- [16]. Wald, N.J, Rodeck, C., Hackshaw, A.K, Walters, J., Chitty, L., Mackinson, A.M. (2003). First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *J Med Screen*, 10, 56–104.
- [17]. Wapner, R., Thom, E., Simpson, J.L., Pergament, E., Silver, R., Filkins, K., Platt, L., Mahoney, M., Johnson, A., Hogge, W.A., et al. (2003). First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N Engl J Med*, 349, 1405–1413.
- [18]. Go, A.T., Hupkes, H.W., Lomecky, M., Twisk, J., Blankenstein, M.A., van Vugt, J.M. (2005). Evaluation of a programme for the prenatal screening for Down's syndrome by ultrasonographic nuchal translucency measurement and serum determinations in the first trimester of pregnancy. *Ned Tijdschr Geneesk*, 149, 2795–2799.
- [19]. Lo, Y.M, Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350, 485–487.
- [20]. Poon, L.L., Leung, T.N., Lau, T.K., Lo, Y.M. (2000). Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 46, 1832-1834.
- [21]. Go, A.T., van Vugt, J.M., Oudejans, C.B. (2011). Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum Reprod Update*, 17(3), 372-382.
- [22]. Luo, S.S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., et al. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod*, 81, 717–729.
- [23]. Chim, S.S., Jin, S., Lee, T.Y., Lun, F.M., Lee, W.S., Chan, L.Y., Jin, Y., Yang, N., Tong, Y.K., Leung, T.Y., et al. (2008). Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem*, 54, 500–511.
- [24]. Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., Lo, Y.M. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 54, 482–490.
- [25]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Update on overall prevalence of major birth defects–Atlanta, Georgia, 1978–2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 57(1), 1–5.

- [26]. Donnai, D., Winter, R.M. (Ed.). (1995). *Congenital malformation syndromes*. London:Chapman & Hall Medical.
- [27]. Jones, K.L. (1997). *Smith's recognizable patterns of human malformations*. Philadelphia: WB Saunders Company.
- [28]. Kochanek, K.D., Kirmeyer, S.E., Martin, J.A., Strobino, D.M., Guyer, B. (2012). Annual summary of vital statistics: 2009. *Pediatrics*, 129(2),338–348.
- [29]. Wellesley, D., Boyd, P., Dolk, H., Pattenden, S. (2005). An aetiological classification of birthdefects for epidemiological research. *J Med Genet*, 42,54–57.
- [30]. Rasmussen, S.A., Olney, R.S., Holmes, L.B., Lin, A.E., Keppler-Noreuil, K.M., Moore, C.A. (2003). Guidelines for case classification for the National Birth Defects Prevention Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67, 193–201.
- [31]. World Health Organisation. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)-WHO Version for ;2016. (2016). 15 ekim 2017 tarihinde <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/XVII> adresinden erişildi.
- [32]. Bal, F., Yıldız, A., Menevse, A., Menekse, S. (1996).Kromozomal anomaliler ve doğum öncesi tanı yöntemleri. *T Klin Jineköl Obst*, 6, 149-159.
- [33]. Demirhan, O. (2010). Sitogenetik. Kasap, H. (Ed). *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*. (ss. 347-384). Adana: Nobel Kitabevi,.
- [34]. Hassold, T., Hall, H., Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics*, 16, 203-208.
- [35]. Dashe, J.S. (2016). Aneuploidy Screening in Pregnancy. *Obstet Gynecol*, 128, 181–94.
- [36]. Cunningham, F.G., MacDonald, P.C., Gant, N.F., Leveno, K.J., Gilstrap, L.C. (2010). *Williams Obstetrics*. 23th Ed, United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- [37]. Evans- Martin F.F. (2009). *Down Syndrome*. United States of America: Infobase Publishing.
- [38]. Practice bulletin No. 163: screening for fetal aneuploidy. (2016). *Obstet Gynecol.*, 127(5), e123–137.
- [39]. Kang, Y., Dong, X., Zhou, Q., Zhang, Y., Cheng, Y., Hu, R., Su, C., Jin, H., Liu, X., Ma, D., Tian, W., Li, X. (2012) Identification of novel candidate maternal serum protein markers for Down syndrome by integrated proteomic and bioinformatic analysis. *Prenat Diagn*, 32(3), 284–292.
- [40]. Morris, J.K., Wald, N.J., Watt, H.C. (1999). Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn.*, 19(2), 142–145.
- [41]. Sherman, S.L., Freeman, S.B., Allen, E.G., Lamb, N.E. (2005) Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenetic Genome Res*, 111, 273-280.

- [42]. Sherman, S.L., Allen, E.G., Bean, L.H., Freeman, S.B. (2007). Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.*, 13(3), 221-227.
- [43]. Jyothy, A., Kumar, K.S., Mallikarjuna, G.N., (2001). Parental age and the origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *J Hum Genet.*, 46, 347-350.
- [44]. Hill, M.A. (2018). Embryology. 03.02.2018 tarihinde <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php> adresinden erişildi.
- [45]. Kafkaslı, A. (2004). Gebelikte Down Sendromu tanısı için tarama testleri ve güvenilirlikleri. *TJD. Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*, 6, 30-35.
- [46]. Jyoty, A., Rao, G.N., Kumar, K.S., (2002). Translocation Down syndrome. *Indian J Med Sci.*, 56, 122-126.
- [47]. Mokhtar, M.M., Abd, el-Aziz A.M., Nazmy, N.A., Mahrous, H.S., (2003). Cytogenetic profile of Down syndrome in Alexandria, Egypt. *East Mediterr Health J.*, 9, 37-44.
- [48]. Carlson, L.M., Vora, N.L. (2017) Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, 44(2), 245-256.
- [49]. Antonarakis, S.E., Epstein, C.J. (2006). The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med.*, 12(10), 473-479.
- [50]. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., et al. (2007). *Thompson & Thompson genetics in medicine*. 7th. Philadelphia: Saunders:Elsevier.
- [51]. Tosun, M., Yanık, F. (2004). Trizomi 18: Olgu sunumu. *OMÜ Tıp Dergisi*, 21(2), 98-99.
- [52]. Hall, J.G., Sybert, V.P., Williamson, R.A, Risher N.L., Reed, S.D. (1982). Turner's syndrome. *West J Med.*, 137, 32-44.
- [53]. Nielsen, J., Wohlert, M. (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.*, 87, 81-83.
- [54]. Bianchi, D.W., Bianchi, D.W. (2010). *Fetology: diagnosis and management of the fetal patient*. 2nd. New York: McGraw-Hill Medical Publication Division.
- [55]. Gravholt, C.H. (2004). Epidemiological, endocrine, and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol.*, 151, 657-687.
- [56]. Tyler, C., Edman, J.C. (2004). Down syndrome, Turner syndrome, and Klinefelter syndrome: primary care throughout the life span. *Prim Care.*, 31, 627-648.
- [57]. Papp, C., Beke, A., Mezi, G., Szigeti, Z., Ban, Z., Papp, Z. (2006). Prenatal diagnosis of Turner syndrome; report on 69 cases. *J Ultrasound Med.*, 25, 711-717.
- [58]. Serr, D.M., Sachs, L., Danon, M. (1955). The diagnosis of sex before birth using cells from the amniotic fluid (a preliminary report). *Bull Res Counc Isr.*, 5B(2), 137-138.
- [59]. Martin, J.A., Hamilton, B.E., Osterman, M.J.K. (2015). *Births in the United States, 2014*. NCHS Data Brief No. 216. Hyattsville (MD): National Center for Health Statistics.

- [60]. Wellesley, D., Dolk, H., Boyd, P.A., Greenlees, R., Haeusler, M., Nelen, V., et al. (2012). Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet.*, 20, 521–526.
- [61]. Loane, M., Morris, J.K., Addor, M., Arriola, L., Budd, J., Doray, B., et al. (2013). Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *Eur J Hum Genet.*, 21, 27–33.
- [62]. Parker, S.E., Mai, C.T., Canfield, M.A., Rickard, R., Wang, Y., Meyer, R.E., et al. (2010). Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004–2006. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 88, 1008–1016.
- [63]. Mai, C.T., Kucik, J.E., Isenburg, J., Feldkamp, M.L., Marengo, L.K., Bugenske, E.M., et al. (2013). Selected birth defects data from population based birth defects surveillance programs in the United States, 2006 to 2010: featuring trisomy conditions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 97, 709–725.
- [64]. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* (2015). Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 640, 126, e31–37.
- [65]. Driscoll, D.A., Gross, S.J. (2009). Professional Practice Guidelines Committee. Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects. *Genet Med*, 11, 818–821.
- [66]. Adzick, N.S., Thom, E.A., Spong, C.Y., Brock, J.W. 3rd, Burrows, P.K., Johnson, M.P., et al. (2011). A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med.*, 364(11), 993–1004.
- [67]. Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Knight, G.J., Cunningham, G.C., Lustig, L.S., Boyd, P.A. (1994). Reducing the need for amniocentesis in women 35 years of age or older with serum markers for screening. *N Engl J Med.*, 330, 1114–1118.
- [68]. Malone, F.D., Canick, J.A., Ball, R.H., Nyberg, D.A., Comstock, C.H., Bukowski, R., et al. (2005). First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med*, 353, 2001–2011.
- [69]. Norton, M.E., Jacobsson, B., Swamy, G.K., Laurent, L.C., Ranzini, A.C., Brar, H., et al. (2015). Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*, 372, 1589–1597.
- [70]. Gil, M.M., Quezada, M.S., Revello, R., Akolekar, R., Nicolaidis, K.H. (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45, 249–266.
- [71]. Bush, M.C., Malone, F.D. (2005). Down syndrome screening in twins. *Clin Perinatol*, 32, 373–386.
- [72]. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee. (2015). #36: Prenatal aneuploidy screening using cellfree DNA. *Am J Obstet Gynecol*, 212, 711–716.

- [73]. Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L.C., Rezende, J.C., Nicolaides, K.H. (2013). Fetal fraction in maternal plasma cell-free fetal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 41, 26–32.
- [74]. Nicolaides, K.H., Azar, G., Byrne, D, Mansur, C., Marks, K. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ*, 304(6831), 867–869.
- [75]. Baer, R.J., Norton, M.E., Shaw, G.M., Flessel, M.C., Goldman, S., Currier, R.J., Jelliffe-Pawlowski, L.L. (2014). Risk of selected structural abnormalities in infants after increased nuchal translucency measurement. *Am J Obstet Gynecol*, 211(6):675.e1–19.
- [76]. Galindo, A., Comas, C., Martinez, J.M., Gutiérrez-Larraya, F., Carrera, J.M., Puerto, B., et al. (2003). Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 13(3), 163–170.
- [77]. Hyett, J.A., Perdu, M., Sharland, G.K, Snijders, R.S, Nicolaides, K.H. (1997). Increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation as a marker for major cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 10(4), 242–246.
- [78]. Hyett, J., Noble, P., Sebire, N.J., Snijders, R., Nicolaides, K.H. (1997). Lethal congenital arthrogryposis presents with increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 9(5):310–313.
- [79]. Evans, M.I., Krantz, D.A., Hallahan, T.W., Sherwin, J. (2012). Impact of nuchal translucency credentialing by the FMF, the NTQR or both on screening distributions and performance. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 39(2), 181–184.
- [80]. Bogart, M.H., Pandian, M.R., Jones, O.W. (1987). Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn*, 7, 623–630.
- [81]. Canick, J.A., Knight, G.J., Palomaki, G.E., Haddow, J.E., Cuckle, H.S., Wald, N.J. (1988). Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*, 95, 330–333.
- [82]. Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Knight, G.J., Williams, J, Pulkkinen A., Canick, J.A., et al. (1992). Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers. *N Engl J Med*, 327, 588–593.
- [83]. Palomaki, G.E., Haddow, G.E., Knight, G.C., Wald, N.J., Kennard, A., Canick, J.A., et al. (1995). Risk-based prenatal screening for trisomy 18 using alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol, and human chorionic gonadotropic. *Prenat Diagn*, 15, 713–723.
- [84]. Wald, N.J., Densem, J.W., George, L., Muttukrishna, S., Knight, P.G. (1996). Prenatal screening for Down's syndrome using inhibin-A asa serum marker. *Prenat Diagn*, 16, 143–153.

- [85]. Conde-Agudelo, A., Kafury-Goeta, A.C. (1998). Triple-marker test as screening for Down syndrome: a meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv*, 53 (6), 369–376.
- [86]. Palomaki, G.E., Neveux, L.M., Knight, G.J., Haddow, J.E., Pandian, R. (2004). Maternal serum invasive trophoblast antigen (hyperglycosylated hCG) as a screening marker for Down syndrome during the second trimester. *Clin Chem*, 50(10), 1804–1808.
- [87]. Ayhan, A., Durukan, T., Günalp, S., Gürkan, T., Önderoğlu, L.S., Yaralı, H., Yüce, K. (2008). *Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
- [88]. Taner, C.E., Aygören, M.O., Kayar, İ., Derin, G. (2009). Down Sendromlu Olgularda Ultrasonografik Bulgular. *İzmir Perinatoloji Dergisi*, 17, 65-69.
- [89]. Beksaç, M.S. (1996). Prenatal tanıda non-invaziv yöntemler. Beksaç, M.S. (Ed). *Fetal Tıp; Prenatal Tanı*. Ankara: Medical Network.
- [90]. Decherney, A.H., Nathan, L., Goodwin, T.M., Laufer, N. (2009). Güncel Obstetrik ve Jinekoloji Tanı ve Tedavi-Lange, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
- [91]. Akolekar, R., Beta, J., Picciarelli, G., Ogilvie, C., D'Antonio, F. (2015). Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45(1), 16–26
- [92]. Practice bulletin No. 162: prenatal diagnostic testing for genetic disorders. (2016). *Obstet Gynecol*, 127(5), 108–122.
- [93]. 03.02.2018 tarihinde https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Chorionic_villus_sampling adresinden erişildi.
- [94]. Baffero, G.M., Somigliana, E, Crovetto, F., Paffoni, A., Persico, N., Gueneri, S., et al. (2012). Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome. *Prenat Diagn*, 32(11), 1102–1108.
- [95]. 04.02.2018 tarihinde <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/amniocentesis> adresinden erişildi.
- [96]. Tong, X.L., Wang, L., Gao, T.B., Qin, Y.G., Qi, Y.Q., Xu, Y.P. (2009). Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development—Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and Maternal Serum at Mid and Late Gestation. *J Chin Med Assoc.*, 72, 368-373.
- [97]. Yanney, M., Marlow, N. (2004). Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med*, 9, 411-418.
- [98]. Society for Maternal-Fetal Medicine, Dugoff, L., Norton, M.E., Kuller, C.A. (2016). The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*, 215(4), B2–9.

- [99]. Tepperberg, J., Pettenati, M.J., Rao, P.N., Lese, C.M., Rita, D., Wyandt, H., et al. (2001). Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn*, 21(4), 293–301.
- [100]. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350, 485–487.
- [101]. Tsui, N.B., Chim, S.S., Chiu, R.W., Lau, T.K., Ng, E.K., Leung, T.N., Tong, Y.K., Chan, K.C., Lo, Y.M. (2004). Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet*, 41, 461–467.
- [102]. Lo, Y.M., Lun, F.M., Chan, K.C., Tsui, N.B., Chong, K.C., Lau, T.K., Leung, T.Y., Zee, B.C., Cantor, C.R., Chiu, R.W. (2007). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 13116–13121.
- [103]. Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerslow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G. et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*; 456, 53–59.
- [104]. Voelkerding, K.V., Dames, S.A., Durtschi, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 55, 641–658.
- [105]. Ponting, C.P., Oliver, P.L., Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 136, 629–641.
- [106]. Bianchi, D.W. (2015). Pregnancy: prepare for unexpected prenatal test results. *Nature*, 522, 29–30.
- [107]. Chiu, R.W., Akolekar, R., Zheng, Y.W., Leung T.K., Sun, H., Chan, C.A., et al. (2011). Noninvasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*, 342, c7401.
- [108]. Hui, W.W., Chiu, R.W. (2016). Noninvasive prenatal testing beyond genomic analysis: what the future holds. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 28(2), 105-110.
- [109]. Dar, P., Shani, H., Evans, M.I. (2016). Cell-free DNA: comparison of technologies. *Clin Lab Med*, 36(2), 199–211.
- [110]. Rebouché, R. (2015). Non-Invasive Testing, Non-Invasive Counseling. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, 43(2), 228-240.
- [111]. Gil, M.M., Quezada, M.S., Revello, R., Akolekar, R., Nicolaidis, K.H. (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45(3), 249–66.
- [112]. Erbab, H., Pınar, G. (2015). Prenatal tanı yöntemi olarak fetal anöploidisi taramasında serbest fetal DNA (cffDNA) kullanımı ve güncel yaklaşımlar. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (4), 414-417.

- [113]. Suzumori, N., Ebara, T., Yamada, T., Samura, O., Yotsumoto, J., Nishiyama, M., et al. (2016). Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet.*, 61(7), 647–652.
- [114]. Piechan, J.L., Hines, K.A., Koller, D.L., Stone, K., Quaid, K., Torres-Martinez, W. et al. (2016). NIPT and informed consent: an assessment of patient understanding of a negative NIPT result. *J Genet Couns*, 25(5), 1127–1137.
- [115]. Vora, N.L., Robinson, S., Hardisty, E.E., Stamilio, D.M. (2016). The utility of a prerequisite ultrasound at 10–14 weeks in cell free DNA fetal aneuploidy screening. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 49(4), 465-469.
- [116]. Bianchi, D.W., Chudova, D., Sehnert, A.J., Bhatt, S., Murray, K., Prosen, T.L. et al. (2015). Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *JAMA*, 314(2), 162–169.
- [117]. Norton, M.E., Baer, R.J., Wapner, R.J. (2016). Cell-free DNA vs sequential screening for the detection of fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*, 214(6), 727.e1–e6.
- [118]. Ng, E.K., Tsui, N.B., Lau, T.K., Leung, T.N., Chiu, R.W., Panesar, N.S., et al. (2003). mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4748–4753.
- [119]. Lo, Y.M., Tsui, N.B., Chiu, R.W., Lau, T.K., Leung, T.N., Heung, M.M., et al. (2007). Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.*, 13, 218–223.
- [120]. Miura, K., Yoshiura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Nakayama, D., Ishimaru, T., et al. (2006). Cell-free DNA is more sensitive than cell-free mRNA as a marker for evaluation of fetal-maternal hemorrhage. *Clin Chem.*, 52, 2121–2123.
- [121]. Ng, E.K., Leung, T.N., Tsui, N.B., Lau, T.K., Panesar, N.S., Chiu, R.W., et al. (2003). The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem.*, 49, 727–731.
- [122]. Mattick, J.S. (2009). The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 5(4), e1000459.
- [123]. Zheng, R., Shen, Z., Tripathi, V., Xuan, Z., Freier, S.M., Bennett, C.F., et al. (2010). Polypurine-repeat-containing RNAs: A novel class of long non-coding RNA in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 1,123(Pt 21), 3734-3744.
- [124]. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- [125]. Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., et al. (2005). RAS is regulated by the *let-7* miRNA family. *Cell*, 120, 635-647.

- [126]. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858-862.
- [127]. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350-355.
- [128]. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
- [129]. 03.02.2018 tarihinde <http://www.mirbase.org/> sitesinden erişildi.
- [130]. Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- [131]. Croce, C. M., Calin, G. A. (2005). miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 122, 6-7.
- [132]. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-838.
- [133]. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129, 1401-1414.
- [134]. Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Kim, Y., Jin, H., Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*, 15, 18(24), 3016-3027.
- [135]. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-4060.
- [136]. Landthaler, M., Yalcin, A., Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14, 2162-2167.
- [137]. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R. (2003). Exportin5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011-3016.
- [138]. Ender, C., Meister, G. (2010). Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 1819-1823.
- [139]. Turchinovich, A., Samatov, T.R., Tonevitsky, A.G., Burwinkel, B. (2013). Circulating miRNAs: cell-cell communication function?. *Front Genet*, 4, 119.
- [140]. Cai, M., Kolluru, G.K., Ahmed, A. (2017). Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. *J Pregnancy*, 2017:6972732.
- [141]. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 18, 997-1006.
- [142]. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10513-10518.
- [143]. Turchinovich, A., Weiz, L., Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem. Sci.*, 37, 460-465.

- [144]. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinze, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.*, 39, 7223–7233.
- [145]. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 9, 654–659.
- [146]. Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., et al. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*, 3:e3694. doi: 10.1371/journal.pone.0003694
- [147]. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C. Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.*, 22, 125–132.
- [148]. Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 13, 423–433.
- [149]. Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Roxe, T., et al. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 33, 1392–1400.
- [150]. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 38, 7248–7259
- [151]. Knofler, M., Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet.* 4, 190.
- [152]. Qiu, C., Chen, G., Cui, Q., (2012). Towards the understanding of microRNA and environmental factor interactions and their relationships to human diseases," *Scientific Reports*, 2, 318.
- [153]. Khorram, O., Han, G., Bagherpour, R., Magee, T. R., Desai, M., Ross, M. G., Pearce, W. J. (2010). Effect of maternal undernutrition on vascular expression of micro and messenger RNA in newborn and aging offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(5), R1366-R1374.
- [154]. Prieto, D. M. M., Markert, U. R. (2011). MicroRNAs in pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, 88(2), 106-111.
- [155]. Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., Peng, C. (2013). MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5519-5544.
- [156]. Ramezanzadeh, M., Khosravi, S., Salehi, R. (2017). Cell-free Fetal Nucleic Acid Identifier Markers in Maternal Circulation. *Adv Biomed Res.*, 6, 89.
- [157]. Li, H., Ge, Q., Guo, L., Lu, Z. (2013). Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *BioMed research international*, 2013.

- [158]. Ventura, W., Koide, K., Hori, K., Yotsumoto, J., Sekizawa, A., Saito, H. (2013). Placental expression of microRNA-17 and-19b is down-regulated in early pregnancy loss. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 169(1), 28-32.
- [159]. Balcı, S., Görür, A., Gezgin, G., Cayan, F., Tamer, L. (2014). MicroRNA Expression Profiling in Patients With Gestational Diabetes. *Clin Chem Lab Med.*, 52, 1363
- [160]. Hamada, H., Arinami, T., Kubo, T., Hamaguchi, H., Iwasaki, H. (1993). Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Human genetics*, 91(5), 427-432.
- [161]. Hung, E. C. W., Chiu, R. W. K., Lo, Y. M. D. (2009). Detection of circulating fetal nucleic acids: a review of methods and applications. *Journal of clinical pathology*, 62(4), 308-313.
- [162]. Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Bentwich, Z. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS one*, 3(9), e3148.
- [163]. Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima, A., Kinoshita, A., Yoshiura, K. I., Masuzaki, H. (2010). Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*, 56(11), 1767-1771.
- [164]. Kotlabova, K., Doucha, J., Hromadnikova, I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation—identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *Journal of reproductive immunology*, 89(2), 185-191.
- [165]. Ladomery, M. R., Maddocks, D. G., Wilson, I. D. (2011). MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2(3), 253.
- [166]. Iljas, J.D., Guanzon, D., Elfeky, O., Rice, G.E., Salomon, C. (2017). Bio-compartmentalization of microRNAs in exosomes during gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 54, 76-82.
- [167]. 12.02.2018 tarihinde <https://www.qiagen.com/de/shop/sample-technologies/rna/mirna/mirneasy-serum-plasma-advanced-kit/#orderinginformation> sitesinden erişildi.
- [168]. 12.02.2018 tarihinde <https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system> sitesinden erişildi.
- [169]. Mégarbané, A., Ravel, A., Mircher, C., Sturtz, F., Grattau, Y., Rethoré, M.O., Delabar, J.M., Mobley, W.C. (2009). The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med*;11, 611-616.
- [170]. Kamhieh-Milz, J., Moftah, R. F. H., Bal, G., Futschik, M., Sterzer, V., Khorramshahi, O., Kamhieh-Milz, S. (2014). Differentially expressed microRNAs in maternal plasma for the noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome (trisomy 21). *BioMed research international*, 2014, 402475.

- [171]. Erturk, B., Karaca, E., Aykut, A., Durmaz, B., Guler, A., Buke, B., Kazandi, M. (2016). Prenatal evaluation of MicroRNA expressions in pregnancies with Down syndrome. *BioMed research international*, 2016.:5312674.
- [172]. Pettit, K. E., Hull, A. D., Korty, L., Jones, M. C., Pretorius, D. H. (2014). Noninvasive prenatal testing: a replacement for chorionic villus sampling and amniocentesis for advanced maternal age?. *Obstetrics & Gynecology*, 123, 165S-166S.
- [173]. Bianchi, D. W., Platt, L. D., Goldberg, J. D., Abuhamad, A. Z., Sehnert, A. J., Rava, R. P. (2012). Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstetrics & Gynecology*, 119(5), 890-901.
- [174]. Gu, H., Li, H., Zhang, L., Luan, H., Huang, T., Wang, L. (2012). Diagnostic role of microRNA expression profile in the serum of pregnant women with fetuses with neural tube defects. *Journal of neurochemistry*, 122(3), 641-649.
- [175]. Go, A. T., Visser, A., van Dijk, M., Mulders, M. A., Eijk, P., Ylstra, B. (2008). A novel method to identify syncytiotrophoblast-derived RNA products representative of trisomy 21 placental RNA in maternal plasma. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 444, 291.
- [176]. Maccani, M. A., Padbury, J. F., Marsit, C. J. (2011). miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PloS one*, 6(6), e21210.
- [177]. Enquobahrie, D. A., Qiu, C., Muhie, S. Y., Williams, M. A. (2011). Maternal peripheral blood gene expression in early pregnancy and preeclampsia. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2(1), 78.
- [178]. Zhu, S., Cao, L., Zhu, J., Kong, L., Jin, J., Qian, L. (2013). Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clinica Chimica Acta*, 424, 66-72.
- [179]. Kuhn, D. E., Nuovo, G. J., Martin, M. M., Malana, G. E., Pleister, A. P., Jiang, J. (2008). Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochem Biophys Res Commun*, 370, 473-7.
- [180]. Elton, T.S., Sansom, S.E., Martin, M.M. (2010). Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins. *RNA Biol*, 5, 540-547.
- [181]. Kotlabova, K., Doucha, J., Chudoba, D., Calda, P., Dlouha, K., Hromadnikova, I. (2013). Extracellular chromosome 21-derived microRNAs in euploid & aneuploid pregnancies. *The Indian journal of medical research*, 138(6), 935-943.
- [182]. Xu, Y., Li, W., Liu, X., Ma, H., Tu, Z., Dai, Y. (2013). Analysis of microRNA expression profile by small RNA sequencing in Down syndrome fetuses. *International journal of molecular medicine*, 32(5), 1115-1125.

- [183]. Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), 769.
- [184]. Kuhn, D. E., Nuovo, G. J., Terry Jr, A. V., Martin, M. M., Malana, G. E., Sansom, S. E. (2013). Chromosome 21-derived microRNAs provide an etiological basis for aberrant protein expression in human down syndrome brains. *The Journal of biological chemistry*, 288(6), 4228.
- [185]. O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., Boldin, M. P., Taganov, K. D., Nicoll, J. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 585-594.
- [186]. Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 2999-3004.
- [187]. Havelange, V., Garzon, R. (2010). MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *American journal of hematology*, 85(12), 935-942.
- [188]. Velu, C. S., Baktula, A. M., Grimes, H. L. (2009). Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood*, 113(19), 4720-4728.
- [189]. Lu, L. F., Liston, A. (2009). MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*, 127, 291-298.
- [190]. McPherson, J. P., Sarras, H., Lemmers, B., Tamblyn, L., Migon, E., Matysiak-Zablocki, E. (2009). Essential role for Bclaf1 in lung development and immune system function. *Cell death and differentiation*, 16(2), 331.
- [191]. Dejean, A. S., Hedrick, S. M., Kerdiles, Y. M. (2011). Highly specialized role of Forkhead box O transcription factors in the immune system. *Antioxidants & redox signaling*, 14(4), 663-674.
- [192]. Lim, J. H., Kim, S. Y., Kim, H. J., Kim, K. S., Han, Y. J., Kim, M. H. (2015). MicroRNAs as potential biomarkers for noninvasive detection of fetal trisomy 21. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(5), 827-837.
- [193]. Lim, J. H., Kim, D. J., Lee, D. E., Han, J. Y., Chung, J. H., Ahn, H. K. (2015). Genome-wide microRNA expression profiling in placentas of fetuses with Down syndrome. *Placenta*, 36(3), 322-328.
- [194]. Modi, B. P., Washington, S., Walsh, S. W., Jackson-Cook, C., Archer, K. J., Strauss III, J. F. (2017). Expression patterns of the chromosome 21 MicroRNA cluster (miR-99a, miR-125b and let-7c) in chorioamniotic membranes. *Placenta*, 49, 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Şenay BALCI FİDANCI
Doğum Tarihi :12.08.1980
E-mail :senaybalci@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Gazi Üniversitesi	1999-2003
Yüksek Lisans	Biyoloji	Gazi Üniversitesi	2003-2005
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2010-2012
Doktora	Tıbbi Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2012-2018

Görevler

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Mersin Üniversitesi	2011-2018

ESERLER

A- ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER:

1. Yücel, N., Balcı, Ş. (2010). Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. *Journal of food protection*, 73(2), 380-384.
2. Gorur, A., Fidancı, S. B., Unal, N. D., Ayaz, L., Akbayir, S., Yaroglu, H. Y., Tamer, L. (2013). Determination of plasma microRNA for early detection of gastric cancer. *Molecular biology reports*, 40(3), 2091-2096.
3. Kandemir, Ö., Fidancı, Ş. B., Demir, N., Görür, A., Tamer, L. (2013). Chronic hepatitis B and IL28B rs12979860 polymorphism: preliminary study. *Molecular biology reports*, 40(11), 6189-6194.
4. Ayaz, L., Cayan, F., Balci, Ş., Görür, A., Akbayir, S., Yıldırım Yaroğlu, H., Tamer, L. (2014). Circulating microRNA expression profiles in ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 34(7), 620-624.
5. Komur, M., Okuyaz, C., Celik, Y., Resitoglu, B., Polat, A., Balci, S., Beydagi, H. (2014). Neuroprotective effect of levetiracetam on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Child's Nervous System*, 30(6), 1001-1009.
6. Ertekin, S., Yıldırım, Ö., Dinç, E., Ayaz, L., Fidancı, Ş. B., Tamer, L. (2014). Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Molecular vision*, 20, 1057.

7. Arkoğlu, T., Batmaz, S. B., Barlas, I. O., Fidancı, Ş. B., Kuyucu, S. (2014). the association of serum vitamin D and vitamin D related gene polymorphisms with asthma control parameters in asthmatic children: a prospective one-year study: 1448. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69, 519-520.
8. Arikoglu, T., Kuyucu, S., Karaismailoglu, E., Batmaz, S. B., Balci, S. (2015, July). The association of vitamin D, cathelicidin, and vitamin D binding protein with acute asthma attacks in children. In *Allergy Asthma Proc* (Vol. 36, No. 4, pp. 51-8).
9. Balci, S., Ayaz, L., Gorur, A., Yildirim Yaroglu, H., Akbayir, S., Dogruer Unal, N., Tamer, L. (2016). micro RNA profiling for early detection of nonmelanoma skin cancer. *Clinical and experimental dermatology*, 41(4), 346-351.
10. Tombak, A., Gorur, A., Balci, S., Tiftik, N., Tamer, L. (2015). Circulating MicroRNAs in Newly Diagnosed Acute and Chronic Leukemias. *International Journal of Hematology and Oncology*, 27(4), 075-080.
11. Muşlu, N., Ercan, B., Akbayır, S., Balcı, Ş., Ovla, H. D., Bozlu, M. (2017). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a screening test in prostate cancer. *Turkish journal of urology*, 43(1), 30.
12. Balcı, S., Yıldız, P.O., Sucu, N., Yılmaz D.C., Tamer, L. (2017). T786C and G894T eNOS Polymorphisms as a Risk Assessment of Coronary Artery Disease. *J Cardiol Curr Res*, 8(4): 00290.
13. Örsçelik, Ö., Özkan, B., Arslan, A., Şahin, E. E., Sakarya, O., Sürmeli, O. A., Özcan, İ. T. (2018). Relationship between intrarenal renin-angiotensin activity and re-hospitalization in patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Anatolian journal of cardiology*, 19(3), 205.

B - ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİLER

1. Yaroglu, H. Y., Ayaz, L., Fidancı, S. B., Unal, Z. N. D., Gorur, A., Akbayir, S., Gumus, T. L. (2012). Circulating microrna expression profiling in healthy subjects in the east mediterranean of Turkey: p27-49. *The Febs Journal*, 279, 552-553.
2. Gorur, A., Fidancı, B. S., Ünal, Z. N. D., Ayaz, L., Akbayir, S., Yaroglu, H. Y., Gümüş, L. T. (2012). Determination of serum micrornas for early detection of gastric cancer: p27-103. *The Febs Journal*, 279, 569.
3. Yaroglu, H. Y., Bobusoglu, O., Gorur, A., Fidancı, S. B., Aydın, M., Yıldız, P. O., Tamer, L. (2013). Determination of CYP2C9 Gene Polymorphism in Myocardial Infarction Patients. Poster presentation (SW04.S16-291). 38th FEBS Congress. St. Petersburg, Russia. 6-11 July.

4. Ayaz, L., Görür, A., Yaroğlu, H. Y., Özcan, C., & Tamer, L. (2013). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 139(9), 1499-1506.
5. Bicer, A., Balci, S., Akbayir, S., & Tamer, L. (2014). AB0159 The Investigation of Blood Micro-Rna Levels in Ankylosing Spondylitis and the Relationship between Disease Activity and Functional Capacity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73, 855.
6. Gorur, A., Balci, S., Gezgin, G., Orekici Temel, G., Polat, G., Tamer, L. (2014). Determination of Reference Intervals for 24 Hours Urinary Catecholamine Metabolites Evaluated by High Performance Liquid Chromatography in Mersin. Poster (1478). IFCC WorldLab 22-26 June, Istanbul, Turkey.
7. Balci, S., Gorur, A., Gezgin, G., Cayan, F., Tamer, L. Filiz ÇAYAN, Lülüfer TAMER. (2014). MicroRNA Expression Profiling in Patients With Gestational Diabetes. IFCC WorldLab Istanbul 22-26 June, Istanbul, Turkey.
8. Balci, S., Gezgin, G., Gorur, A., Muslu, N., Ovla, D., Buyukbas, A.G., Sucu, N., Tamer, L. (2016). Investigation of Ischemia-Modified Albumin Levels in Patient with Acute Limb Ischemia. (P-09.04.4-050). 41st FEBS Congress. Kuşadası, İzmir.
9. Gorur, A., Gunasti, N., Balci, S., Bobusoglu, O., Yildirim, D. D., Uyar, H., Tamer, L. (2016, September). The evaluation of ischemia modified albumin as an early biomarker of acute myocardial infarction. In *FEBS JOURNAL* (Vol. 283, pp. 245-245). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
10. Akbayir, S., Unal, ND., Balci, S., Gorur, A., Yaroğlu, HY., et al. (2017). Plasma microRNA Expression Levels in Early Diagnosis of Colorectal Cancer I. International Scientific and Vocational Studies Congress.
11. Görür, A., Balcı, S., Günaştı, N., Yıldırım, DD., Çelik, A., Tamer, L. (2017). İnsan Antimikrobiyal Peptid LL-37 Seviyeleri ile Aterosklerotik Risk Faktörleri Arasındaki İlişkinin Saptanması. Uluslararası Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül, Erzurum.
12. Günaştı, N., Görür, A., Balcı, S., Türkegün, M., Tombak, A., Tamer, L. (2017). Akut Faz Reaktanı Olan Serum Pentraksin-3 ve C-Reaktif Protein Düzeylerinin Orak Hücre Anemisinde Araştırılması. Uluslararası Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül, Erzurum.
13. Balcı, S., Dinç, E., Yılmaz, A., Görür, A., Günaştı, N., Tamer, L. (2017). Primer Açık Açılı Glokom ve Psödoeksfolyatif Glokom Gelişiminde Pentraksin-3'ün Rolü. Uluslararası Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül, Erzurum.
14. Bobusoglu, O., Balcı, S., Camsarı, A., Gundes, A., Tamer, L. (2018). Investigation of miRNA Profiles in Patient Groups with ST Elevation Acute Myocardial Infarction and Non-ST

Elevation Acute Myocardial Infarction. 7th International Congress On Molecular Biology And Biotechnology. 25-27 Nisan, Konya.

C- ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER:

1. Fidancı, Ş. B., Yaroğlu, H. Y., Ünal, N., Güneş, G., Sert, G. A., Sucu, N., Gümüş, L. T. (2010). Venöz Tromboz Ön Tanısı Olan Hastalarda Faktör V Leiden, Protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C Mutasyonlarının Dağılımı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(3), 30-34.
2. Fidancı, Ş. B., Gümüş, L. T. Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3).
3. Akbayır, S., Fidancı, Ş. B., Şen, F., Bakır, A. Y., Temel, G. O., Ünal, N., Gümüş, L. T. Mersin Bölgesinde Homosistein, Vitamin A ve Vitamin E Düzeylerine Ait Referans Aralıklarının Belirlenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(1).
4. Yaroğlu, H. Y., Görür, A., Ayaz, L., Fidancı, Ş. B., Akbayır, S., Ünal, N., Gümüş, L. T. Mersin İlinde Sağlıklı Bireylerde MikroRNA Ekspresyon Profili. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3), 25-29.
5. Yıldırım, H., Görür, A., Fidancı, Ş. B., Ünal, N., Çamsarı, A., Tamer, L. Akut Miyokard İnfarktüsü ile Malondialdehit, Total Antioksidan Kapasite ve Nitrik Oksit Düzeyleri Arasındaki İlişki. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 13-16.
6. Günaştı, N., Balcı, Ş., Tamer, L. Pentraksinler. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(1), 65-71.

D- ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTAPLARINDA BASILAN BİLDİRİLER

1. Yaroğlu, H. Y., Güneş, G., Sert, G. A., Fidancı, Ş. B., Gümüş, L. T. Balcı Ş, Gümüş LT. Venöz tromboz ön tanısı olan hastalarda Faktör V Leiden, Protrombin, MTHFR C677T VE MTHFR A1298C Mutasyonlarının Dağılımı. XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi. Eskişehir, 27-30 Ekim 2010.
2. Gümüş, L. T., Ayaz, L., Ünal, N., Fidancı, Ş. B., Akbayır, S., Görür, A., Serin, MS., Kaplan, E., Ateş, N.A., Tombak, A., Tiftik, N., Arıcan, A., Ayan, E., Uzman, M., Emektaş, G. Akciğer Kanseri Ve Lösemi Hastalarında Dolaşımdaki Mirna'lara Ait Erken Sonuçlar. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi. Adana, 29-02 Kasım 2011.
3. Fidancı, Ş. B., YILDIZ, P.O., ÇAMSARI, A., Gümüş, L. T. eNOS T786C VE G894T polimorfizmlerinin koroner arter hastalığında risk olarak değerlendirilmesi. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi. Konya, 25-28 Eylül 2012.

4. Görür, A., Fidancı, Ş. B., Yaroğlu, H. Y., ÜNAL DOĞRUER, N., ÇAMSARI, A., Gümüş, L. T. Akut miyokard enfarktüsü ile malondialdehit, total antioksidan kapasite ve nitrik oksit düzeyleri arasındaki ilişki. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi. Konya, 25-28 Eylül 2012.
5. Arıkoğlu, T., Karaismailoğlu, E., Fidancı, ŞB., Birgül Tüfekçi, S., Gümüş, L. T., Kuyucu, S. XIX. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi. Antalya, 07-11 Kasım 2012.
6. Balci, S., Gorur, A., Yildirim Yaroglu, H., Akbayir, S., Dogruer Unal, N., Ayaz, L., Bulut, B., Türsen, Ü., Tamer, L. miRNA profiling of early detection of non-melanoma skin cancer. Poster (P-126). XXV. National Biochemistry Congress. İzmir, 3-6 September 2013.
7. Gorur, A., Balci, S., Akbayir, S., Yildirim Yaroglu, H., AYZAZ, L., Dogruer Unal, N., Utku Akgör, U., Çayan, F., Gezgin, G., Tamer, L. Endometrial Kanserde Mikrorna Düzeyleri. Poster (P-125). XXV. National Biochemistry Congress. İzmir, 3-6 September 2013.
8. Gorur, A., Balci, S., Gezgin, G., Erdoğan, S., Bobusoglu, O., Çayan, F., Tamer, L. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları ile MTHFR C677T ve A1298C Polimorfizmleri Arasındaki İlişki ve Alel Frekanslarının İncelenmesi. Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu Kalite- Standardizasyon - Akreditasyon, Malatya. Poster Sunumu (P8). Turk J Biochem, 2014; 39 (S1).
9. Balci, S., Gorur, A., Gezgin, G., AĞCA, E., Temel, G. O., Tombak, A., Tamer, L. Myeloproliferatif Neoplazmi Hastalarında, JAK2V617F Mutasyonu ve t(9;22) Translokasyonunun Araştırılması. Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu Kalite - Standardizasyon - Akreditasyon, Malatya. Poster Sunumu (P7). Turk J Biochem, 2014; 39 (S1).
10. Gezgin, G., Balci, S., Gorur, A., Yesiltepe, Y., Agca, E., Bobusoglu, O., Tamer, L. Vitamin B12 ve Folik Asit Düzeylerine Ait Referans Aralığının Belirlenmesi. Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu Kalite - Standardizasyon - Akreditasyon, Malatya. Poster Sunumu (P10). Turk J Biochem, 2014; 39 (S1).
11. Akbayir, S., Muslu, N., Balci, S., Ovla, H. D., Tamer, L., Bozlu, M. Prostat Kanseri Hastalarının Serum Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (Ngal) Düzeyleri. Poster (P-151). XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi. Antalya, 3-6 Kasım 2015.
12. Balci, S., Akbayir, S., Muslu, N., Ovla, H. D., Bozlu, M., Tamer, L. Prostat Kanseri Hastalarının Serum Nöropeptit Y Düzeyi. Poster (P-150). XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi. Antalya, 3-6 Kasım 2015.
13. Balci, S., Günası, N., Gezgin, G., Polat, G., Tamer, L. Mersin İlindeki Talasemi Gen Mutasyonlarının Dağılımı. Kahramanmaraş Talasemi Sempozyumu. 7-9 Nisan 2016.

E- KİTAPLAR

Kitap içinde bölüm yazarlığı

1. Şenay BALCI, Lülüfer TAMER. Pediatrik Anestezi Akıl Notları. 1. Baskı. Güneş Tıp Kitapevleri, 503-514, 2015 İstanbul.
2. Lülüfer TAMER, Şenay BALCI. Micrornas Treatment In Melanoma. Immunomodulatory and Immunosuppressive Drugs in Dermatology. Ed. Ümit Türsen. 1. Baskı, 201, Akademisyen Tıp Kitabevi, 2016.
3. Şenay BALCI, Lülüfer TAMER. Çinko metabolizması. Dermatolojik hastalıklarda çinkonun önemi. Ed. Ümit Türsen. 1. Baskı, 135, Selen Yayıncılık, 2016.

