

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Maternal Periferik Kanda Fetal Genomik DNA'nın
Belirlenmesi

UĞUR AKPULAT

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Maternal Periferik Kanda Fetal Genomik DNA'nın
Belirlenmesi

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

UĞUR AKPULAT

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN

DEÜAFS Proje No: 2005.KB.SAG.004

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

DİZİN

DİZİN	i
A. TABLO DİZİNİ	iv
B. RESİM DİZİNİ	v
C. KISALTMALAR	vi
D. Teşekkür	vii
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Genetik Hastalıkların Kökenleri	5
2.2. Prenatal Tanı	6
2.2.1. Prenatal Tanı Yöntemleri	8
2.3. Sirküler Kanda Nükleik Asitlerin Varlığı	11
2.4. Anne Kanında Fetal Hücrelerin Varlığı	12
2.4.1. Anne Kanında Fetüse Ait Hücrelerin Sıklığı	13
2.4.2. Anne kanındaki fetal Hücre Tipleri	14
2.4.2.1. Trofoblastlar	14
2.4.2.2. Lökositler	15
2.4.2.3. Eritroblastlar	15
2.5. Hastalıklarda sirküler ekstraselüler DNA ve RNA	16
2.5.1. Otoimmün hastalıklarda sirküler DNA ve Mikrokimerizm	17
2.5.2. Kanserde sirküler DNA ve RNA	18
2.5.3. Maternal plazmada sirküler DNA ve RNA	20
2.6. Anne kanındaki sirküler fetal DNA'nın varlığı, biyolojisi ve potansiyel tanı uygulamaları	21
2.7. Maternal periferik kandaki fetal DNA'nın analizi ile fetüsün cinsiyetinin belirlenmesi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Örnekler	25
3.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Serum Ayırıştırma	25
3.3. Serum Örneklerinden DNA izolasyonu	26
3.3.1. Ticari İzolasyon Kiti Yöntemi	26
3.3.2. Serum Isıtma Yöntemi İle DNA'nın Direkt Elde Edilmesi	27
3.4. Kit ile Elde Edilen DNA Solüsyonlarından Spektrofotometre ile DNA'nın Safılık ve Miktarının Belirlenmesi	27
3.5. DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi	28
3.6. DNA izolasyon ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	29
3.7. Konvansiyonel PCR Deneyleri	29
3.7.1. DYS14 Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu	29
3.7.2. SRY Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu	31
3.7.3. İnsan GAPDH Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu	33
3.7.4. Fare GALT Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu	33

3.8. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	34
3.9. DYS14 ve SRY Dizilerine Özgü Konvansiyonel PCR Reaksiyonlarının Duyarlılıklarının Belirlenmesi	34
3.10. Konvansiyonel PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesine Yönelik Deneyler	35
3.10.1 DYS14 Dizisi ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	35
3.10.2 SRY Dizisi ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	35
3.10.3 İnsan GAPDH Dizisi ile Fetal Cinsiyeti Belirleme Verimliliğinin Değerlendirilmesi	36
3.10.4 Fare GALT Dizisi ile Kalıp DNA Varlığının Kontrolü	36
3.11. Gerçek Zamanlı PCR Deneyleri	37
3.11.1. DYS14 Dizisi İçin Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu	37
3.11.2 SRY Dizisi İçin Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu	38
3.12. DYS14 ve SRY Dizilerine Özgü Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonlarının Duyarlılıklarının Belirlenmesi	39
3.13. Gerçek Zamanlı PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesine Yönelik Deneyler	39
3.13.1 DYS14 Dizisi ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	39
3.14. Antikontaminasyon Ölçütleri	40
4.BULGULAR	41
4.1. Olgular	41
4.2. Serum ve Kan örneklerinden Ticari Kit ile İzole edilen DNA'nın Spektrofotometrik Analizi	43
4.3. Ticari Kit ve Serum Isıtma Yöntemi ile İzole Edilen DNA'ların Agaroz jel Elektroforezi	44
4.4. İnsan GAPDH Dizisine özgü Konvansiyonel PCR Reaksiyonu ile Serum Örneklerinden İzole Edilen DNA çözeltilerinde DNA olup olmadığının araştırılması	44
4.5. DYS14 Dizisine Özgü Konvansiyonel PCR Duyarlılığının Belirlenmesi	45
4.5.1 En az belirleyebildiği erkek DNA'sı miktarının ve kadın DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının ölçülmesi	45
4.5.2. Erkek Serumundan İzole Edilen DNA'nın DYS14 ile Belirlenmesi	46
4.6. SRY Dizisine Özgü Konvansiyonel PCR Duyarlılığının Belirlenmesi	49
4.6.1. En az belirleyebildiği erkek DNA'sı miktarının ölçülmesi	49
4.6.2. Kadın DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının ölçülmesi	50
4.6.3. Erkek Serumundan İzole Edilen DNA'nın SRY ile Belirlenmesi	50
4.7. İnsan GAPDH Dizisine Özgü Konvansiyonel PCR Duyarlılığının Belirlenmesi	52
4.7.1. En az belirleyebildiği DNA miktarının ölçülmesi	52
4.7.2. Serumundan İzole Edilen DNA'nın İnsan GAPDH dizisine özgü PCR ile Belirlenmesi	53
4.8. Fare GALT Dizisine Özgü Konvansiyonel PCR Duyarlılığının Belirlenmesi	54
4.8.1. Fare GALT Dizisine özgü PCR reaksiyonunun insan DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının kontrolü	54
4.8.2. DYS14 dizisine özgü Konvansiyonel PCR reaksiyonunun dişi fare DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının kontrolü	55
4.8.3 DNA izolasyonuna başlamadan önce serum örneğine ne kadar dişi fare DNA'sı eklenmesi gerektiğinin ölçülmesi	56
4.9. Konvansiyonel PCR ile anne serumundan fetal cinsiyetin belirlenmesi	57
4.9.1 DYS14 Dizisine özgü konvansiyonel PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	57
4.9.2 SRY Dizisine özgü konvansiyonel PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	59
4.10. DYS14 Dizisine Özgü Gerçek Zamanlı PCR Duyarlılığının Belirlenmesi	60

4.11. SRY Dizisine Özgü Gerçek Zamanlı PCR Duyarlılığının Belirlenmesi	62
4.12. DYS14 Dizisine özgü Gerçek Zamanlı PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	64
4.13. SRY Dizisine özgü Gerçek Zamanlı PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi	65
4.14 Klinik verilerle olguların PCR sonuçlarının karşılaştırılması	65
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
7. KAYNAKLAR	77
8. EKLER	83

A. TABLO DİZİNİ

<u>Tablo 1</u> : Down sendromunun doğum öncesinde tarama testleriyle belirlenebilme oranları	10
<u>Tablo 2</u> : Maternal kandaki sirküler fetüs DNA'sından fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar	24
<u>Tablo 3</u> : Kullanılan hedef dizilere ait primerler ve baz dizileri	30
<u>Tablo 4</u> : DYS14 ve İnsan GAPDH dizilerinin konvansiyonel PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	30
<u>Tablo 5</u> : DYS14 ve İnsan GAPDH dizilerinin konvansiyonel PCR amplifikasyonu için uygun sıcaklık profilleri	31
<u>Tablo 6</u> : SRY dizisinin konvansiyonel PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	32
<u>Tablo 7</u> : SRY dizisinin konvansiyonel PCR amplifikasyonu için uygun sıcaklık profili.	32
<u>Tablo 8</u> : fare GALT geninin konvansiyonel PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	33
<u>Tablo 9</u> : fare GALT geninin konvansiyonel PCR amplifikasyonu için uygun sıcaklık profili	34
<u>Tablo 10</u> : DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	37
<u>Tablo 11</u> : DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı profili	38
<u>Tablo 12</u> : SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	38
<u>Tablo 13</u> : SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı profili	39
<u>Tablo 14</u> : Çalışmaya katılan olgulara ait gebelik bilgileri	42
<u>Tablo 15</u> : Sağlıklı erkek serumlarından izole edilen DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları	43
<u>Tablo 16</u> : Sağlıklı gebe olmayan kadın serumlarından izole edilen DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları	43
<u>Tablo 17</u> : Sağlıklı erkek, gebe olmayan sağlıklı kadın ve dişi fare'nin kan örneklerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları	43
<u>Tablo 18</u> : Çalışmaya katılan gebe olguların DYS14 dizisi için konvansiyonel PCR sonuçları	58
<u>Tablo 19</u> : DYS14 dizisine özgü PCR reaksiyonu sonucu erkek fetusa gebe olduğu belirlenen olguların SRY dizisi için amplifikasyon sonuçları	60
<u>Tablo 20</u> : Çalışmaya dahil edilen olguların klinik verileriyle DYS14 konvansiyonel PCR sonuçlarının karşılaştırılması	66
<u>Tablo 21</u> : DYS14 PCR analizi ile fetal cinsiyeti belirleme istatistiksel oranları	67
<u>Tablo 22</u> : Çalışmaya dahil edilen olguların klinik verileriyle SRY konvansiyonel PCR sonuçlarının karşılaştırılması	68
<u>Tablo 23</u> : SRY PCR analizi ile fetal cinsiyeti belirleme istatistiksel oranları.	69

B. RESİM DİZİNİ

Resim 1 : Ticari Kit ve Serum Isıtma Yöntemi ile İzole Edilen DNA'ların Agaroz jel Elektroforezi.	44
Resim 2 : İnsan GAPDH dizisi için amplifikasyon ürünleri.	45
Resim 3 : DYS14 dizisi için amplifikasyon ürünleri.	46
Resim 4 ve 5: Kalıp olarak NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı DYS14 dizisi için sırasıyla tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri.	48
Resim 6 ve 7 : Kalıp olarak serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı DYS14 dizisi için sırasıyla tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri.	48
Resim 8: SRY dizisi için amplifikasyon ürünleri. En az belirleyebildiği erkek DNA'sı miktarının ölçülmesi.	49
Resim 9: SRY dizisi için amplifikasyon ürünleri. Kadın DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının ölçülmesi.	50
Resim 10 ve 11: Kalıp olarak NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı SRY dizisi için sırasıyla tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri	51
Resim 12 ve 13: : Kalıp olarak serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı SRY dizisi için sırasıyla tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri.	52
Resim 14: İnsan GAPDH dizisi için amplifikasyon ürünleri. En az belirleyebildiği DNA miktarının ölçülmesi.	53
Resim 15: İnsan GAPDH dizisi için amplifikasyon ürünleri. Serumundan İzole Edilen DNA'nın İnsan GAPDH dizisine özgü PCR ile Belirlenmesi.	54
Resim 16: Fare GALT dizisi için amplifikasyon ürünleri.	55
Resim 17: DYS14 dizisine özgü Konvansiyonel PCR reaksiyonunun dışı fare DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının kontrolü.	56
Resim 18: DNA izolasyonuna başlamadan önce serum örneğine ne kadar dışı fare DNA'sı eklenmesi gerektiğinin ölçülmesi.	56
Resim 19: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, amplifikasyon grafiği.	61
Resim 20: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, erime ısısı (T _m) grafiği.	62
Resim 21: SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, amplifikasyon grafiği.	63
Resim 22: SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, erime ısısı (T _m) grafiği.	63
Resim 23: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR reaksiyonu ile fetal cinsiyetin belirlenmesi deneyi, erime ısısı (T _m) analizi.	64

C. KISALTMALAR

CVS	Koryonik villus örneklemesi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü'nün
TSBYK	Türkiye Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı
USG	Ultrasonografi
FISH	Fluoresan in Situ Hibridizasyon
AFP	Alfa-fetoprotein
HCG	İnsan koryonik gonadotropin
YPO	Yalancı pozitif oran
NT	Nokal translusensi
HbF	Fetal hemoglobin
HLA	İnsan lökosit antijenleri
ÇKKH	Çekirdekli kırmızı kan hücreleri
SLE	Sistemik lupus eritematozus
RT-MSP-PZR	Gerçek zamanlı metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu
RhD	rhesus D
β hCG	İnsan koryonik gonodotropinin β alt birimi
hPL	İnsan plasental lakogen
HbE	Hemoglobin E

TEŞEKKÜR

*Bu tezin oluşması ve sonuçlanmasında emeğini esirgemeyen, çalışmalarım sırasında çıkan sorunların çözümüne yönelik fikirlerinden ve yüksek lisans eğitimime büyük katkılarından dolayı ve ayrıca anlayışlı, hoşgörülü ve sevecen tutumlarından dolayı değerli hocam ve tez danışmanım **Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Eresen**'e,*

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel desteklerinden ve sağladıkları laboratuvar olanaklarından dolayı başta Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya ve tüm değerli hocalarıma,

Tezim için gerekli olgulara ulaşmamda ve örneklerin toplanması sırasında gösterdikleri ilgiden ve katkılardan dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Namık Demir, Prof. Dr. Murat Celiloğlu, Doç. Dr. Sebahattin Altınyurt ve Yrd. Doç. Dr. Serkan Güçlü'ye ,

Laboratuvar çalışmalarımda ihtiyacım olan her an yardıma koşan sevgili arkadaşlarım Filiz Paralı, Sait Tümer ve Şebnem Yıldırımcan'a,

Sıcak, dürüst, ilgili dostluğundan dolayı değerli arkadaşım Dilay Çığlıdağ'a,

Gösterdikleri anlayıştan ve duydukları güvenden dolayı değerli patronlarım Dr. Filiz Bal, Dr. Ayşe Gökçen ve GENTAN'daki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatıma birer birer giren Tüm Zozo'lara,

*Hayatımın en değerli ve en anlamlı varlıkları canım **aileme**, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

ÖZET

MATERNAL PERİFERİK KANDA FETAL GENOMİK DNA'NIN BELİRLENMESİ*

Uğur AKPULAT

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Inciraltı,
İZMİR

Yeni bir keşif olan anne serum ve plazmasında fetüse ait serbest DNA'nın bulunması girişimsel olmayan prenatal tanı yöntemleri için yeni uygulamaların başlamasını sağlamıştır. Koryonik villus örnekleme (CVS) ve amniyosentez gibi girişimsel prenatal tanı yöntemleri fetüs morbiditesi ve mortalitesiyle ilişkili riskleri taşıyan prosedürleri gerektirmektedir. Bununla beraber girişimsel olmayan prenatal tanı yöntemleri girişimsel tanı yöntemlerinin risklerini ortadan kaldırdığı gibi aynı zamanda girişimsel yöntemlerin uygulanacağı hamile kadınların duydukları endişeleri de ortadan kaldırmaktadır. Girişimsel olmayan prenatal tanı yöntemlerinden biri anne serum veya plazmasından fetüs DNA'sının izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analizi yapılarak fetüs cinsiyetinin belirlenmesidir. Girişimsel olmayan yöntemle fetüs cinsiyetinin belirlenmesi, X' e bağlı resesif bir hastalık riski taşıyan fetüslere girişimsel yöntemlerin uygulanıp uygulanmayacağı konusunda ön test olarak kullanılabilir. Eğer fetüsün cinsiyeti dişi ise girişimsel yöntemlerin uygulanması gereksizdir. Bugüne kadar gelişen teknolojiyle birlikte anne plazma ve serumundaki fetüs DNA'sının analizi ile farklı duyarlılıklarda fetüsün cinsiyeti belirlenmiştir.

Bu çalışmada PCR analizi ile gebe kadınların periferik kanındaki fetüse ait genetik materyalin varlığı değerlendirilmiştir. Bu yüzden gebe kadınların periferik kanından ayrıştırılan serum örneklerinden izole edilen total DNA içinde fetal DNA'nın varlığı Y kromozomuna özgün dizilerin (DYS14 ve SRY) konvansiyonel ve gerçek zamanlı PCR analizi ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 40 olgudan 25'inin kontrol yöntemleri ile sonuçlarına ulaşılmıştır. İstatistiksel analizler bu 25 olgu üzerinden yapılmıştır. Çalışmamız anne serumunda fetüse ait DNA'nın varlığını DHS14 ve SRY dizilerine özgü konvansiyonel PCR analizleri ile sırasıyla %80 ve %53.3 doğrulukta gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prenatal tanı, PCR, fetal DNA, sirküler DNA, maternal serum, fetüs cinsiyetinin belirlenmesi.

* Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Şubesi tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2005.KB.SAG.004

ABSTRACT

DETECTION OF FETAL GENOMIC DNA IN MATERNAL PERIPHERAL BLOOD*

Uğur AKPULAT

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics,
Izmir, Turkiye

The recent discovery of the presence of fetal DNA in maternal plasma and serum has offered new approaches to non-invasive prenatal diagnoses. Invasive prenatal diagnosis methods such as Chorionic villus sampling (CVS) and amniocentesis, entail procedure-related risks of fetal morbidity and mortality; however, non-invasive prenatal diagnoses would not only obviate the procedure-related risks of an invasive prenatal diagnosis, but also remove the anxiety associated with them on the part of pregnant women intending to undergo the procedure. An example of non-invasive prenatal diagnosis is fetal gender determination by isolation of fetal DNA from maternal plasma and serum and analysis with polymerase chain reaction (PCR). Fetal gender determination to non-invasive prenatal diagnosis is as a “pre-test” to determine whether invasive prenatal diagnosis should be performed on a fetus having a risk of an X-linked recessive disorder. If gender of fetus is female, the application of invasive methods is unnecessary. By now, along with the improving technology the fetal gender has been determined in different sensitivity by analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum.

In this study, it has been evaluated the presence of fetal genetic material in the peripheral blood of pregnant women by means of PCR analysis. For this reason, it has been aimed to show the presence of fetal DNA in total DNA isolated from serum sampling decomposed the peripheral blood of pregnant women with the help of conventional and real-time PCR analysis with Y chromosome specific sequences (DYS14 and SRY). We only reached 25 cases' results in 40 cases examined. All statistical analysis made with these 25 cases. Our study showed the presence of fetal DNA in maternal serum by means of conventional PCR analysis of *DYS14* and *SRY* sequences in accuracy %80 and %53.3 respectively .

Key words: Prenatal diagnosis, PCR, fetal DNA, circulating DNA, maternal serum, fetal sex determination.

* This study was supported by Dokuz Eylül University, Scientific Research Department.
Project No: 2005.KB.SAG.022

1.GİRİŞ VE AMAC:

Son yıllarda doğum öncesi genetik tanı çok ilerleme kaydetmiştir. 1950'lerde genetik danışmanlık elde var olan tek imkandı. Çiftler, tanınmış birkaç 'Mendelian' geçişli hastalığın tekrarlama riski açısından bilgilendiriliyor, fakat bu çiftlere hiçbir tanı ya da işlem yapılamıyordu (1). 1968'de amniyosentez yoluyla anne karnında iken tanı koymanın mümkün hale gelmesiyle, aniden büyük bir değişim oldu. 1982-1984 yılları arasında koryonik villüs örnekleme (CVS) ile gebeliğin ilk 3 ayında doğum öncesi tanının yapılabildiği gösterildi (2). Bu önemli ilerlemelere rağmen, doğum öncesi genetik tanı eksiklikler devam etmektedir. Hem CVS hem de amniyosentez girişimsel yöntemlerdir ve gebeliğin sonlanması açısından düşük fakat ölçülebilir bir risk taşırlar (1). Ayrıca, CVS'in ardından ciddi kol ve bacak anomalileri bildirilmiştir (3). Muhtemel komplikasyonları sebebiyle, bu testler bütün toplum geneline sunulamayıp, sadece genetik bozukluklar için yüksek risk taşıyan gebe kadınlara uygulanabilir. Daha önceden 'Mendelian' geçişli bir hastalığa sahip çocuk doğurma hikayesi olan gebe kadın ya da 35 yaş üstünü kapsayan ileri gebelik yaşı buna örnek verilebilir (1). Bu metotlara eşlik eden risklerden dolayı, girişimsel olmayan yöntemlere büyük gereksinim vardır. Günümüzde, klinik genetik uzmanlarının kullanabileceği metotlar ultrason ve anne serum analizi ile sınırlıdır (4). Ancak ne ultrasonun ne de anne serum analizinin girişimsel testlerin duyarlılığına yaklaşamaması nedeniyle, doğum öncesi genetik tanı için hem risk taşımayan, hem de duyarlılığı yüksek olan yeni bir yöntem gereksinim duyulmuştur. Böylece, anne kanından yeterli miktarda fetüse ait hücre elde edilerek genetik tanı için incelenmesi ve anne kanında serbest olarak dolaşan fetüs DNA'sının incelenmesi fikirlerine odaklanılmıştır. Bu yöntemlerde şimdiki girişimsel yöntemlere eşlik eden risklerin olmaması ve böylece bütün gebeleri takip etme olanağının doğabilmesi de bu olgulara yönelmede uyarıcı bir etken olmuştur (1, 5).

1997'de Lo ve arkadaşları anne plazma ve serumunda serbest fetüs DNA'sının var olduğunu göstermişlerdir (6). Bu serbest DNA'nın miktarı, anne kanında bulunan fetal hücrelerin analizinde olduğu gibi herhangi bir karmaşık izolasyon ve zenginleştirme prosedürlerine gerek duymadan analiz yapmaya izin verecek kadar yeterlidir (7). Böylece keşfinden günümüze kadar gelişen teknolojiyle birlikte anne plazma ve serumundaki fetüs DNA'sının analizi ile farklı duyarlılıklarda fetüsün cinsiyeti belirlenmiştir (6, 8-12). Diğer bir şekilde Fetal cinsiyet belirlemesi en erken olarak CVS ile yapılmaktadır. CVS ile elde edilen fetal dokudan yapılan genetik analizler ile sonuca gidilmektedir. Ancak CVS'in %3.7 düşük

riskine sahip girişimsel bir uygulama olması cinsiyete bağlı genetik hastalıkların erken prenatal tanısında anne kanındaki sirküler fetal DNA'nın önemini artırmaktadır (13). Konvansiyonel PCR ile en erken yedinci ve gerçek zamanlı PCR ile en erken beşinci gebelik haftasında anne kanından fetal cinsiyet analizi güvenilir bir biçimde gerçekleştirilmiştir (10, 11).

Bu proje kapsamında gebe kadınların periferik kanındaki fetüse ait genetik materyalin varlığının PCR analizi ile gösterilebilirliğine bakılmıştır. Bu yüzden gebe kadınların periferik kanından ayırıştırılan serum örneklerinden izole edilen total DNA içinde fetal DNA'nın varlığı Y kromozomuna özgün dizilerin konvansiyonel ve gerçek zamanlı PCR analizi ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Hedef olarak farklı dizilerin kullanılması durumunda testin duyarlılığının ne ölçüde değişeceğini belirlemek için Y kromozomu üzerinde bulunan DYS14 ve SRY dizilerine özgün primerler kullanılmıştır. Ayrıca serumdan DNA elde edilmesi sırasında farklı prosedürlerin yöntemin duyarlılığına etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Konvansiyonel ve gerçek zamanlı PCR analizleri arasındaki duyarlılık farkları bulunmaya çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. GENETİK HASTALIKLARIN KÖKENLERİ

Genetik hastalıklar genellikle ciddi, tedavileri mümkün olmayan ya da çok zor olan hastalıklardır. Bu nedenlerle bu hastalıklardan korunma son derece önemlidir. Günümüzde en etkili korunma yöntemi ciddi genetik hastalıklı çocukları olan ailelere genetik danışma ve mümkün olduğu durumda prenatal tanı hizmeti vermektir (14). Bir hastalığın genetik temeli hakkında bilgi sahibi olmak yüksek oranda söz konusu genetik hastalığın tipine bağlıdır. Genetik hastalıklar tek gen hastalıkları, kromozomal ve multifaktöriyel olmak üzere üç ana grup altında toplanabilirler (15).

Tek gen hastalıkları tek bir gendeki bir değişiklikten meydana gelirler ve birçok farklı tipleri vardır. Tek tek genellikle nadir gözlenirler ancak tümü göz önünde bulundurulunca nüfusun yaşam süreci boyunca yaklaşık %2'sini etkilerler (15). Tek gen mutasyonuna bağlı hastalıklar otozomal dominant, otozomal resesif, X' bağlı dominant, X'e bağlı resesif olmak üzere başlıca 4 kalıtım şeklini gösterir. En sık rastlanan hastalık grubu otozomal resesif olanlardır. Anne baba genellikle sağlıklı görünümde heterozigot taşıyıcıdır. Hasta kişide gen homozigot olarak bulunur. Çocuklarda hastalığın görülme oranını etkileyen faktörlerden biri akraba evlilikleridir. En kolay tanınan hastalık grubu otozomal dominant olanlardır. Hasta olan kişinin anne veya babası genellikle hastadır. Sorun, hastalığın ileri yaşlarda ortaya çıktığı veya ekspressivitenin değişken ya da penetransın tanı olmadığı durumlarda ortaya çıkar. Bazı hastalıkların ortaya çıkmasında ebeveynin cinsiyeti veya yaşı etkili olabilmektedir. Olgular sporadik olarak da görülebilmektedir. X'e bağlı resesif hastalıklarda mutant gen X kromozomu üzerinde bulunur ve hastalık hemen daima erkeklerde görülür. Bazı durumlarda risk oranlarının değerlendirilmesinde zorluklar olabilir. Özellikle sağlıklı normal kadın ile sağlıklı heterozigot taşıyıcı kadınları ayırt edebilme zorluğudur. X'e bağlı dominant kalıtım şekli otozomal dominant kalıtım şekline çok benzer. Fakat X'e bağlı dominant hastalığın kızlarda sık görülmesi ve babadan erkek çocuğa geçiş olmaması ile ayrılır (16).

Kromozomal hastalıklı bir birey bir kromozomun tümü ya da bir kısmı bakımından ya bir eksiklik ya da fazlalığa sahiptir. Sorunlar bu tür fazlalık ve eksikliklerden kaynaklanır.

Kromozomal hastalıklar diğerlerine göre yaygındır. Gebeliklerin yaklaşık %15'i ilk üç aylık dönemde düşük ile sonuçlanmaktadır ve bunların yarısı kromozomal bozukluktan kaynaklanmaktadır. Ayrıca doğan bebeklerin yaklaşık %0,7'si kromozomal bozukluğa sahiptir (15). Kromozomal abnormalitenin 1/3'ü otozomal anöploidi ve 2/3'ü ise seks-kromozomal anöploididir. Kromozomal hastalıkların aile bireylerinde dengeli translokasyon taşıyıcılığı ya da anne yaşı ile bağlantılı olması dışında, büyük çoğunluğunun aile içinde tekrarlama riski yoktur. Ölü doğum ya da neonatal ölüm olgularında çeşitli araştırma sonuçları %6–7 oranında kromozomal abnormalitenin bulunduğu gösterilmiştir. Bunların %1'inden fazlası seks kromozom anomalisi, %3'ü otozomal trisomiler ve geri kalanları yapısal ve diğer anomalilerdir. Erken spontan abortus fetuslarında büyük çoğunluğu anöploidi olan kromozom aberasyonlarının %25–60 arasında olduğu gösterilmiştir. Abortus materyalinde %3–4 arasında strüktürel anomaliler saptanmıştır. Tekrarlayan abortusları olan çiftlerden yapılan çalışmalarda anne-babadan birinin dengeli kromozom anomalisi taşıma olasılığı yaklaşık %12 bulunmuştur. Daha önceden multipli malformasyonlu çocuğu olan, ya da ikinci trimesterde multipli major malformasyonlu fetuslarda %30'a yakın kromozomal hastalık saptanmıştır. Prenatal genetik danışma açısından en önemli ve en sık görülen kromozom hastalığı Down sendromudur. Yaklaşık 600–700 doğumda bir görülür. Anne yaşı arttıkça Down sendromlu çocuk doğurma riski artar.

Multifaktoriyel hastalıkların ortaya çıkmasında birden fazla mutant genle birlikte çevresel faktörlerin rolü vardır. Multifaktöriyel hastalıklar bebeklerde doğum defektlerinden yetişkinlerde kalp hastalıkları, şeker hastalığı gibi yaygın hastalıklara kadar geniş bir hastalık grubunu kapsar. Bu gruptaki hastalıkların toplumun %60'ından fazlasını etkilediği düşünülmektedir. Hastalıkları oluşturan genler minör genlerdir. Bu hastalıklar Mendeliyen kalıtım göstermedikleri, yani belli kurallara göre izleyen kuşağa geçemedikleri için tekrarlama riskini de kesin olarak hesaplama olanağı yoktur. Genellikle böyle bir hastalığı gösteren bir çocuktan sonra, ikinci bir çocuk için risk %5'dir (15,16).

2.2. PRENATAL TANI

Prenatal tanı denince akla gelen fetustaki normal dışı bulguların gebeliğin mümkün olduğu kadar erken döneminde belirlenmesi ve gerekiyorsa gebeliğin sonlandırılmasıdır. Söz konusu problemler kalıtsal geçiş gösteren hastalıklar olabildiği gibi, değişik nedenlerle oluşan

malformasyonlar, intrauterin enfeksiyonlar, teratojenik etkenler ve benzeri patolojiler de olabilir. Prenatal tanı sonucu fetus hasta bulunursa etik/yasal ve sosyo-ekonomik değerler göz önünde tutularak gebeliğe son verilir ya da tedaviye gidilir (14). Prenatal tanıda başlıca amaç, yüksek riskli gebeliklerin ve yüksek riskli doğumların erkenden belirlenmesi; anne ve çocuğun sağlık ve hayatını etkileyen risklerin önlenmesi; patolojinin biran önce belirlenmesi ve biran önce tedaviye başlanmasıdır (17,18). Prenatal tanı ile elde edilen bilgi gebelik süresince, doğuma yakın, doğum sırasında ve bazı durumlarda da gebeliğin sonucunu geliştirmek için, doğum uzmanına ve aile hekimine yardımcı olmaktadır. Prenatal tanının varlığı çiftlere, anomalili bir çocuğun doğumu için hazırlık, etkilenmiş bir gebeliğin sonlandırılması ya da spina bifida gibi fetal cerrahinin uygulandığı gebeliklerde fetal tedavinin kullanılmasını sağlayan, başka türlü elde edilemeyecek seçenekler sunar (18,19).

Prenatal tanıya ailesel, maternal ya da fetal bir durumun bir malformasyon, kromozom anomalisi veya genetik bir hastalık için yüksek risk oluşturduğu durumlarda gidilir. Bazı prenatal tanı çalışmaları ultrasonografi incelemesi veya maternal serum taraması gibi testlerin anormal sonuçlarından yola çıkılarak başlatılır. Başka durumlar ise, ebeveynler bir genetik hastalıktan etkilenmiş olabilirler, otozomal resesif ya da X'e bağlı resesif bir hastalığın taşıyıcısı olabilirler ya da spesifik bir genetik hastalık için artmış risk gösteren bir etnik grubun üyesi olabilirler (19).

Konjenital ve genetik bozuklukların görülme sıklığı toplumlar arası farklılıklar göstermektedir; konu hakkında bilgi sahibi olmak için Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1992 yılında 14 milyona yakın doğum üzerinden elde ettiği verilere bakıldığında konjenital ve genetik bozuklukların görülme sıklığı bin canlı doğumda 42,0'dır. Konjenital malformasyonların görülme sıklığı binde 31,0 olup bunların %22'si erken dönemde ölmektedir. Kromozom anomalilerinin görülme sıklığı bin canlı doğumda 3,2'dir. Bunların %34'ü erken dönemde ölmektedir. Diğer kalıtsal hastalıkların görülme sıklığı ise binde 7,8 olup ağırlıklı olarak resesif geçiş göstermektedir (16). Türkiye Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma (SBYK) planı verileri doğrultusunda ülkemizdeki duruma bakıldığında 1999 yılı itibarıyla 3 milyon civarında özürlü çocuk olduğu tahmin edilmektedir. Çocukların çoğu önlenebilir nedenlerle özürlü doğmakta veya özürlü olma riski taşımaktadır (20).

2.2.1. Prenatal Tanı Yöntemleri

Prenatal tanıda anne çevre (maternal çevre), fetus ise hasta olarak kabul edilmektedir. Fetal tıbbın en önemli karakteristiği doktorun hasta ile doğrudan temas edememesidir. Bu nedenle özel görüntüleme tekniklerine ihtiyaç vardır. Diğer önemli bir konu ise fetusa yapılacak müdahalelerin anne üzerinden olacak olmasıdır. Fetusa başka bir erişim şekli yoktur. Anne üzerinden yapılacak müdahaleler ya da yaklaşımlar anneyi doğrudan etkileyecektir.

Prenatal tanı testleri, tarama testleri ve tanı testleri olmak üzere iki kategoride değerlendirilebilir. Anne yaşının sorulması, anne serumu taraması ve ultrason incelemesi gibi girişimsel olmayan yöntemler tarama testleri içinde yer alırken koryonik villus örnekleme (CVS), amniyosentez ve kordosentez örnekleme gibi girişimsel yöntemler tanı testleri içinde yer almaktadır (21,22). Tarama programlarının amacı, fetal sağlık problemlerini (genellikle genetik sorunları) doğrudan belirlemek ya da riskli gebelikleri tanımlayarak prenatal tanı programlarına referans etmek ve olabildiğince çok genetik özüllü fetusu belirlemektir. Tarama programlarının diğer bir nedeni de girişimsel prenatal tanı yöntemlerinin belli bir komplikasyon hızına sahip olmalarıdır. Yüksek risk gruplarının zaten prenatal tanı programlarına alınmasından dolayı tarama programlarında hedef kitle düşük risk grubuna giren gebeliklerdir (16).

Prenatal tanıda, girişimsel uygulamalarda iki konu daha çok önemlidir. Bunlardan birincisi intrauterin müdahale sırasında komplikasyon olmasıdır. İşlem sonrası fetus düşebilir ve tetkik sonucu fetus normal bulunursa sağlam bir çocuk kaybedilmiş olabilir. İkincisi ise annenin maruz kaldığı ruhi stres (korku vb) ile fiziki strestir (acı). Müdahalede annenin canı yanmakta, batıcı aletler annenin karın duvarı ile uterusundan geçmektedir. Olay çok ciddi komplikasyonlara açıktır. Enfeksiyon, kanama/hematoma, hatta sonuçta histerektomi ile bitecek komplikasyonlar bile olabilir.

Prenatal tanıda kullanılacak yöntemin girişimsel olmayan olması tercih edilmektedir. Anne karnına dayanan transduser'lar (ultrason vb) ve anne kanı ile yapılan incelemeler girişimsel olmayan kabul edilmektedir. Birçok tarama testi ve prenatal tanı programlarında girişimsel olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Malformasyon belirlenmesinde ultrasonografinin (USG) rolü önemlidir. Tarama testleri de anne kanı kullanılarak yapılmakta ve birçok program bunlara erken dönem ultrasonunu (nokal translusensi) ilave etmektedir. Somatik değişiklik veya malformasyonlarla seyreden kromozom anomalileri ile gen bozukluklarında da görüntüleme bir ölçüde önemini korumaktadır. Ancak sayısal ve yapısal

kromozom anomalilerinin büyük bir çoğunluğunda ve yapısal bozukluk nedeni olmayan birçok “Mendellian” bozuklukta girişimsel yöntemlere gereksinim vardır. Bu gibi durumlarda sitogenetik çalışmaların (karyotipleme) veya DNA çalışmalarının (PCR, FISH vb) yapılabilmesi için fetus kökenli biyolojik materyale ihtiyaç duyulur. Bu noktada amniyosentez, CVS ve Fetal kan örnekleme (kordosentez vb) gibi fetal doku örnekleme yöntemlerine ihtiyaç vardır (16).

Girişimsel olmayan yöntemlerden fetal görüntüleme için yaygın olarak ultrason kullanılmakta olup manyetik rezonans görüntüleme gelecek için ümit vaat etmektedir. Ultrasonografi ile fetal büyüme, hareket ve morfoloji görüntülenebilirken ayrıca amniyon sıvısının hacmi, gebelik haftası ve plasental yerleşim de değerlendirilmektedir. Ultrason taraması sonrası majör bir fetal anormallik belirlendiği durumlarda bu tip olgularda kromozomal anomalinin sık bulunmasından dolayı genetik analiz önerilmektedir. Ayrıca birçok feal minör anormalliğin de kromozomal anomalilerle ilişkisi vardır (16,19,21).

Anne kanına dayalı testlerde, bazı genetik bozukluklar (özellikle Down sendromu gibi kromozom anomalileri) ile anne kanındaki hormon/biyokimyasal parametreler arası ilişkiler gösterilmiştir. Bunun sonucunda birinci ve ikinci üç aylık dönem tarama testleri adı altında bazı uygulama programları geliştirilmiştir. İkinci üç aylık dönemdeki tarama testlerinden üçlü test’de , anne kanında alfa-fetoprotein (AFP), serbest estriol ve insan koryonik gonadotropine (HCG) bakılmakta ve Down sendromu görülme olasılığı hesaplanmaktadır. Günümüzde çok çeşitli programlar vardır, üçlü test yerine ikili test ya da dördü testler kullanılabilir. Tarama testlerinin ilk üç aylık döneme kayması ve biyokimyasal/hormonel parametrelere fetal ultrasonografi bulgularının eklenmesi de sıklıkla karşımıza çıkan uygulamalardandır. Tablo 1’de örnek olarak Down sendromunun doğum öncesinde tarama testleriyle belirlenebilme oranları verilmiştir (16).

Tablo 1: Down sendromunun doğum öncesinde tarama testleriyle belirlenebilme oranları(22).

Tarama Testi	Gebelik haftası	Down sendromunu belirleme yüzdesi (+ %5 YPO *)
İlk üç aylık dönem serum analizi (serbest β hCG ve PAPP-A)	10-13	60
İlk üç aylık dönemde ultrason, nukal translusensi(NT)	11-14	80
NT + ilk üç aylık dönem serum analizi	11-13	90
İkinci üç aylık serum analizi (hCG, serbest estriol ve AFP)	14-18	60-70
İkinci üç aylık ultrason markerları	18-20	20-30 (düşük duyarlılık ve yüksek YPO)

*YPO: yalancı pozitif oran

Girişimsel yöntemlerden en çok uygulananı amniyosentez, gebelik sırasında uterustan amniyotik sıvının alınması yöntemidir. Alınan sıvıda fetal kaynaklı hücreler ve biyokimyasal ürünler bulunmakta olup bu sıvı kromozom, DNA ve protein analizi için kullanılabilir. Genellikle gebeliğin 14-22'nci haftaları arasında uygulanmaktadır. 11-13'ncü haftalarda uygulanan erken amniyosentezin artan komplikasyon hızları nedeni ile uygulaması günümüzde son bulmuştur. Amniyosentezin başlıca dezavantajı genellikle 17-20'nci gebelik haftasından önce prenatal tanı sonucunun elde edilememesidir. Genetik bir anomalinin belirlenmesi ve hastanın gebeliğin sonlandırılmasını istemesi sonucunda uygulanacak gebelik sonlandırıcı teknikler gebe kadına ilk üç aylık dönemdekinden daha fazla fiziksel ve duygusal risk oluşturmaktadır. Amniyosentezin başlıca komplikasyonları: fetal kayıp, izoimmunizasyon, enfeksiyon, fetal yaralanmalar ve ağrı, kanama, amniyotik sıvı sızıntısı gibi maternal akut komplikasyonlardır. Genel olarak kabul edilen amniyosentezin fetal kayıp oranını %1 artırdığıdır (16,19,23,24).

Gelişmekte olan plasentadan transservikal ya da transabdominal yolla koryonik dokunun alınması işlemi olan CVS, gebeliğin 10-13'ncü haftalarında gerçekleştirilmekte olup ilk üç aylık dönemde uygulanan en yaygın girişimsel prenatal tanı yöntemidir. Fetal karyotip,

moleküler ve biyokimyasal anomalilerin belirlenmesinde kullanılan CVS'in en büyük avantajı genetik danışma ve karar verme süreçlerinde amniyosenteze göre ek süre tanınmasıdır, ayrıca bu dönem içerisinde gebeliğin sonlandırılması anne için daha güvenlidir. CVS'e bağlı dezavantaj ve riskler: fetal kayıp, enfeksiyon, kanama, membranların rüptürü, fetal anomali oluşma riski, sınırlı plasental mozaizmdir. CVS'e bağlı fetal kayıp oranı %1-2'dir (16,19,23,24).

Hızlı fetal karyotipleme için kullanılan kordosentez en güvenli olarak gebeliğin 18-21'nci haftaları arasında yapılabilmektedir. Karyotip sonucuna kısa sürede ihtiyaç duyulduğu durumlarda, amniyosentez veya CVS'de mozaizizm veya pseudomozaizizm belirlenmişse fetal karyotipleme için kordosenteze başvurulur. Prenatal tanıdaki yeri sınırlı olup daha çok perinatal takip amacı ile fetal sağlık belirlemede kullanılmaktadır. Fetal kayıp veya kendiliğinden düşük oranı amniyosenteze ve CVS'e göre daha yüksek olup yaklaşık tüm olguların %1-2'sinde gözlenmektedir.

2.3. SİRKÜLER KANDA NÜKLEİK ASİTLERİN VARLIĞI

DNA ve RNA'yı içine alan nükleik asitlerin asıl işlev gördükleri yer hücre içidir, bu hücreler ya karaciğer, kalp gibi sabit dokularda ya da beyaz kan hücreleri, retikülositler gibi sirküler kanda bulunurlar. Sirküler kanda bulunan DNA ve RNA ya intraselüler olarak ya da ekstraselüler formda bulunurlar. Sirküler kan dinamik bir çevreye sahip olup, bir günde 200 milyar kırmızı kan hücresi ve 70 milyar nötrofilik lökositleri içeren yaklaşık 1 trilyon kan hücresinin turnover'ı söz konusudur. Lenfosit, monosit ve granülositleri içeren nukleuslu hücreler kanda transkripsiyonel olarak en aktif hücreler olduklarından hem DNA analizi hem de gen ekspresyon profillerinin incelenmesinde kullanılırlar. Sirküler ekstraselüler DNA ve RNA serbest olarak kan plazma ya da serumunda bulunurlar. Bunlar doğal çevrelerinden kaçmışlardır ve bir partiküle bağlı olarak ya da çözeltide serbest olarak var olabilecekleri plazmaya geçiş olanağı kazanmışlardır (25).

2.4. ANNE KANINDA FETAL HÜCRELERİN VARLIĞI

Anne kanında fetal hücrelerin varlığını ilk defa 1893'te Alman patolog Schmorl'ün eklampsi nedeniyle ölen gebe kadınların kan dolaşımında histolojik olarak trofoblastları gözlemlemesiyle bildirilmiştir. Douglas ve arkadaşları da 1959'da eklampsili hastaların toplardamar kanında trofoblastların varlığını rapor etmişlerdir. Clayton ve arkadaşları 1964'de anneden aldıkları kan örneklerinde fetal hemoglobin (HbF) içeren hücreler saptamışlardır. Bu veriler, anne kanında fetüse ait hücre bulunma olasılığını arttırmış ve bu delillere dayanarak sitogenetik uzmanları, anne kanında fetüse ait hücreleri alışılmış tekniklerle araştırmaya başlamışlardır. İlk kez Walknowska ve arkadaşları 1969'da erkek fetüs taşıyan gebe kadınların kanında 46,XY karyotipine sahip fetal lenfositlerin varlığını rapor etmişlerdir. De Grouchy ve Trebuchet'in anne kanında 46,XY metafazlarını; Schroder ve Grossett'in ise Y kromatin pozitif hücreleri saptamalarıyla, önceki bulgular destek bulmuştur. Tüm bu çalışmalarda görülen bir problem, 46,XY metafazlarının ve Y kromatinin dişi fetüs taşıyan gebelerde de gözlenmesiydi. Zilliacus ve arkadaşları erkek fetüs taşıyan 8 gebe kadının 7'sinin kanında ve dişi fetüs taşıyan 7 gebe kadından birinin kanında Y kromatini rapor ettiler. Ancak hiçbir örnekte 46,XY metafazı bulunamadı ve hiçbirinde anne kanındaki hücreler fetüse ait hemoglobin göstermediler. 1970'lerin ortalarından sonlarına doğru, anne kanında fetüse ait hücrelerin var olup olmadığına yönelik yoğun ilgiye rağmen hiçbir görüş birliği elde edilememiştir. Bu yüzden Geleneksel sitogenetik metotların bu inceleme için pratik bir yöntem olmadığı kanısına varılmıştır. 1970'lerin sonlarına doğru oluşan bu hayal kırıklığı, araştırmacıları farklı yaklaşım arayışına yöneltmiştir. A. Martin, Simpson ve Alias, anne kanında fetüse ait hücreler varsa, analiz için çok fazla sayıda metafaza ihtiyaç olduğunu düşünerek otomatik sitogenetik teknolojileri kullanmış ve örnek hazırlama ünitelerine ek olarak metafaz analiz birimleri geliştirmişlerdir. Diğer yandan, çeşitli zenginleştirme teknolojileri üzerine odaklanılmıştır. Bunun mantığı, fetüse ait hücreleri anne hücrelerinden ayırmak için 'flow-sorting' (akımla ayırıştırma) yönteminin kullanılması esasına dayanıyordu. Herzenberg ve arkadaşları 1979'da, Iverson ve arkadaşları 1981'de, dolaşımdaki fetüse ait hücrelerin sayısını arttırmak amacıyla, kanın zenginleştirilmesi için flow sitometrinin kullanımını ilk kez rapor edenlerdir. Tharapel ve arkadaşları da anne ve fetüsün insan lökosit antijenleri (HLA) farkına dayanarak 'flow sitometri' cihazı ile lenfositleri ayırıştırıp fetüse ait metafazları analiz etmişlerdir. 1980'lerin sonlarında mevcut moleküler teknolojilerin devreye girmesiyle, daha iyimser bir yaklaşım ve ilerleme sağlanmıştır. Lo ve arkadaşları 1989'da erkek fetüs taşıyan gebe kadınların kanındaki Y kromozomu dizilerinin varlığını tespit etmek

için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanan ilk gruptur. Y zincirlerinin hacmini arttırmak için PZR kullanarak, ayıklanmamış çekirdekli hücrelerin içinde fetüse ait hücrelerin var olduğunu göstermişlerdir. Bianchi 1990'da anne kanındaki fetal eritrositleri flow sitometri kullanarak zenginleştirmiş erkek bir fetüse sahip gebe kadınların az bir kısmında Y kromozomu dizileriyle fetal eritroblastik hücrelerin varlığını göstermiştir. Price ve arkadaşları 1991'de, Bianchi ve arkadaşları 1992'de Simpson ve Elias 1993 ve 1994'de kromozoma-özü DNA problemleriyle Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH) uygulayarak, akımla ayrıştırılmış fetüse ait çekirdekli eritrositlerin incelenmesi ile anöploidilerin doğum öncesi tanısında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Price ve arkadaşları., koryonik villüs örneklemeinden hemen önce alınan anne kan örneğinde bir trizomi 18 olgusu tespit ederken; koryonik villüs örneklemeinden 1 hafta sonra bir anneden alınan kanda yaptıkları başka bir çalışmada bir trizomi 21 (Down Sendromu) olgusu saptadılar. Elias ve arkadaşları da gebeliğin ilk 3 ayında anne kanındaki fetüse ait hücrelerde trizomi 21'in doğum öncesi tanısını koydular. Bianchi ve Klingler, Holzgreve ve Ganshirt-Ahlert anne kanından elde edilen trizomi 18 ve 21 hücrelerini rapor etmişlerdir (26-32).

2.4.1. Anne Kanında Fetüse Ait Hücrelerin Sıklığı

Fetüse ait hücrelerin annenin periferik kanındaki sıklığı hakkında farklı veriler vardır. Analiz edilen hücre tipi, kan örneğinin alındığı gebelik yaşı ve fetüse ait hücre topluluğunu zenginleştirme, teşhis etme ve rakamlarla belirtmede kullanılan metotların doğruluğu bu sıklığı etkileyebilen faktörlerdir. Anne kanında nispeten az miktarda fetüse ait hücre bulunmaktadır. En sık tespit edilen değer, anne kanının mililitresine 1 hücre düştüğü yönündedir. Fetüse ait çekirdekli hücrelerin anne kaynaklı hücrelere oranının tespiti, öncelikli olarak PZR ya da FISH kullanılarak Y kromozomu için DNA analizine dayanmaktadır. Kesin bir sayı henüz belirlenememiş olsa da, çoğu araştırmacı yaklaşık 100 bin anne hücresi başına 1 fetüs hücresi düştüğü fikrine katılmaktadır. Gebeliğin ilerlemesi, düşük, sezaryan, amniyosentez ya da bimanuel pelvik muayene sonrasında, fetüs ve plasenta karyotipinin anormal olduğu gebeliklerde anne kanındaki fetüse ait hücre insidansının arttığı bildirilmiştir (26,29,33-35).

2.4.2. Anne kanındaki fetal Hücre Tipleri

Çeşitli dokulardan kaynaklanan fetüse ait hücreler, çoğunlukla 'plasentanın intervillöz boşluğunda' görülmektedir ve embriyon/fetüse ait hücrelerin anne kanına geçtiği ispatlanmıştır. Fetüse ait kan hücrelerinin anne dolaşımına geçişinin fetüsten anneye kanama sonucunda olduğu düşünülmektedir. Ancak bunun mekanizması henüz açıklanamamıştır. Bu kanamaların plasentanın normal gelişiminin bir parçası mı ya da travmadan kaynaklanan bir olay mı olduğu bilinmemektedir. Gebelik esnasında maternal dolaşımda var oldukları gösterilen fetüse ait hücreleri kullanarak girişimsel olmayan doğum öncesi tanı yürütülmek isteniyorsa, bu hücrelerin zenginleştirilmesi, teşhisi ve analizi mutlaka gereklidir. Kromozom kaynaklı ve Mendelian anomalilerin tanısı için fetüse ait çekirdekli hücrelerin elde edilmesi gerekir ki, kromozom-özümler probolar kullanılarak FISH yöntemiyle interfaz hücre analizi yapılabilir. Tanı için yeterli sayıda hücre elde etmek için, özgül bir hücre tipi hedeflenip, az miktardaki fetüse ait hücrenin zenginleştirilmesi sağlanmalıdır. Çalışılmış ve halen çalışılmakta olan fetüse ait hücre tipleri şunları içerir:

- Trofoblastlar,
- Beyaz kan hücreleri (lenfositler, granülositler),
- Çekirdekli kırmızı kan hücreleri (ÇKKH),
- Hematopoetik kök hücreler.

Anne kanındaki fetüse ait hücrelerin rutin doğum öncesi genetik tanıda kullanılabilmesi için belli kriterler sağlanmalıdır:

- Tüm gebe kadınların kanında bulunmalıdırlar.
- Gebeliğin erken dönemlerinde yeterli miktarda bulunmalıdırlar ki, genetik analize izin versin ve gerekirse gebelik sonlandırılabilir.
- Bir sonraki gebelikte anne kanında varlıklarını devam ettirmemelidirler.
- Maternal hücrelerden ayrımlarını sağlayabilecek kendilerine özgül işaretleri olmalıdır (27,29,33,36).

2.4.2.1. Trofoblastlar

Trofoblastlar, anne kanı hücrelerinden şekilleri sayesinde kolayca ayırt edilebilirler. Kan hücrelerinden ayrı bir hücre serisi oldukları için, bu hücreleri izole etmede kullanabilecek trofoblast-özgül antikorların geliştirilebilmesi teorik olarak mümkündür. Yalnızca gebelik

esnasında var olmaları ve farklı şekillerinin kesin bir mikroskopik ayırma izin vermesi sayesinde trofoblastlar inceleme için iyi bir adaydır. Bununla birlikte, trofoblast hücrelerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır: Trofoblastlar, gebeliğin ilk 3 ayında anne dolaşımına geniş miktarda dökülürler ve akciğer dolaşımı yoluyla kandan rutin olarak temizlenirler. Bu ise, annenin kanında tanı için kullanılacak trofoblastik hücre sayısında hızlı ve belirgin bir düşüşe sebep olur. Tanıda sorun olacak bu güçlüğü ek olarak, trofoblast-özgül monoklonal antikorların eksikliği söz konusudur. Bu eksiklik, trofoblastik antijenlerin maternal lökositlerin yüzeyine doğru çekilmesinin bir sonucu olabilir. Trofoblastlarla ilgili diğer bir durum ise, plasentanın bir parçası olmaları yönüyle, koryonik villüs örnekleme çalışmalarından bilindiği üzere, bu hücrelerin nispeten yüksek oranda (%1-2) kromozomal mozaizm göstermeleridir. Bu yüzden bir plasental trofoblastik hücrenin genetik analizi, fetüse ait karyotipi tam olarak ve güvenilir bir şekilde yansıtmaz. Ek olarak, trofoblastlar çok çekirdekli olabilirler ve böylece interfaz FISH'ı ve DNA analizlerinde zorluk çıkarabilirler (27,29,33,37).

2.4.2.2. Lökositler

Fetüse ait çekirdekli eritrositlerin erken gebelikte anne dolaşımına geçtiğinin kesin delillerle gösterilmesi, araştırmacıları fetüse ait lökositlerin de eritrositlerle birlikte anne kanına geçeceği fikrine yöneltmiştir. HLA antijenleri sayesinde kolayca ayırt edilebiliyor olmaları (trofoblastlar ya da fetüse ait ÇKKH'inde HLA ekspresyonu yoktur) ve trofoblast hücrelerinin gösterdiği genetik mozaizm fetüse ait lökositlerde görülmemesinden dolayı doğum öncesi tanı için potansiyel avantaj gösterirler. Ancak zamanla fetüse ait lenfositler üzerinde yapılan çalışmalar birkaç faktör yüzünden sınırlanmıştır. Bunların başlıcaları; yalnızca fetüse ait olan lenfosit antijenlerine özgül monoklonal antikorların olmaması ve fetüse ait lenfositlerin bir önceki hamilelikten kalabileceğine ilişkin şüphelerdir (27,29).

2.4.2.3. Eritroblastlar

Fetüse ait ÇKKH (eritroblast) çok ilgi çekici bir aday hücredir, çünkü birçok istenen özelliğe sahiptir. ÇKKH'nin sınırlı bir yaşam süresi vardır. Erişkinde 5 günden daha uzun süre kalmazlar ve bu yüzden erişkin periferik kanında çok nadirdirler. Eritroblastlar farklı bir şekle sahiptirler ve gebelik süresince anne kanında sürekli bulunurlar. Fetüse ait genleri iyi

temsil ederler. On bir haftalık fetüste eritroblastlar kırmızı kan hücrelerinin yaklaşık %10'unu ve 19 haftalık fetüste ise %0.5'ini oluşturur. Yani, gebeliğin birinci 3 aylık döneminde ve erken ikinci 3 aylık dönemde en fazla bulunan fetüse ait hücre tipi eritroblastlardır. Tek çekirdeklidirler. Sınırlı çoğalma yetenekleri nedeniyle, gebelik sona erdikten sonra varlıklarını devam ettirme olasılığı çok düşüktür. Ancak tüm bunlara rağmen son zamanlarda kullanılan zenginleştirme sistemleri gebelerde sirküler ÇKKH'nin büyük bir kısmının maalesef maternal kökenli olduğunu göstermiştir. Maternal ÇKKH'ni fetal olanlardan ayırmak için fetal hemoglobin kullanıldığı da tüm HbF-pozitif ÇKKH'in %20'sinin maternal kökenli olduğu gözlenmiştir (29,33,38).

2.5. HASTALIKLARDA SİRKÜLER EKSTRASELÜLER DNA VE RNA

Sirkülasyondaki ekstraselüler nükleik asitlerin keşfi ilk olarak 1948'de Mandel ve Metais tarafından hem normal olguların hem de çeşitli hastalıkları olan olguların plazmasında gösterilmiştir, ancak başlangıçta yaygın olarak tanınmamış ve uzun süre çoğunluk tarafından unutulmuştur. DNA'nın sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarının serumlarında keşfi ile 1966'da sirküler ekstraselüler DNA'nın tekrar farkına varılmıştır ve bu alandaki çalışmalar başlamıştır. Daha sonraki çalışmalar yüksek seviyedeki DNA'nın sadece SLE hastalarının serumlarında değil ayrıca romatoid atrit, pankreatit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, peptik ülser hastalığı, hepatit ve özofajit hastalarında da olduğu gösterilmiştir. Leon ve arkadaşları ve Shapiro ve arkadaşları sırasıyla 1977 ve 1983'de benign tümörlü hastalarla karşılaştırıldığında kanser hastalarının plazma ve serumunda yüksek seviyelerde DNA olduğunu ortaya çıkartarak kanserde sirküler serbest nükleik asitler üzerine yapılan çalışmalara öncülük etmişlerdir. Plazmada tümör kökenli sirküler serbest DNA'nın keşfi araştırmacıların plazma ve serumda konuğa ait olmayan DNA'nın diğer formlarını aramaya başlamaları için ilham kaynağı olmuştur. Bu amaçla başlangıçta gebelik sırasında maternal sirkülasyona giren fetal nükleuslu hücreler araştırılmıştır ve maternal periferik kandan izole edilen DNA'da erkek bir fetüs için marker olan Y kromozomu üzerindeki bir dizinin amplifikasyonu yapılarak fetal cinsiyet belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı yöntemle 1997'de Lo ve arkadaşları maternal serum ve plazmadan izole edilen DNA'da erkek fetüsün varlığını göstererek maternal sirkülasyondaki serbest nükleik asitlerin prenatal tanı amaçlı kullanılması yönündeki çalışmaların öncülüğünü yapmışlardır. Günümüzde başlıca kanser ve prenatal tanı alanlarında

sirküler serbest nükleik asitler üzerine çalışmalar yoğun ve heyecan verici bir şekilde devam etmektedir (25,39,40).

2.5.1. Otoimmün hastalıklarda sirküler DNA ve Mikrokimerizm

İlk olarak Tan tarafından SLE hastalarında sirküler DNA olduğu gösterilmesine rağmen bu çalışma otoimmün hastalıklarda sirküler DNA'nın rolünün araştırılmasına yönelik fazla ilgi uyandırmamıştır. 1970'lerde farklı araştırmacıların sirküler DNA'nın romatoid aritide içine alan diğer hastalıklarda yüksek seviyede bulunduğunu göstermesiyle otoimmün hastalıklarda sirküler DNA'nın rolü önem kazanmıştır. Bu erken bulguları takiben çalışmalar başlıca SLE hastalığı üzerine yapılmış ve SLE hastalarında yüksek seviyede serum DNA'sı olduğu ve bazı durumlarda DNA seviyesi ile hastalık aktivitesi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (39).

Kadınların otoimmün hastalıkların gelişimine daha eğilimli olduklarının iyi bilinmesinden dolayı cinsiyet hormonlarının bu hastalıkların patofizyolojilerindeki rolü araştırılmaya başlanmıştır. Cinsiyet hormonlarının önemli bir rol oynamasına rağmen cinsiyete bağlı otoimmün hastalıkların gelişimindeki tek faktör olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sebeple fetal hücrelerin gebelikten uzun yıllar sonra bile maternal sirkülasyonda varlıklarını sürdürebildiklerinin bulunması otoimmün hastalıklar üzerine araştırmalarda yeni bir alan açmıştır. Fetal mikrokimerizm olarak adlandırılan fetal hücrelerin maternal sirkülasyonda uzun süre varlıklarını devam ettirmeleri partiküler sistemik skleroz, Sjogren sendromu, SLE, myositiz ve primer bilier sirozu içine alan otoimmün hastalıkların patogenezi için potansiyel faktör olarak önerilmiştir (39).

Mikrokimerizm, bir bireye ait az sayıda hücre ya da DNA'nın genetik olarak farklı başka bir bireyde barındırılmasını ifade etmektedir. Mikrokimerizmin en sık kaynağı gebeliktir (41). Bir ya da birden çok çocuk doğuran kadın kimerik kabul edilmektedir. Bununla beraber kimerik olmak için canlı doğum gerekmemektedir. Seçici olarak gebeliği sonlandırılan 40 kadının periferik kan örneğinin çalışıldığı bir çalışmada maternal sirkülasyondaki fetal hücreler kantitatif PZR ile analiz edilmiştir. İlk üç aylık dönemdeki gebeliğin seçici sonlandırılmasını takiben 500,000 kadar nükleuslu fetal hücrenin anneye

geçtiği gösterilmiştir. Bunun sonucunda kimerizm için birkaç aylık gebeliğin yeterli olduğu bulunmuştur (42).

Otoimmün hastalıklarla kronik graft-versus-host hastalığının bazı klinik benzerlikleri, otoimmün hastalıkların çocuk sahibi olma dönemindeki kadınlarda artmış insidansı ve mikrokimerizmin uzun dönem varlığını sürdürmesi, bu hastalıkların patogeneğinde mikrokimerizmin rol oynayabileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır (43). Birçok çalışmanın neticesi olarak, araştırmacılar şu fikri öne sürmüşlerdir; fetüse ait bağışık hücreler, anneye ait antijenlere karşı reaktif olabilmekte ve böylece, bir graft-versus host reaksiyonunu tetikleyebilmektedirler. Bu da otoimmün hastalıkların başlamasında ya da alevlenmesinde etkin bir mekanizma gibi görünmektedir (44).

Yapılan birçok çalışmada, otoimmün hastalığa sahip olan kadınların kan ya da dokuları ile kontrol grubuna ait sağlıklı kadınların fetal hücre miktarı karşılaştırıldığında, otoimmün hastalıklarda fetal hücre sayısı yüksek olarak saptanmıştır. Bununla beraber, yakın zamanda bu konu üzerine yoğun ilgi ve birçok araştırmaya rağmen, mikrokimerizmin sağlık ve hastalıkla ilişkisi henüz çok az anlaşılabilmiştir. Otoimmün hastalıklarla fetal hücreler arasındaki patogenetik ilişkiyi test etmek için seçilen ilk hastalık sklerodermadır. Sklerodermanın seçilmesinin nedeni graft-versus-host hastalığına klinik olarak benzeyen bir otoimmün hastalıktır, genellikle kadınlarda gözlenmektedir ve gebelikten sonraki yıllarda yüksek insidans göstermektedir. Yapılan çalışmada en az bir erkek çocuğu olan sklerodermalı hastaların periferik kanında fetal hücrelerin varlığı Y kromozomuna özgü PZR ile analiz edilmiştir. Kontrol grubu olarak en az bir erkek çocuğu olan sağlıklı kadınlar çalışılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre 16 ml kanda sağlıklı olgularda ortalama 0.38 hücreye denk DNA bulunurken bu rakam sklerodermalı hastalarda 11.3 olarak bulunmuştur. Ayrıca Artlett ve ark., sklerodermalı kadınların deri biyopsilerinde erkek lenfositlerini göstermişler ve etkilenmiş annelerin başka farklı organlarında da erkek hücrelerini saptamışlardır (42,45).

2.5.2 Kanserde sirküler DNA ve RNA

Kanser testlerinde plazmadaki sirküler DNA'nın uygulamaları başlıca nokta mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeler, mikrosatellit instabilitesi, ve hipermetilasyonu içine alan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesine bağlıdır.

Sirküler N-ras ve K-ras gen mutasyonları çeşitli kanser formlarının sirküler DNA'sında gözlenmiş ve mutasyona uğramış K-ras dizilerinin devamlılığı tekrarlayan veya ilerleyen hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Mikrosatellit instabilitesi, özellikle heterozigosite kaybı (LOH) hem tümörlerin kendisinde hem de uyumlu sirküler DNA'sında gözlenmiştir. Ayrıca bu değişiklikler hastalığın tekrarlaması ve ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir. Gerçek zamanlı metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu (RT-MSP-PZR) promotörü hipermetillenmiş sirküler DNA'nın kantitatif olarak hesaplanmasına izin vermektedir (25).

Kanser hastalarının serum ve plazmasındaki DNA'ya yönelik çalışmalar en etkili olarak 1977'de Leon ve arkadaşlarınca ve 1983'de Shapiro ve arkadaşlarınca benign tümörlü hastalarla karşılaştırıldığında kanser hastalarının plazma ve serumunda yüksek seviyelerde DNA olduğunu ortaya çıkartmalarıyla ilgi uyandırmıştır. Ayrıca metastatik hastaların daha yüksek seviyede serum DNA'sına sahip olma eğiliminde olduğunu ve başarılı antikanser tedavisinin ardından sirküler DNA konsantrasyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir. Stroun ve arkadaşları 1989'da iplikçik dayanıklılık testleriyle (strand stability assays) bu sirküler DNA'yı karakterize etmeye başlamışlar ve ilk olarak neoplastik DNA olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu önemli önerinin doğruluğu 1994'de myelodisplastik sendromlu ve akut myeloblastik lösemili hastaların plazmasında tümörle ilişkili onkogen mutasyonlarının bulunmasıyla gösterilmiştir. Bu sonuçlar tümör hücrelerinin gerçekten DNA'larını sirkülasyona saldıklarını gösteren güçlü deliller olmuşlar ve ayrıca tümör belirlenmesinde ve izlenmesinde yeni olanakların açılmasını sağlamışlardır.

Son birkaç yılda mikrosatellit analizi kullanılarak primer tümörlerde gözlenen genetik değişikliklerin solid tümörlü hastaların serumlarında da belirlenebileceğini gösteren yeni çalışmalarda bir patlama olmuştur. Böylece Sorenson'un 1996'da pankreas kanserli hastaların serumunda belirlenebilir miktarda mutasyona uğramış *ras* dizilerinin varlığını açıkça göstermelerinin ardından Chen ve arkadaşları küçük hücreli akciğer kanserli hastaların plazma DNA'sında mikrosatellit değişikliklerini ve Nawroz ve arkadaşları da baş ve boyun kanserli hastaların serum DNA'larında mikrosatellit değişikliklerini göstermişlerdir. Bu son çalışmalar primer tümörlerde gözlenen mikrosatellit değişikliklerinin solid tümörlü hastaların serum veya plazmasında da belirlenebileceğini açıkça göstermiştir.

Bugüne kadar plazma ve serumda onkogen mutasyonlarını ve tümörle ilişkili epigenetik değişiklikleri içine alan birçok tümör kökenli değişiklik belirlenmiştir. Bununla

beraber metilasyon analizi için kantitatif yöntemlerin varlığı sirküler tümör DNA'nın konsantrasyonu ve klinik tablonun korelasyonunu mümkün kılmaktadır (39).

Kanda ekstraselüler RNA'nın bulunabileceğine ilişkin raporlar önceleri plazmada etkili ribonükleazların bulunmasından dolayı geniş bir kesimce kabul görmemiştir. Daha sonraları birkaç rapor serumda ekstraselüler RNA'nın varlığı bildirmiş ve her nasılsa bu RNA'nın plazma ribonükleazlarının degradasyonuna karşı korunduğunu göstermişlerdir. Bununla beraber yapılan çalışmalarla nested revers transkriptaz-PZR (RT-PZR) kullanarak melanoma, göğüs kanseri ve diğer malignitelerin serumlarından elde edilen tümörle ilişkili mRNA'ların amplifiye edilebileceği gösterilmiştir. Bu raporlarda tanımlanan yöntemlerin teşhis duyarlılıklarının %25-78'e ulaşmasına rağmen kanser belirlemeye yönelik klinik kullanımı yetersizdir (25,46).

2.5.3. Maternal plazmada sirküler DNA ve RNA

Genetik analiz için fetal doku elde etmeye yönelik amniyosentez ve koryonik villus örnekleme gibi konvansiyonel yöntemler girişimseldirler ve fetüs için çok küçük bir risk oluşturmaktadırlar. Bu tablo Lo ve arkadaşlarının 1997'de maternal plazma ve serumunda fetal DNA'yı keşfetmeleriyle değişmiştir.

Maternal plazmadaki sirküler DNA'nın belli nörolojik hastalıkların, fetal kromozomal anöploidilerin, cinsiyetle ilişkili hastalıkların ve rhesus D (RhD) durumunun prenatal tanısı için kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Maternal plazmadan fetal RhD genotipleme birkaç merkezde rutin prenatal tanı protokollerinden biri olarak uygulamaya girmiştir. Maternal plazmadaki fetal DNA'nın miktarındaki sapmalar pre-eklampsi, fetal-maternal kanama ve polihidramniyozu da içine alan çeşitli hastalıklarda rapor edilmiştir. Miktar belirlemeye yönelik çalışmalar başlıca maternal plazmadaki Y kromozomal dizilerin analizi ile gerçekleştirildiğinden uygulamada gebeliklerin %50'si ile sınırlıdır.

Son zamanlarda RT-PZR kullanarak maternal plazmada plasenta kökenli fetal RNA'nın varlığı gösterilmiştir. Plasentada ekspresse olan insan koryonik gonodotropinin β alt birimi (β hCG) ve insan plasental lakogen (hPL) genlerinin transkriptleri tüm gebe kadınların plazmasında gözlenmiştir. İlginç olarak her iki mRNA'nın da RNA'nın doğasından kaynaklanan dayanıksızlığına rağmen oda sıcaklığında 24 saat stabil kaldıkları bulunmuştur.

Bunun üzerine yapılan çalışmalar sonucu stabilliğin mRNA'nın subsellüler partüküller ile ilişkisinden kaynaklanabileceği önerilmiştir. Ayrıca doğum sonrası fetal mRNA'nın plazmadan temizlenmesi kinetiği üzerine yapılan çalışmalarda doğumdan 2 saat sonra olguların %70'inde hPL transkripti gözlenmezken 24 saat sonra tüm olgularda gözlenmemiştir (25,47,48).

2.6. ANNE KANINDAKİ SİRKÜLER FETAL DNA'NIN VARLIĞI, BİYOLOJİSİ VE POTANSİYEL TANI UYGULAMALARI

Lo ve arkadaşları agresif olarak büyüyen fetoplental birim ile tümör arasındaki benzerliklerden yola çıkarak başlıca gebe kadınların serum ve plazmasında fetüse ait DNA'nın bulunup bulunamayacağını sormuşlardır. Y kromozomuna özgü dizilerin konvansiyonel PZR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforezi kullanarak erkek bir fetüse gebe kadınların çoğunun serum ve plazmasında fetal DNA'nın varlığını göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmalarında gerçek zamanlı PZR kullanarak maternal serum ve plazmadaki fetal DNA'nın konsantrasyonunu ölçmüşlerdir. Erken gebeliklerde fetal DNA'nın total DNA'nın serumda ortalama %0.13'ünü ve plazmada ortalama %3.4'ünü, geç gebeliklerde serumda ortalama %1.0'ini ve plazmada ortalama %6.2'sini oluşturduğunu göstermişlerdir. Maternal plazma ve serumdaki fetal DNA'nın tam konsantrasyonu benzer olup temel fark plazma ile karşılaştırıldığında serumda pıhtılaşma sırasında salınan arka plan DNA'nın fazla olmasıdır. Ayrıca Lo ve arkadaşları maternal plazma ve serumdaki fetal DNA miktarının gebelik ilerledikçe gebeliğin sonuna doğru keskin bir şekilde olmakla beraber artmakta olduğunu göstermişlerdir. Anne kanının hücresel kısmından elde edilen fetal DNA ile karşılaştırıldığında hamile kadınların hücre içermeyen plazma ya da serumundan elde edilen fetal DNA miktarı önemli ölçüde daha fazladır. Ayrıca anne kanındaki nükleuslu fetal hücrelerin analizi birçok durumda gelişmiş fetal hücre zenginleştirme prosedürleri gerektirdiğinden maternal plazma ve serumdaki DNA'nın analizi fetal hücrelerine göre daha hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve çok sayıda örnekte kolayca uygulanabilmektedirler. Günümüzde başlıca uygulama alanındaki sınırlılığı hem dişi hem de erkek fetusta bulunan fetal DNA'nın varlığını belirleyebilen ve/veya ölçülebilen benzersiz fetal gen dizilerinin henüz bulunmamasıdır (49-52).

Sirküler fetal DNA'nın hangi dokulardan köken aldığı ve bunun nasıl gerçekleştiğine dair günümüzde tam bir bilgi yoktur ve birçok spekülasyon vardır. Olası dokular fetal

hematopoitik hücreler, plasenta ve DNA moleküllerinin direkt transferidir. Çeşitli fetal hücre tiplerinin maternal kanda sirküle olmasından dolayı fetal hematopoitik hücrelerin uygun doku kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Plazmadaki DNA'nın hücre ölümü için marker olarak kullanılabileceğinin gösterilmesi, serbest DNA'nın maternal plazma ve serumuna sirkülasyona katılmış olan fetal hücrelerden salınmış olabileceği hipotezini doğrulamıştır. Yapılan çalışmalarda maternal kandaki fetal ÇKKH'nin %42.7'sinin apoptosize gittiği gösterilmiştir. Bu yüzden serbest fetal DNA'nın maternal bağışıklık sistemi ile apoptotik fetal hücreler arasındaki etkileşimden kaynaklanabileceği önerilmiştir. Plasenta büyük olmasından ve hücrel aktivitenin fazla olmasından dolayı sirküler fetal DNA için mantıklı bir kaynaktır. Bir çok çalışma ilerleyen gebelik yaşıyla beraber maternal sirkülasyondaki serbest fetal DNA miktarının arttığını göstermiştir. Ayrıca suni üreme teknolojisinin kullanıldığı bir çalışmada embriyo transferinden 18 gün sonra henüz fetoplasental sirkülasyon kurulmadan önce fetal SRY dizisinin varlığı gösterilmiştir. Bu bulgu fetal DNA kaynağının yüksek oranda trofoblastik hücrelerden kaynaklandığını göstermektedir. Diğer yandan güçlü bir kanıt da maternal plazmada plasentaya özgü mRNA moleküllerinin gösterilmiş olmasıdır. Fetal DNA dizileri diğer maternal vücut sıvılarında da gözlenmiştir. Bunlar: amniyotik sıvı, maternal idrar, maternal serebrospinal sıvı ve peritoneal sıvıdır. Amniyon sıvısındaki serbest fetal DNA konsantrasyonunun maternal plazmadakinden 200 kat fazla olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak konsantrasyon gradientine bağlı olarak serbest fetal DNA'nın plasenta veya membranlardan maternal sirkülasyona direkt geçişinin olabileceği önerilmiştir. Tüm bu ihtimaller göz önünde bulundurulduğunda maternal sirkülasyondaki serbest fetal DNA'nın hematopoitik hücrelerin ve fetüsten kaynaklanan fetal DNA'nın maternal sirkülasyona direkt transferinin küçük katkılarının yanında asıl kaynağın plasenta olduğu düşünülmektedir (5,49,53-58).

Gebe kadınların plazmasında serbest fetal DNA'nın bulunması ve konsantrasyonunun maternal sirkülasyondaki fetal hücrelere göre daha fazla olduğunun gösterilmesi birçok yeni prenatal tanı uygulamasının önünü açmıştır. İlk başarılı uygulama cinsiyete bağlı hastalıkların prenatal incelenmesine olanak veren erkek bir fetüse gebe olan kadınlarda Y kromozomuna ait dizilerin belirlenmesidir. Birçok araştırmacı tarafından farklı duyarlılıktaki teknikler kullanılarak Y kromozomuna ait diziler maternal plazma ve serumunda gösterilmiştir (51,52,59,60). Maternal plazma DNA analizi ayrıca RhD negatif gebe kadınlarda fetal RhD kan grubu durumunu girişimsel olmayan olarak belirlemek için kullanışlı bir analizdir. Bu analiz birçok araştırmacı grup tarafından yüksek doğrulukta gösterilmiş ve 2001'den beri

İngiliz Ulusal Kan Servisi tarafından rutin uygulamaya sokulmuştur. Rutinde kullanılan ilk serbest fetal DNA temelli girişimsel olmayan prenatal tanı uygulaması olması bakımından büyük önem taşımaktadır (61-63). Son zamanlarda fetal β -talasemi majör hastalığının ve benzer bir uygulama ile de Hemoglobin E (HbE) geninin girişimsel olmayan prenatal tanısı için plazmadaki serbest fetal DNA'nın kullanılabilmesi gösterilmiştir (64,65). Maternal plazmadaki fetal DNA'nın analizine dayanarak analiz edilmeye çalışılan rapor edilmiş diğer tek gen hastalıkları miyotonik distrofi, akondroplazi, kistik fibroz, Huntington hastalığı ve konjenital adrenal hiperplazidir (66-70). Ayrıca klinik olarak araştırılan diğer bir durum da maternal plazmada bulunan serbest fetal DNA miktarında bazı hastalıklarda normale göre sapmalar gözlenmesidir. Bu alanda ilk bulgu preeklamsi hastalarında kaydedilmiştir ve normal gebeliklere göre ortalama serbest fetal DNA miktarında beş kat bir artış olduğu bildirilmiştir. Preeklamsiyeye ek olarak belli kromozomal anomalilerde, erken doğumlarda, hiperemesiz gravidarum ve plasentaya girişimsel uygulamaların ardından da plazmadaki serbest fetal DNA miktarında sapmalar olduğu gözlenmiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak maternal plazma ya da serumdaki serbest fetal DNA miktarındaki sapmaların riskli gebeliklerin prenatal tanısında kullanılabilmesi ileri sürülmüştür (71-75).

2.7. MATERNAL PERİFERİK KANDAKİ FETAL DNA'NIN ANALİZİ İLE FETÜSÜN CİNSİYETİNİN BELİRLENMESİ

Maternal kandan fetal DNA'nın analizi ile cinsiyet belirlemeye yönelik tanı analizleri anne kanında fetal erkek DNA'sının olup olmadığına bağlıdır. Y kromozomuna özgü dizilerin özgün primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu ile erkek fetal DNA'nın varlığı sorgulanmaktadır. Böylece maternal kanda sirküler fetal erkek DNA'sının belirlenmesi cinsiyete bağlı şiddetli genetik hastalıkların prenatal olarak belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu alanda çalışan araştırmacılardan bir kısmı %100 duyarlılıkta fetal cinsiyeti belirlerken bazıları uyguladıkları yöntem ve kullandıkları örnek tipine bağlı olarak daha düşük duyarlılıklarda fetal cinsiyeti belirlemişlerdir. Tablo 2'de araştırma gruplarının elde ettikleri duyarlılıklar gösterilmiştir. Duyarlılığı etkileyen başlıca faktörlerin seçilen örnek tipi (kan, plazma ya da serum), kullanılan DNA izolasyon yöntemi, uygulanan PCR yöntemi tipi (konvansiyonel ya da real-time), amplifikasyonda kullanılan enzim tipi, seçilen Y kromozomuna özgü primerler, laboratuvar koşulları, deneyimli personel ve gebelik haftasının olduğu konusunda fikir birliği vardır (13).

Maternal kandaki sirküler fetal erkek DNA'sının tespit edilmesiyle fetal cinsiyetin tayin edilmesindeki başlıca dezavantaj dişi cinsiyetin tanısı negatif test sonucuna göre konulmaktadır. Bunun yanlış cinsiyet tespitine yol açması olasıdır. Ancak gelişen teknolojiyle beraber %100 duyarlılık ve özgüllüğe ulaşılmıştır (8,10,12,76,77).

Fetal cinsiyet belirlemesi en erken olarak CVS ile yapılmaktadır. CVS ile elde edilen fetal dokudan yapılan genetik analizler ile sonuca gidilmektedir. Ancak CVS'in %3.7 düşük riskine sahip girişimsel bir uygulama olması cinsiyete bağlı genetik hastalıkların erken prenatal tanısında anne kanındaki sirküler fetal DNA'nın önemini artırmaktadır. Konvansiyonel PCR ile en erken yedinci ve gerçek zamanlı PCR ile en erken beşinci gebelik haftasında anne kanından fetal cinsiyet analizi güvenilir bir biçimde gerçekleştirilmiştir (10,11).

Tablo 2: Maternal kandaki sirküler fetüs DNA'sından fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar.

Kaynak	Gebelik haftası	Kullanılan örnek	Duyarlılık (%)
78	12-40	Plazma	80
		Serum	70
		Kan	17
79	6-36	Kan	83
80	7-11	Kan	65
8	7-32	Plazma	100
		Kan	69
9	7-40	Plazma	96
10	8-14	Serum	100
76	9-34	Plazma	100
77	10-29	Plazma	100
81	8-14	Plazma	93
82	10-17	Plazma	87
83	7-16	Plazma	97
11	5-10	Serum	95
12	10-13	Serum	100

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Tüm olgulardan (n=38) alınan 4-8ml venöz kan pıhtılaşma önleyici içermeyen bir vacutainer tüp içerisinde toplandı. Kanlardan ayrıştırılan serum örneklerinden serum ısıtma yöntemi ve DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonu yapıldı. Fetusun cinsiyetini belirlemek için Y kromozomuna özgü DYS14 ve SRY dizilerine PCR kuruldu.

3.1. ÖRNEKLER

Çalışmaya Nisan 2006-Haziran 2006 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Gebe Polikliniğine başvuran çeşitli sebeplerden ikili ve üçlü tarama testine ve amniyosentez analizine gönderilen 40 gebe kadın alındı. Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından 21/12/2004 tarih ve 206 sayı numarasıyla onaylanmıştır. Bu çalışmaya katılan tüm gebe kadınlar rasgele seçilmiştir ve kan örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirildiklerine ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına dair imzalı onay alınmıştır. Kan örneklerinin toplanması ve PCR analizleri, ultrason ve amniyosentez ile fetusun cinsiyeti belirlenmeden önce yapılmıştır. Fetal cinsiyet amniyosentez sonrası sitogenetik sonuçlar ve gebeliğin ikinci üç aylık dönemindeki ultrasonografi bulgularıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

PCR analizlerinin özgünlüğünü ve duyarlılığını belirlemek için beş sağlıklı erkekten, negatif kontrol olarak kullanmak amacıyla 5 sağlıklı gebe olmayan kadından kan örneği alınmıştır.

PCR analizlerinde iç kontrol olarak kullanmak üzere yaklaşık 2ml dişi fare kan örneği alınmıştır. Dişi fare kan örneği Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır.

3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE SERUM AYRIŞTIRMA

Her bir olgudan alınan 4-8ml venöz kan pıhtılaşma aktivatörü ve serumu kanın diğer komponentlerinden ayıran serum ayırıcı jel içeren vacutainer (BD vacutainer serum separated type II tube, SST tube) tüplerde toplandı.

- Enjektörle alınan kan örnekleri tüpe aktarılırken hemolizi engellemek için enjektör iğnesi çıkarılarak tüpün içine kan yavaşça aktarılır. “Hemolize uğramış kan hücrelerinin içeriği seruma geçecek ve mevcut DNAaz’lar serumdaki DNA’yı parçalayacaktır.”
- Kan tüpe aktarıldıktan sonra pıhtılaşma aktivatörünün kanla karışmasını sağlamak için tüp yavaşça beş kez ters-yüz edilir.
- Tüp dik pozisyonda oda ısısında 30 dakika pıhtılaşmaya bırakılır. 30 dakikayı aşan beklemlerde hemoliz gözlenmektedir.
- Pıhtılaşmadan sonra 10–15 dakika 3000g’de santrifüj edilir (kullanılan santrifüj: SORVALL RC 30 Plus, rotor code:29).
- Santrifügasyon sonrası jelin üst kısmında serum örneği, alt kısmında kanın diğer konponentleri toplanmaktadır.
- Jelin üstünden jele girmeden pipet yardımıyla serum örneği alınır ve steril 2ml’lik eppendorf tüplere aktarılır.
- Eppendorf tüpler kodlandıktan* sonra serum örnekleri sonraki işleme kadar -80⁰C’ye kaldırılır.

*Kodlama: Kan örneği alınan kişiye sırasıyla verilen numara.

3.3. SERUM ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU

3.3.1 Ticari İzolasyon Kiti Yöntemi

Serum örneklerinden DNA izolasyonu için NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti kullanıldı. Her bir olgu için 2ml serum örneği kullanıldı. İzolasyonda üretici protokolüne sadık kalındı ancak son basamakta daha yüksek verimde DNA elde etmek için elüsyon 200µl yerine 120µl’de yapıldı. Elde edilen DNA çözeltileri 1 hafta içersinde kullanılacaksa +4⁰C’de, 1 haftadan daha uzun süre sonra kullanılacaksa -20⁰C’de saklandı.

Pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılacak olan erkek ve hamile olmayan kadınların kanından DNA izolasyonu yine aynı protokol kullanılarak yapıldı ancak son basamaktaki

elüsyon hacmi 200µl ile yapıldı. Stok DNA çözeltilerinden dilüsyon hazırlanıp +4⁰C'ye kaldırıldı; stok çözeltiler -20⁰C'de saklandı.

3.3.2 Serum Isıtma Yöntemi İle DNA'nın Direkt Elde Edilmesi

- Her bir olgu için 400µl serum örneği 0,5ml steril eppendorf tüplere aktarıldı.
 - Tüplerin ağzı parafilm ile sarıldıktan sonra 99⁰C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
 - Isıtılmış olan örnekler mikrosantrifüjde 12.000rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
 - Santrifügasyon sonrası tüpün üst kısmında toplanan temiz süpernatant PCR'da kullanılmak üzere steril 0,5ml'lik eppendorflara aktarıldı, -20⁰C'de saklandı.
- Kullanılan santrifüj: SORVALL MC 12V

3.4. KİT İLE ELDE EDİLEN DNA SOLÜSYONLARINDAN SPEKTROFOTOMETRE İLE DNA'NIN SAFLIK VE MİKTARININ BELİRLENMESİ

- Stok DNA çözeltilerinden 1/25 oranında dilüsyon hazırlandı. 3µl stok DNA çözeltilisinden alındı ve üzerine 72µl TE tamponu ilave edildi.
- Kör (referans) olarak 300µl TE tamponu kullanıldı
- DNA'nın absorbansı görünür ışığın altında UV dalga boyunda olduğundan quartz spektrofotometre küvetleri kullanıldı. Küvetlerden birine dilüe DNA çözeltilisi, diğerine kör olarak kullanılacak TE tamponu koyuldu.
- Spektrofotometre içindeki birinci bölmeye kör küveti, ikinci bölmeye dilüe DNA küveti yerleştirildi.
- Bilgisayar yardımıyla spektrofotometreye komutlar verilerek dilüe DNA'nın ve kör küvetin sırasıyla 260nm ve 280nm dalga boyundaki ışınları absorblama dereceleri ölçüldü. "DNA maksimum absorbansını 260nm dalga boyundaki ışıkta, proteinler ise 280nm dalga boyundaki ışıkta yapar. Bu dalga boylarındaki ışıklar bu maddelere özgü olup çözeltilinin içindeki DNA ve protein miktarını belirlememizi sağlarlar."
- Spektrofotometre sırasıyla kör küvetin ve dilüe DNA çözeltilisinin 260nm ve 280nm'de absorbanslarını ölçtü. Kör küvetin absorbansını dilüe DNA'ninkinden çıkartarak dilüe DNA çözeltilisinde ne kadar DNA ve protein olduğunu gösterdi.

- Bilgisayar analizi sonucu Abs₂₆₀, Abs₂₈₀, Ratio ve konsantrasyon değerlerine bakıldı.

Abs₂₆₀: DNA'nın absorbans miktarını gösterir.

Abs₂₈₀: Proteinlerin absorbans miktarını gösterir.

Ratio: Abs₂₆₀'ın Abs₂₈₀'e bölünmesiyle bulunur ve izole edilen DNA'nın saflığını gösterir. Bu değer 1.8 olması DNA saflığının optimum olduğunu, 1.8'den büyük olması RNA kontaminasyonunu, 1.8'den küçük olması protein kontaminasyonu olduğunu gösterir.

Konsantrasyon: Dilüe DNA çözeltisinde bulunan DNA'nın konsantrasyonunu µg/ml cinsinden verir.

DNA miktarı: Dilüsyon faktörü × Dilüsyon katsayısı × 260nm OD

Kullanılan spektrofotometre: Pharmacia Biotech Ultrospec 2000.

Bilgisayar programı: SWIFT Spechtrophotometer.

3.5. DNA'NIN ETANOL İLE ÇÖKTÜRÜLMESİ

Kit ile DNA izolasyonu sonucu DNA çözeltisi içerisindeki DNA'nın konsantrasyonunu artırmak için etanol ile çöktürme protokolü uygulanmıştır.

- 15ml'lik tüp içerisinde bulunan 200µl'lik DNA çözeltisi hafifçe tüpün çeperlerine pipetaj yaptıktan sonra 1.5ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı.
- 50µl steril 1X PBS ile 15ml'lik tüpün çeperlerini pipetaj yaparak yıkandı ve 1.5ml'lik tüpe aktarıldı.
- Eppendorf tüpünde toplanan 250µl'lik DNA çözeltisine 27.5µl 3M sodyum asetat (pH: 5.2) eklendi ve çözelti hafifçe 20 saniye vortekslendi.
- Çözeltiye 555µl soğuk absolu etanol eklendi ve hafifçe 30 saniye vortekslendi.
- Çözelti 1 saat -80⁰C'de bekletildi.
- Mikrosantrifüjde 20 dakika maksimum hızda 0⁰C'de santrifüj edildi.
- Tüp pellet üste gelecek şekilde 45⁰ eğimle tutularak otomatik pipetör yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüp yarısına kadar %70'lik etanol ile dolduruldu. +4⁰C'de 3 dakika santrifüj edildi.

- Bir önceki basamak tekrarlanarak süpernatant uzaklaştırıldı.
- Oda ısısında tüpün kapağı açık şekilde kalan etanol uçana kadar bekletildi.
- DNA pelleti 20 ya da 50µl TE tamponu (pH: 8.0) içinde çözüldü.

Not: Protokol 200µl'lik DNA çözeltisi için verilmiştir. Daha küçük ya da daha büyük hacimlerdeki DNA çözeltileri için protokolde kullanılan tamponların miktarları orantılanarak değiştirilmiştir.

Kullanılan soğutmalı santrifüj: Eppendorf Centrifuje 5417R

3.6. DNA İZOLASYON ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİNDE GÖRÜNTÜLENMESİ

Tüm DNA izolasyon ürünleri DNA yükleme tamponu ile 0,7µg/ml EtBr içeren %1'lik agaroz jele yüklendi, 10V/cm olacak şekilde 1 saat 0,5X TBE tamponunda yürütüldü. Elektroforez sonuçları EagleSight Software (Stratagene) ve Bio Imaging Systems (Synegene) kullanılarak değerlendirildi.

Yüklemeler:

15µl DNA izolasyon ürünü + 1.5µl Yükleme tamponu (Bromfenol blue sukroz çözeltisi)

1.5µl DNA Ladder (Fermantas GeneRuler 100bp DNA Ladder) + 1µl Yükleme tamponu

3.7. KONVANSİYONEL PCR DENEYLERİ

3.7.1 DYS14 Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu

Y kromozomuna özgü bir dizi olan DYS14, Lo ve arkadaşları tarafından tanımlanan Y1.7 ve Y1.8 primer çifti ile amplifiye edildi (6). Bu primerlerin hedefinde bulunan DNA dizisi insan genomunda tek kopya halinde Y kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Reaksiyon sonucunda 198bp (bp: baz çifti) uzunluğunda özgün amplifikasyon ürünü oluşmaktadır. DYS14 dizisine özgü primerler ve baz dizileri Tablo 3'de gösterilmiştir. Tablo 4'de reaksiyonda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları verilmiştir; Tablo 5'de PCR için uygun sıcaklık profili verilmiştir.

Kullanılan Termalcycler: MJ Research, INC. PTC-100 programmable Thermal Controller.

Tablo 3: Kullanılan hedef dizilere ait primerler ve baz dizileri

Hedef Dizi	GenBank Numarası	Primerler	Baz Dizisi
DYS14	X06325	Y1.7	5'-CAT CCA GAG CGT CCC TGG CTT-3'
		Y1.8	5'-CTT TCC ACA GCC ACA TTT GTC-3'
İnsan SRY	X53772	SRYf	5'-GGC AAC GTC CAG GAT AGA GTG A-3'
		SRYr	5'-TGC TGA TCT CTG AGT TTC GCA TT-3'
Fare GALT	U41282	mGALTf	5'-GCT TCC CGA GGT ACA CTA TTG C-3'
		mGALTTr	5'-GTC ACA TCT GCC CGA ACT CC-3'
İnsan GAPDH	AY340484	hGAPDHf	5'-CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC-3'
		hGAPDTr	5'-CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT-3'

Tablo 4: DYS14 ve İnsan GAPDH dizilerinin konvansiyonel PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklenen Miktar (µl)
Primer F	Metabion International AG	10pmol/µl	0.4pmol/µl	2
Primer R	Metabion International AG	10pmol/µl	0.4pmol/µl	2
Reaksiyon Tamponu	Fermantas Hot Start Taq DNA Polimeraz Tamponu	10X	1X	5
MgCl ₂	Fermantas	25mM	2.5mM	5
dNTPmix	MBI Fermantas	10mM	0.2mM	1
Taq DNA Polimeraz	Fermantas Hot Start Taq DNA Polimeraz	5u/µl	0.05u/µl	0.5
Kalıp				20
Distile su				14,5

Tablo 5: DYS14 ve İnsan GAPDH dizilerinin konvansiyonel PCR amplifikasyonu için uygun sıcaklık profilleri.

Sıcaklık Değeri	Bekleme süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
95 ⁰ C	10 dakika	1	Başlangıç denatürasyonu
94 ⁰ C	1 dakika	45	Denatürasyon
57 ⁰ C	1 dakika		Primer Bağlanması
72 ⁰ C	1 dakika		Uzatma
72 ⁰ C	10 dakika	1	Son uzatma

3.7.2 SRY Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu

SRY, Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunur ve Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen gen bölgesi olarak adlandırılır (The sex-determining gene region of the Y chromosome: SRY). SRY dizisi, Costa ve arkadaşları tarafından tanımlanan SRYf ve SRYr primer çifti ile amplifiye edildi (7). Bu primerlerin hedefinde bulunan DNA dizisi insan genomunda tek kopya halinde Y kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Reaksiyon sonucunda 115bp uzunluğunda özgün amplifikasyon ürünü oluşmaktadır. SRY dizisine özgü primerler ve baz dizileri Tablo 3’de gösterilmiştir. Tablo 6’de reaksiyonda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları verilmiştir; Tablo 7’de PCR için uygun sıcaklık profili verilmiştir.

Tablo 6: SRY dizisinin konvansiyonel PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklenen Miktar (µl)
Primer F	Metabion International AG	10pmol/µl	0.4pmol/µl	2
Primer R	Metabion International AG	10pmol/µl	0.4pmol/µl	2
Reaksiyon Tamponu	Fermantas Hot Start Taq DNA Polimeraz Tamponu	10X	1X	5
MgCl ₂	Fermantas	25mM	3mM	6
dNTPmix	MBI Fermantas	10mM	0.2mM	1
Taq DNA Polimeraz	Fermantas Hot Start Taq DNA Polimeraz	5u/µl	0.05u/µl	0.5
Kalıp				20
Distile su				13,5

Tablo 7: SRY dizisinin konvansiyonel PCR amplifikasyonu için uygun sıcaklık profili.

Sıcaklık Değeri	Bekleme süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
95 ⁰ C	10 dakika	1	Başlangıç denatürasyonu
94 ⁰ C	1 dakika	45	Denatürasyon
59 ⁰ C	1 dakika		Primer Bağlanması
72 ⁰ C	1 dakika		Uzatma
72 ⁰ C	10 dakika	1	Son uzatma

3.7.3 İnsan GAPDH Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu

Otozomal bir lokus olan insan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni deneylerde DNA'nın varlığını göstermek için iç kontrol olarak kullanıldı. İnsan GAPDH genine özgü hGAPDHf ve hGAPDHR primer çifti kullanılarak hedef dizinin amplifikasyonu yapıldı. Reaksiyon sonucunda 97bp uzunluğunda özgün amplifikasyon ürünü oluşmaktadır. İnsan GAPDH genine özgü primerler ve baz dizileri Tablo 3'de gösterilmiştir. Tablo 4'de reaksiyonda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları verilmiştir; Tablo 5'de PCR için uygun sıcaklık profili verilmiştir.

3.7.4 Fare GALT Dizisi İçin Konvansiyonel PCR Reaksiyonu

Otozomal bir lokus olan fare galaktoz-1-fosfat uridiltransferaz (mGALT) geni deneylerde DNA'nın varlığını göstermek için kontrol olarak kullanıldı. fare GALT geni, Costa ve arkadaşları tarafından tanımlanan mGALTf ve mGALTTr primer çifti ile amplifiye edildi (7). Reaksiyon sonucunda 132bp uzunluğunda özgün amplifikasyon ürünü oluşmaktadır. Fare GALT dizisine özgü primerler ve baz dizileri Tablo 3'de gösterilmiştir. Tablo 8'de reaksiyonda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları verilmiştir; Tablo 9'de PCR için uygun sıcaklık profili verilmiştir.

Tablo 8: fare GALT geninin konvansiyonel PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklene Miktar (µl)
Primer F	TIB MOLBIOL	10pmol/µl	0.4pmol/µl	1
Primer R	TIB MOLBIOL	10pmol/µl	0.4pmol/µl	1
Reaksiyon Tamponu	Fermantas Hot Start Taq DNA Polimeraz Tamponu	10X	1X	2,5
MgCl ₂	Fermantas	25mM	1,5mM	1,5
dNTPmix	MBI Fermantas	10mM	0.2mM	0.5
Taq DNA Polimeraz	Fermantas Hot Start Taq DNA Polimeraz	5u/µl	0.04u/µl	0.2
Kalıp				10
Distile su				8.3

Tablo 9: fare GALT geninin konvansiyonel PCR amplifikasyonu için uygun sıcaklık profili.

Sıcaklık Değeri	Bekleme süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
95 ⁰ C	5 dakika	1	Başlangıç denatürasyonu
95 ⁰ C	30 saniye	40	Denatürasyon
56 ⁰ C	45 saniye		Primer Bağlanması
72 ⁰ C	1 dakika		Uzatma
72 ⁰ C	7 dakika	1	Son uzatma

3.8. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE GÖRÜNTÜLENMESİ

Tüm PCR ürünleri DNA yükleme tamponu ile 0,7µg/ml EtBr içeren %2'lik agaroz jele yüklendi, 10V/cm olacak şekilde 1 saat 0,5X TBE tamponunda yürütüldü. Elektroforez sonuçları EagleSight Software (Stratagene) ve Bio Imaging Systems (Synegene) kullanılarak değerlendirildi.

Yüklemeler:

10µl PCR ürünü + 1µl Yükleme tamponu (Bromfenol blue sukroz çözeltisi)

1.5µl DNA Ladder (Fermantas GeneRuler 100bp DNA Ladder) + 1µl Yükleme tamponu

3.9. DYS14 VE SRY DİZİLERİNE ÖZGÜ KONVANSİYONEL PCR REAKSİYONLARININ DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

DYS14 ve SRY dizileri için kurulan PCR reaksiyonlarının hedef dizilerini belirleme limitlerini değerlendirmek için DNA izolasyon kiti ve serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA çözeltilerinin seri dilüsyonlarına bu diziler için PCR kuruldu. Sağlıklı bir erkeğin serumundan elde edilen stok DNA çözeltilerinden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında çözeltiler hazırlandı. Her bir çözeltiden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde DYS14 ve SRY için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Ayrıca DYS14 ve SRY dizileri için kurulan PCR reaksiyonlarının en az kaç gram DNA'yı belirleyebildiklerini ölçmek için sağlıklı bir erkeğin kanından izole edilen DNA çözeltisindeki DNA miktarı spektrofotometre ile hesaplandıktan sonra 25ng/µl -2,5pg/µl arasındaki dilüe DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

3.10. KONVANSİYONEL PCR İLE FETAL CİNSİYETİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK DENEYLER

3.10.1 DYS14 Dizisi ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi

Gebe kadın serumundan izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak DYS14 dizisi için PCR kuruldu. Deney üç ayrı reaksiyon kurularak tekrarlandı. Üç reaksiyondan en az ikisinde amplifikasyon gözlenmesi durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirildi ve fetusun cinsiyeti erkek olarak kabul edildi. Amplifikasyonun gözlenmediği durumlarda sonuç negatif olarak değerlendirildi, fetusun cinsiyeti dişi olarak kabul edildi. Ayrıca sadece 1 reaksiyonda amplifikasyon gözlemlendiği durumlarda sonuç negatif ve fetusun cinsiyeti dişi olarak kabul edildi; bu durumun PCR'ın kurulumu sırasında oluşan kontaminasyondan kaynaklandığı düşünüldü.

Her bir deney sırasında pozitif kontrol için sağlıklı erkek serumundan izole edilen DNA, negatif kontrol için sağlıklı gebe olmayan kadın serumundan izole edilen DNA kalıp olarak kullanıldı.

3.10.2 SRY Dizisi ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi

Gebe kadın serumundan izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak SRY dizisi için PCR kuruldu. Deney üç ayrı reaksiyon kurularak tekrarlandı. Üç reaksiyondan en az ikisinde amplifikasyon gözlenmesi durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirildi ve fetusun cinsiyeti erkek olarak kabul edildi. Amplifikasyonun gözlenmediği durumlarda sonuç negatif olarak değerlendirildi, fetusun cinsiyeti dişi olarak kabul edildi. Ayrıca sadece 1 reaksiyonda amplifikasyon gözlemlendiği durumlarda sonuç negatif ve fetusun cinsiyeti dişi olarak kabul

edildi; bu durumun PCR'ın kurulumu sırasında oluşan kontaminasyondan kaynaklandığı düşünöldü.

Her bir deney sırasında pozitif kontrol için sağlıklı erkek serumundan izole edilen DNA, negatif kontrol için sağlıklı gebe olmayan kadın serumundan izole edilen DNA kalıp olarak kullanıldı.

3.10.3 İnsan GAPDH Dizisi ile Fetal Cinsiyeti Belirleme Verimliliğinin Değerlendirilmesi

DYS14 ya da SRY dizisine yönelik gebe kadın serumundan, sağlıklı erkeklerden ve gebe olmayan kadınlardan izole edilen DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı konvansiyonel PCR deneylerinde sonucun negatif olarak değerlendirildiği durumlarda, aynı kalıp DNA kullanılarak insan GAPDH dizisi için PCR reaksiyonu kuruldu. Bu işlemler DNA izolasyonu sırasında yetersiz DNA ekstraksiyonundan ya da DNA çözeltisindeki PCR inhibitörlerinden kaynaklanan bir yalancı negatif sonucun gerçek negatif sonuçtan ayırt edilmesine izin verir. İnsan GAPDH dizisi için kurulan PCR reaksiyonunun verdiği pozitif sonuç işlemin verimliliğini göstermekte, DYS14 ve SRY dizilerinin belirlenmesindeki herhangi bir negatif sonucu onaylamaktadır.

Her bir deney sırasında pozitif kontrol için sağlıklı erkek serumundan izole edilen DNA, negatif kontrol için distile su kalıp olarak kullanıldı.

3.10.4 Fare GALT Dizisi ile Kalıp DNA Varlığının Kontrolü

DNA izolasyonuna başlamadan önce serum örneğine belirli miktarda dişi fare DNA'sı eklenerek izolasyonun bu örnekten yapılması böylece DYS14 ya da SRY dizisine yönelik gebe kadın serumundan, sağlıklı erkeklerden ve gebe olmayan kadınlardan izole edilen DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı konvansiyonel PCR deneylerinde sonucun negatif olarak değerlendirildiği durumlarda yalancı negatifliği belirlemek için aynı DNA çözeltisinin kalıp olarak kullanıldığı fare GALT dizisine yönelik PCR kurulması hedeflendi. Bu amaçla 2ml'lik serum örneğine ne kadar dişi fare DNA'sı koyulması gerektiğini belirlemek için aynı sağlıklı erkeğe ait 5 tane 2ml'lik serum örneğine 3ng-200ng miktarlarında dişi fare DNA'sı eklendi. Kit ile DNA izolasyonu sonrasında fare GALT dizisi için tanımlanan reaksiyon karışımında ve termal profilinde PCR kuruldu.

3.11. GERÇEK ZAMANLI PCR DENEYLERİ

3.11.1. DYS14 Dizisi İçin Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu

Y kromozomuna özgü bir dizi olan DYS14, Y1.7 ve Y1.8 primer çifti ile amplifiye edildi (6). DYS14 dizisine özgü primerler ve baz dizileri Tablo 3'de gösterilmiştir. Tablo 10'da reaksiyonda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları verilmiştir; Tablo 11'de PCR için uygun sıcaklık profili verilmiştir.

Kullanılan Termalcyclus: LightCycler 2.0 Instrument.

Tablo 10: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklene Miktar (µl)
Primer F	TIB MOLBIOL	10pmol/µl	0.4pmol/µl	1
Primer R	TIB MOLBIOL	10pmol/µl	0.4pmol/µl	1
LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I	Roche Diagnostics	10X	1X	2
MgCl ₂	Roche Diagnostics	25mM	2,5mM	2
Kalıp				5
H ₂ O, PCR Grade	Roche Diagnostics			9

Tablo 11: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı profili.

Uygulanan Analiz	Sıcaklık Değeri	Bekleme süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
Miktar analizi	95 ⁰ C	8 dakika	1	Başlangıç denatürasyonu
	95 ⁰ C	10 saniye	50	Denatürasyon
	57 ⁰ C	10 saniye		Primer Bağlanması
	72 ⁰ C	10 saniye		Uzatma
Erime Isısı Analizi	95 ⁰ C	0 saniye	1	Denatürasyon
	70 ⁰ C	15 saniye	1	Bağlanma
	95 ⁰ C	0 saniye	1	Erime

3.11.2 SRY Dizisi İçin Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonu

SRY dizisi, Costa ve arkadaşları tarafından tanımlanan SRYf ve SRYr primer çifti ile amplifiye edildi (7). SRY dizisine özgü primerler ve baz dizileri Tablo 3’de gösterilmiştir. Tablo 12’de reaksiyonda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları verilmiştir; Tablo 13’de PCR için uygun sıcaklık profili verilmiştir.

Tablo 12: SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklene Miktar (µl)
Primer F	TIB MOLBIOL	10pmol/µl	0.75pmol/µl	1.5
Primer R	TIB MOLBIOL	10pmol/µl	0.75pmol/µl	1.5
LightCycler FastStart SYBR Green I Reaction Mix	Roche Diagnostics	10X	1X	2
MgCl ₂	Roche Diagnostics	25mM	2,5mM	2
Kalıp				5
H ₂ O, PCR Grade	Roche Diagnostics			8

Tablo 13: SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR amplifikasyonunda kullanılan ısı profili.

Uygulanan Analiz	Sıcaklık Değeri	Bekleme süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
Miktar analizi	95 ⁰ C	8 dakika	1	Başlangıç denatürasyonu
	95 ⁰ C	12 saniye	45	Denatürasyon
	59 ⁰ C	10 saniye		Primer Bağlanması
	72 ⁰ C	15 saniye		Uzatma
Erime Isısı Analizi	95 ⁰ C	0 saniye	1	Denatürasyon
	70 ⁰ C	15 saniye	1	Bağlanma
	95 ⁰ C	0 saniye	1	Erime

3.12. DYS14 VE SRY DİZİLERİNE ÖZGÜ GERÇEK ZAMANLI PCR REAKSİYONLARININ DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

DYS14 ve SRY dizileri için kurulan gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarının hedef dizilerini belirleme limitlerini değerlendirmek için DNA izolasyon kiti ile izole edilen DNA çözeltilisinin seri dilüsyonlarına bu diziler için PCR kuruldu. Sağlıklı bir erkeğin serumundan elde edilen stok DNA çözeltilisinden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında çözeltiler hazırlandı. Her bir çözeltiliden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde DYS14 ve SRY için gerçek zamanlı PCR kuruldu.

3.13. GERÇEK ZAMANLI PCR İLE FETAL CİNSİYETİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK DENEYLER

3.13.1 DYS14 Dizisi ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi

Gebe kadın serumundan izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak DYS14 dizisi için gerçek zamanlı PCR kuruldu. Deney üç ayrı reaksiyon kurularak tekrarlandı. Üç reaksiyondan en az ikisinde amplifikasyon gözlenmesi durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirildi ve fetusun cinsiyeti erkek olarak kabul edildi. Amplifikasyonun gözlenmediği durumlarda sonuç negatif olarak değerlendirildi, fetusun cinsiyeti dişi olarak kabul edildi. Ayrıca sadece 1

reaksiyonda amplifikasyon gözlemlendiği durumlarda sonuç negatif ve fetusun cinsiyeti dişi olarak kabul edildi; bu durumun PCR'ın kurulumu sırasında oluşan kontaminasyondan kaynaklandığı düşünöldü.

Her bir deney sırasında pozitif kontrol için sağlıklı erkek serumundan izole edilen DNA, negatif kontrol için PCR grade su kullanıldı.

3.14. ANTİKONTAMİNASYON ÖLÇÜTLERİ

DNA ekstraksiyonu, PCR amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin belirlenmesi sırasındaki kontaminasyonu önlemek için dikkat edilen durumlar: Tüm sıvılar için aerosol resistant pipetler kullanıldı. DNA izolasyonu, amplifikasyon reaksiyonunun hazırlanması, amplifikasyonun yapıldığı ve PCR ürünlerinin belirlendiği alanlar birbirinden ayrıldı. PCR ürünlerinin belirlenmesi dışındaki tüm uygulamalar bir laminar flow kabininde yapıldı. PCR reaksiyonları sırasında negatif kontrol olarak distile su ya da gebe olmayan sağlıklı kadından izole DNA kalıp olarak kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. OLGULAR

Çalışmaya Nisan 2006-Haziran 2006 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Gebe Polikliniğine başvuran çeşitli sebeplerden ikili ve üçlü tarama testine ve amniyosentez analizine gönderilen 40 gebe kadın alındı. Bu çalışmaya katılan tüm gebe kadınlar rasgele seçilmiştir ve kan örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirildiklerine ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına dair imzalı onam alınmıştır.

Gebe kadınlardan iki tanesinin (9 ve 19'ncü olgular) kan örneği kan alma merkezinden isimsiz gönderildiği için çalışmadan çıkarıldı. Bazı olguların gebeliklerine ilişkin bilgiler arşiv dosyalarına ulaşamadığından ya da arşiv dosyalarında ilgili bilgiler bulunmadığından elde edilemezken bazı olguların henüz kontrol yöntemleriyle cinsiyeti belirlenmemiştir. Olguların gebelikleriyle ilgili bilgiler tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14: Çalışmaya katılan olgulara ait gebelik bilgileri.

Olgu No	Gebelik Yaşı	Önceki Gebelikten Çocuk	Fetüsün Cinsiyeti	Cinsiyeti Belirleyen Yöntem
1	24hafta	1995 kız	Erkek	Ultrason
2	19hafta	2004 kız	Erkek	Ultrason
3	17hafta	1994 erkek, 1999 kız	?	?
4	?*	?	?	?
5	21hafta+5gün	?	?	?
6	17hafta+2gün	1990 kız, 1992 erkek	Erkek	amniyosentez
7	22 hafta	Yok	Erkek	Ultrason
8	15hafta+4gün	1997 erkek	Kız	amniyosentez
9	İPTAL			
10	16hafta+2gün	Yok	?	?
11	16hafta+1gün	Yok	Erkek	Ultrason
12	?	?	?	?
13	14hafta	2003 erkek, 2004 7'nci hafta kürtaj	?	?
14	13hafta+4gün	1995 kız, 1998 abortus, 2000 kız, 2004 kız	Erkek	Ultrason
15	15hafta+5gün	2002 erkek	Erkek	amniyosentez
16	16hafta+1gün	2001 kız	Erkek	Ultrason
17	12hafta+1gün	2000 kız	Erkek	Ultrason
18	?	?	?	?
19	İPTAL			
20	16hafta+6gün	?	Erkek	amniyosentez
21	20hafta	Yok	Erkek	Ultrason
22	?	?	?	?
23	?	?	?	?
24	?	?	?	?
25	16hafta+4gün	1995 kız, 1999 kız	?	?
26	?	?	?	?
27	11hafta+3gün	Yok	Erkek	amniyosentez
28	24hafta	Yok	Erkek	Ultrason
29	24hafta	Yok	Erkek	Ultrason
30	16hafta+3gün	1999 kız, 2002 erkek	Kız	Ultrason
31	16hafta+6gün	1993 erkek, 2001 kız	?	?
32	11hafta+4gün	Yok	Erkek	amniyosentez
33	21hafta	95 kız	Erkek	Ultrason
34	15hafta+3gün	91 erkek, 98 erkek	Erkek	amniyosentez
35	17hafta	2001 kız	Kız	amniyosentez
36	20hafta	2005 kız	Kız	ultrason
37	20hafta	Yok	Erkek	ultrason
38	24hafta	1997 abortus, 1997 kürtaj, 1998 abortus, 2000 erkek	Kız	Ultrason
39	12hafta+4gün	1996 kız	Erkek	amniyosentez
40	18 hafta	Yok	Erkek	Ultrason

*Henüz gebelik bilgilerine ulaşılamayan olgulara ait ilgili kutulara soru işareti koyulmuştur.

4.2. SERUM VE KAN ÖRNEKLERİNDEN TİCARİ KİT İLE İZOLE EDİLEN DNA'NIN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ

Serum ve kan örneklerinden NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile elde edilen DNA çözeltilerindeki DNA'nın miktarı spektrofotometre ile analizi edildi. Serum örneklerinden elde edilen çözeltide çok düşük miktarda DNA olmasından dolayı güvenilir ve anlamlı sonuç sağlanamadı. Bu yüzden saflık ve miktar tayinleri yapılamadı. Kan örneklerinden gelen DNA çözeltilerinin miktar ve saflıkları optimum çıktı. Tüm örneklere ait sonuçlar Tablo 15, 16, 17'de verilmiştir.

Tablo 15: Sağlıklı erkek serumlarından izole edilen DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları:

Olgular	Abs ₂₆₀	Abs ₂₈₀	Ratio	Konsantrasyon (ng/μl)
Örnek 1	0,003	0,006	0,500	0,150
Örnek 2	0,004	0,003	1,333	0,200
Örnek 3	0,001	0,400	0,250	0,500

Tablo 16: Sağlıklı gebe olmayan kadın serumlarından izole edilen DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları

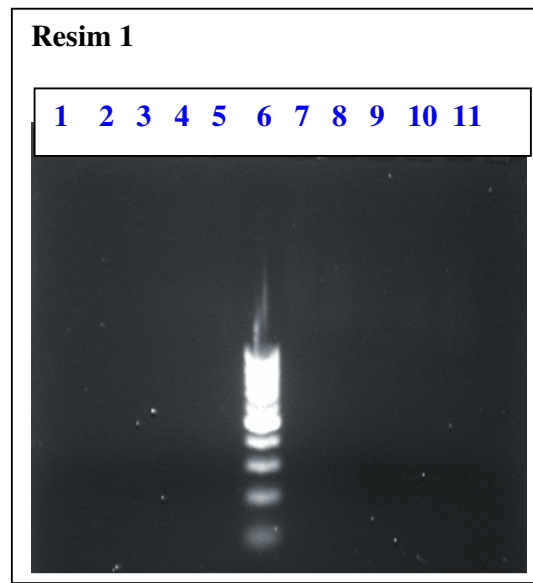
Olgular	Abs ₂₆₀	Abs ₂₈₀	Ratio	Konsantrasyon (ng/μl)
Örnek 1	0,002	0,002	1,000	0,100
Örnek 2	0,003	0,005	0,600	0,150
Örnek 3	0,001	0,005	0,200	0,50

Tablo 17: Sağlıklı erkek, gebe olmayan sağlıklı kadın ve dişi fare'nin kan örneklerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları.

Olgular	Abs ₂₆₀	Abs ₂₈₀	Ratio	Konsantrasyon (ng/μl)
Erkek 1	0,70	0,40	1,750	35,0
Erkek 2	0,65	0,36	1,805	32,5
Kadın 1	0,71	0,38	1,868	35,5
Kadın 2	0,61	0,34	1,754	30,5
Dişi fare	0,46	0,21	2,179	23,10

4.3. TİCARİ KİT VE SERUM ISITMA YÖNTEMİ İLE İZOLE EDİLEN DNA'LARIN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Serum örneklerinden ticari kit ve serum ısıtma yöntemi ile izole edilen DNA çözeltilerindeki DNA'nın saflık ve miktar tayini için bu örneklerin agaroz jel elektroforezi yapıldı. Serum örneklerinden elde edilen çözeltilerde çok düşük miktarda DNA olmasından dolayı agaroz jelde bu örnekler görüntülenemedi. Bu yüzden saflık ve miktar tayinleri yapılamadı. Agaroz jel elektroforezine ait görüntü Resim 1'de verilmiştir.

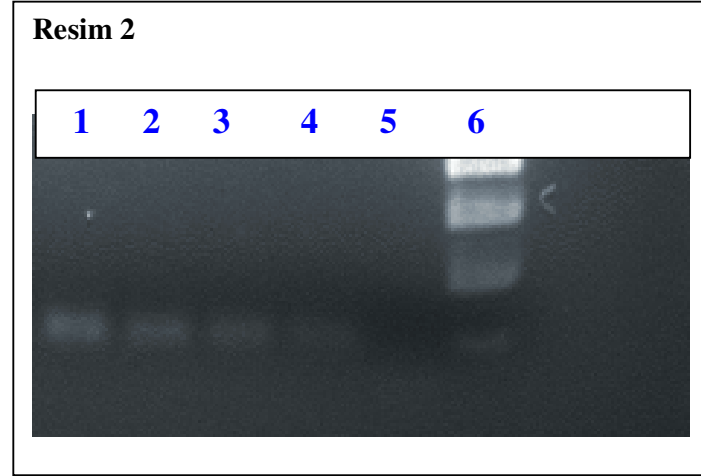


Resim 1: 1, 2, 3, 4 ve 5'nci kuyulara ticari kit ile izole edilen DNA örnekleri, 6. kuyuya 100bp DNA ladder, 7, 8, 9, 10 ve 11'nci kuyulara serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'lar yüklenmiştir.

4.4. İNSAN GAPDH DİZİSİNE ÖZGÜ KONVANSİYONEL PCR REAKSİYONU İLE SERUM ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN DNA ÇÖZELTİLERİNDE DNA OLUP OLMADIĞININ ARAŞTIRILMASI

Serum örneklerinden ticari kit ve serum ısıtma yöntemi ile izole edilen DNA çözeltilerinde DNA olup olmadığını anlamak için otozomal bir lokus olan insan GAPDH dizisi için konvansiyonel PCR kuruldu. Tüm DNA çözeltilerinde DNA'nın varlığı 97bp'lik

amplifikasyon ürünü yardımıyla gösterilmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 2’de gösterilmiştir.



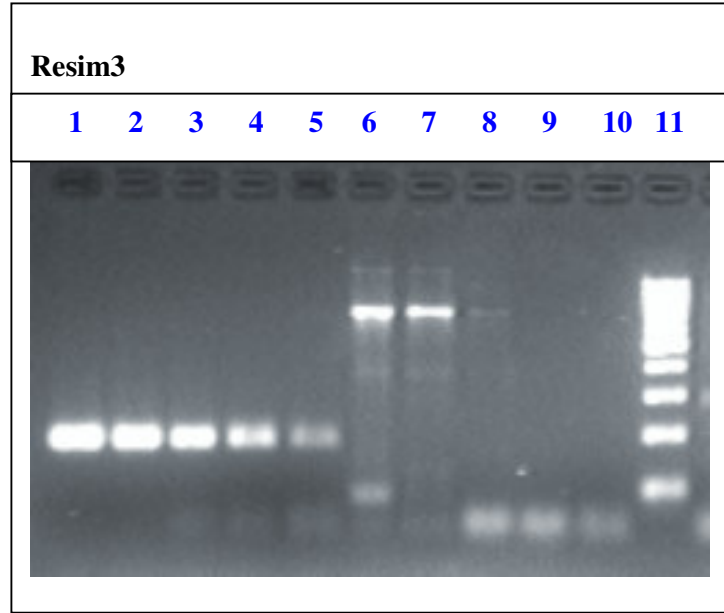
Resim 2: İnsan GAPDH dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1 ve 2’nci bantlar ticari kit izolasyonundan gelen örneklerin amplifikasyon ürünleri, 3’ncü bant serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA’nın amplifikasyon ürünü, 4’ncü bant pozitif kontrol (25pg DNA), 5’nci bant negatif kontrol (distile su), 6’ncı bant 100bp DNA ladder.

4.5. DYS14 DİZİSİNE ÖZGÜ KONVANSİYONEL PCR DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

4.5.1 En az belirleyebildiği erkek DNA’sı miktarının ve kadın DNA’sında amplifikasyon yapıp yapmadığının ölçülmesi

Sağlıklı bir erkeğin ve gebe olmayan bir kadın kanından izole edilen DNA çözeltilerindeki DNA miktarı spektrofotometre ile hesaplandıktan sonra 25ng/μl -2,5pg/μl arasındaki dilüe DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiden alınan aynı miktardaki kalıba (1μl) tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde DYS14 için PCR kuruldu.

Reaksiyon sonucunda DYS14 dizisine özgü primerlerin en az 2.5pg erkek DNA’sını belirleyebildiğini, gebe olmayan kadın DNA’sının kalıp olarak kullanılması durumunda 250pg’a kadar primerlerin hedef dizisinden farklı bant verdiği, 250pg’dan daha az DNA’nın kalıp olarak kullanılması durumunda amplifikasyon vermediği gözlemlendi. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 3’de gösterilmiştir.



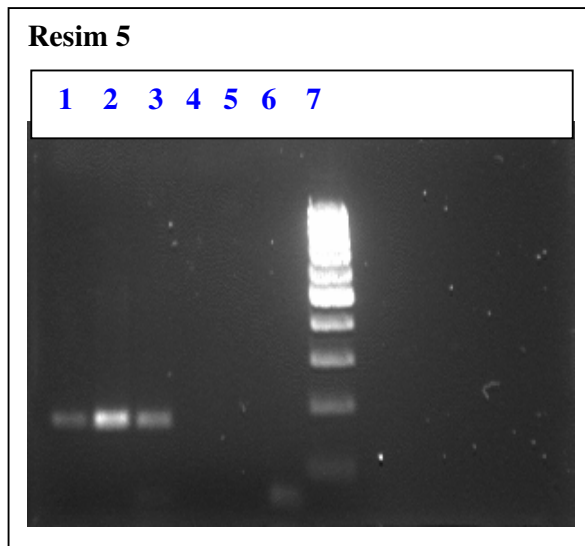
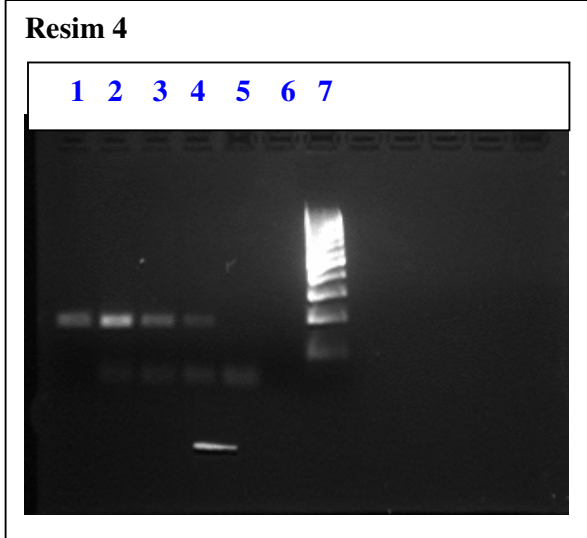
Resim 3: DYS14 dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1, 2, 3, 4, 5'nci bantlar sırasıyla 25ng, 2.5ng, 250pg, 25pg, 2.5pg erkek DNA'sının kalıp olarak kullanılması sonucu elde edilen bantlar. 6, 7, 8, 9, 10'ncü bantlar sırasıyla 25ng, 2.5ng, 250pg, 25pg, 2.5pg gebe olmayan kadın DNA'sının kalıp olarak kullanılması sonucu elde edilen bantlar. 11. kuyu 100bp DNA Ladder.

4.5.2. Erkek Serumundan İzole Edilen DNA'nın DYS14 ile Belirlenmesi

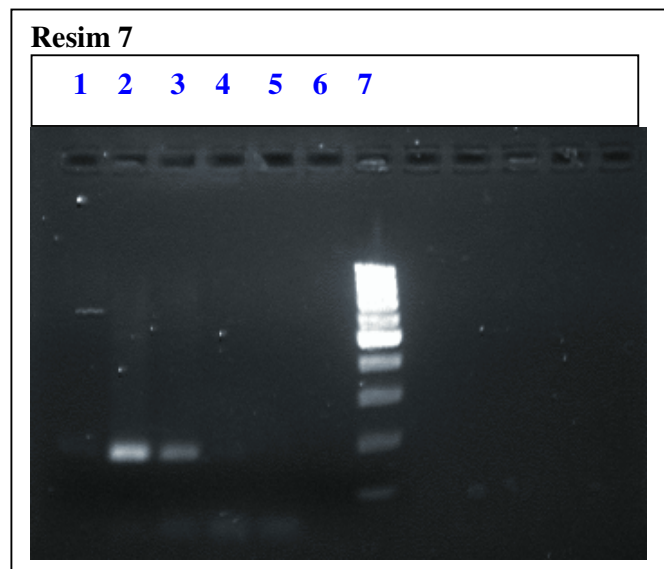
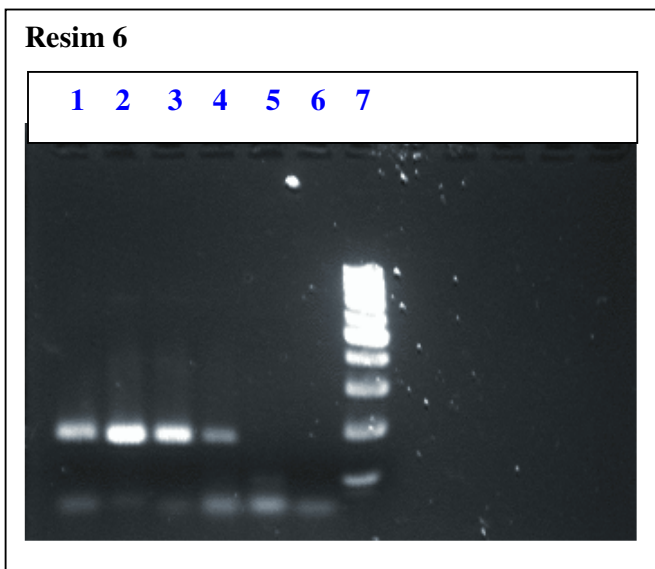
Sağlıklı bir erkeğin 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ve 400µl serumundan serum ısıtma yöntemi ile elde edilen stok DNA çözeltilerinden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde DYS14 için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak gebe olmayan dişi serumundan izole DNA kullanıldı. Tam reaksiyon hacminin 50µl ve 25µl olduğu iki farklı reaksiyonda DYS14'e özgü primerlerin hedef bölgelerini ticari kit ve serum ısıtma yöntemi ile izole edilen erkek serum DNA'sının hangi dilüsyonuna kadar belirleyebildiklerine bakıldı.

Hem NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti hem de serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı DYS14 PCR duyarlılık deneylerinde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Tam hacmin 50µl olduğu reaksiyonlarda 1:1000 dilüsyona kadar, Tam hacmin 25µl olduğu reaksiyonlarda 1:100 dilüsyona kadar

amplifikasyon gözlenmiştir. Gebe olmayan kadın serumundan izole DNA'nın amplifikasyonu ise gözlenmemiştir. NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile izole DNA'nın kullanıldığı, tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri sırasıyla Resim 4 ve Resim 5'de gösterilmiştir. Serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı, tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri ise sırasıyla Resim 6 ve Resim 7'de gösterilmiştir.



Resim 4 ve 5: Kalıp olarak NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı DYS14 dizisi için sırasıyla tam hacmin 50 μ l ve 25 μ l olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri. 1'nci bant stok DNA çözeltisinin kalıp olarak kullanıldığı, 2, 3, 4 ve 5'nci bantlar sırasıyla 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyondaki DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı, 6'ncı bant negatif kontrol olarak gebe olmayan dişi serumundan izole DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünlerini göstermektedir. 7'nci bant 100bp DNA ladder.



Resim 6 ve 7: Kalıp olarak serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı DYS14 dizisi için sırasıyla tam hacmin 50 μ l ve 25 μ l olduğu reaksiyonların amplifikasyon

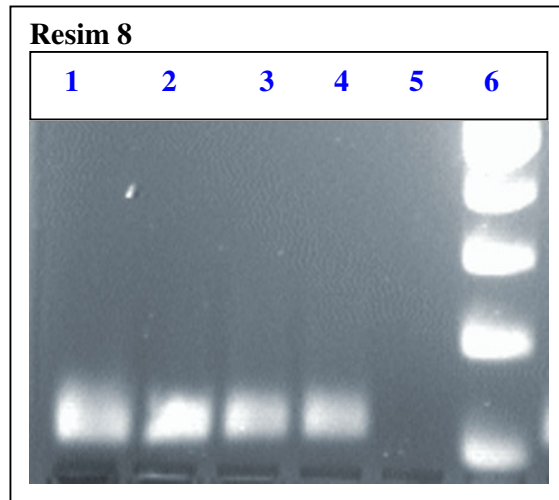
ürünleri. 1'nci bant stok DNA çözeltisinin kalıp olarak kullanıldığı, 2, 3, 4 ve 5'nci bantlar sırasıyla 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyondaki DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı, 6'ncı bant negatif kontrol olarak gebe olmayan dişi serumundan izole DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünlerini göstermektedir. 7'nci bant 100bp DNA ladder.

4.6. SRY DİZİSİNE ÖZGÜ KONVANSİYONEL PCR DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

4.6.1. En az belirleyebildiği erkek DNA'sı miktarının ölçülmesi

Sağlıklı bir erkeğin kanından izole edilen DNA çözeltisindeki DNA miktarı spektrofotometre ile hesaplandıktan sonra 10ng/μl -10pg/μl arasındaki dilüe DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiliden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde SRY için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda SRY dizisine özgü primerlerin en az 10pg erkek DNA'sını belirleyebildiğini gözlemlendi. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 8'de gösterilmiştir.

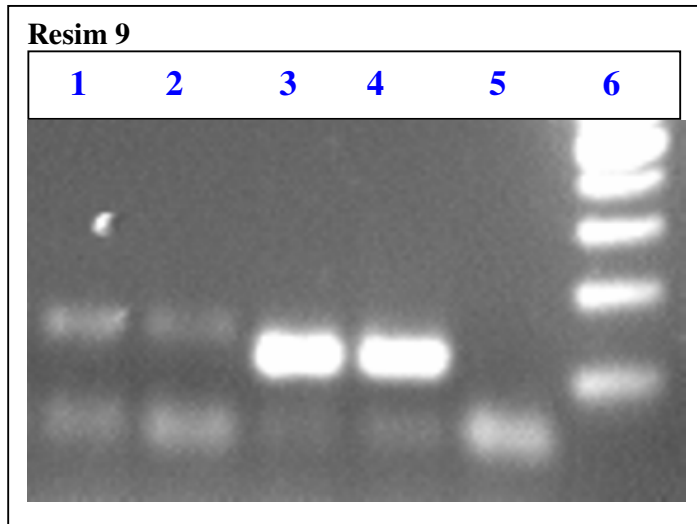


Resim 8: SRY dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1, 2, 3, 4'ncü bantlar sırasıyla 10ng, 1ng, 100pg, 10pg erkek DNA'sının kalıp olarak kullanılması sonucu elde edilen bantlar, 5'inci bant negatif kontrol (distile su), 6'ncı bant 100bp DNA Ladder.

4.6.2. Kadın DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının ölçülmesi

Sağlıklı iki erkeğin ve gebe olmayan iki kadın kanından izole edilen DNA çözeltilerindeki DNA miktarı spektrofotometre ile hesaplandıktan sonra her bir olgudan 25ng DNA kalıp olarak kullanılmak üzere alındı ve tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde SRY için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda erkek olgulardan alınan DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyonda kurduğumuz reaksiyona özgü bantlar gözlenirken, gebe olmayan kadın olgulardan alınan DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyonda özgün bantlarla uyuşmayan farklı bir bölgenin amplifiye olduğunu gözlemledik. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 9'de gösterilmiştir.



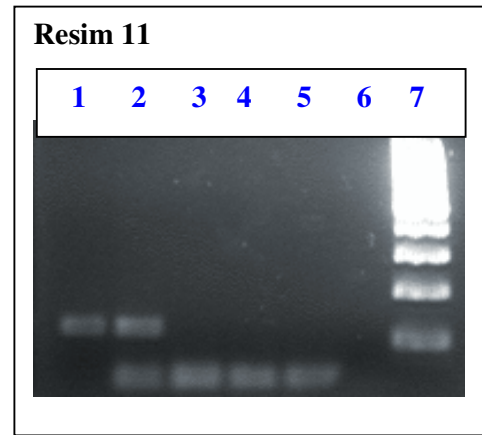
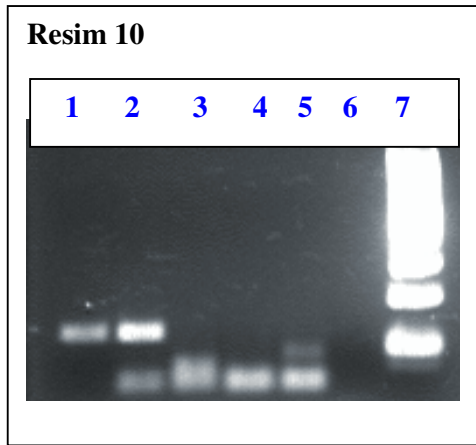
Resim 9: SRY dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1, 2'nci bantlar sırasıyla kadın olguların DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünlerini, 3 ve 4'üncü bantlar sırasıyla erkek DNA'sının kalıp olarak kullanılması sonucu elde edilen amplifikasyon ürünlerini göstermektedir, 5'inci bant negatif kontrol (distile su), 6'ncı bant 100bp DNA Ladder.

4.6.3. Erkek Serumundan İzole Edilen DNA'nın SRY ile Belirlenmesi

Sağlıklı bir erkeğin 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ve 400µl serumundan serum ısıtma yöntemi ile elde edilen stok DNA çözeltilerinden

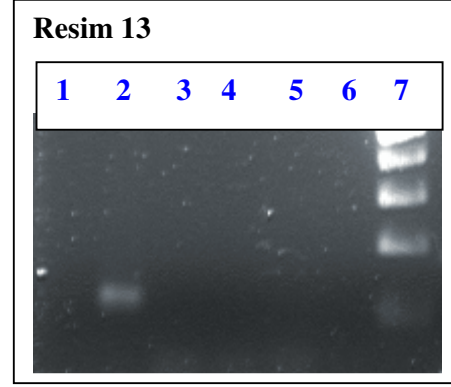
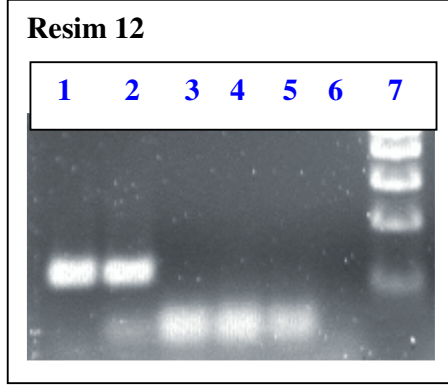
1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde SRY dizisi için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak gebe olmayan dişi serumundan izole DNA kullanıldı. Tam reaksiyon hacminin 50µl ve 25µl olduğu iki farklı reaksiyonda, SRY dizisine özgü primerlerin hedef bölgelerini ticari kit ve serum ısıtma yöntemi ile izole edilen erkek serum DNA'sının hangi dilüsyonuna kadar belirleyebildiklerine bakıldı.

Hem NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti hem de serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı SRY PCR duyarlılık deneylerinde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Tam hacmin 50µl olduğu reaksiyonlarda 1:10 dilüsyona kadar, Tam hacmin 25µl olduğu reaksiyonlarda da 1:10 dilüsyona kadar amplifikasyon gözlenmiştir. Gebe olmayan kadın serumundan izole DNA'nın amplifikasyonu ise gözlenmemiştir. NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile izole DNA'nın kullanıldığı, tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri sırasıyla Resim 10 ve Resim 11'de gösterilmiştir. Serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı, tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri ise sırasıyla Resim 12 ve Resim 13'de gösterilmiştir.



Resim 10 ve 11: Kalıp olarak NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı SRY dizisi için sırasıyla tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri. 1'nci bant stok DNA çözeltilerinin kalıp olarak

kullanıldığı, 2, 3, 4 ve 5'nci bantlar sırasıyla 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyondaki DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı, 6'nci bant negatif kontrol olarak gebe olmayan dişi serumundan izole DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünlerini göstermektedir. 7'nci bant 100bp DNA ladder.



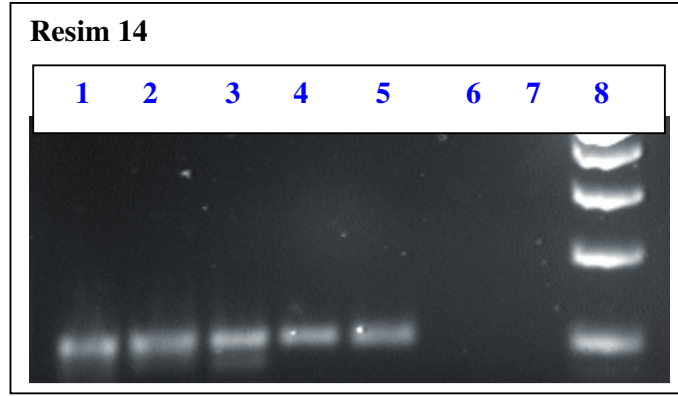
Resim 12 ve 13: Kalıp olarak serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı SRY dizisi için sırasıyla tam hacmin 50µl ve 25µl olduğu reaksiyonların amplifikasyon ürünleri. 1'nci bant stok DNA çözeltisinin kalıp olarak kullanıldığı, 2, 3, 4 ve 5'nci bantlar sırasıyla 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyondaki DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı, 6'nci bant negatif kontrol olarak gebe olmayan dişi serumundan izole DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünlerini göstermektedir. 7'nci bant 100bp DNA ladder.

4.7. İNSAN GAPDH DİZİSİNE ÖZGÜ KONVANSİYONEL PCR DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

4.7.1. En az belirleyebildiği DNA miktarının ölçülmesi

Sağlıklı bir bireyin kanından izole edilen DNA çözeltisindeki DNA miktarı spektrofotometre ile hesaplandıktan sonra 25ng/µl -2.5pg/µl arasındaki dilüe DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiliden alınan aynı miktardaki kalıba (1µl) tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde İnsan GAPDH dizisi için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda İnsan GAPDH dizisine özgü primerlerin en az 10pg DNA'yı belirleyebildiğini gözlemlendi. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 14'de gösterilmiştir.

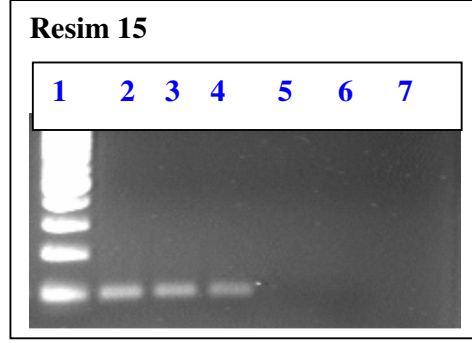


Resim 14: İnsan GAPDH dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1, 2, 3, 4, 5, 6'ncı bantlar sırasıyla 25ng, 2.5ng, 250pg, 25pg, 10pg ve 2.5pg DNA'nın kalıp olarak kullanılması sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri, 7'nci bant negatif kontrol (distile su), 8'nci bant 100bp DNA ladder.

4.7.2. Serumundan İzole Edilen DNA'nın İnsan GAPDH dizisine özgü PCR ile Belirlenmesi

Sağlıklı bir bireyin 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile elde edilen stok DNA çözeltisinden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiden alınan aynı miktardaki (20 μ l) kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde İnsan GAPDH dizisi için PCR kuruldu. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. Tam reaksiyon hacminin 50 μ l olduğu reaksiyonda, İnsan GAPDH dizisine özgü primerlerin hedef bölgelerini hangi dilüsyona kadar belirleyebildiklerine bakıldı.

Reaksiyon sonucunda İnsan GAPDH dizisine özgü primerlerin 1:100 dilüsyona kadar serumdan izole DNA'yı amplifiye ettiği gözlenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 15'de gösterilmiştir.

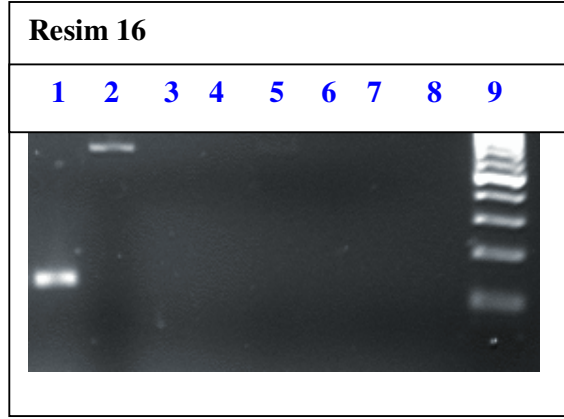


Resim 15: İnsan GAPDH dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1'nci bant 100bp DNA ladder, 2'nci bat stok DNA çözeltilisinin kalıp olarak kullanıldığı, 3, 4, 5, 6'ncı bantlar sırasıyla 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyondaki DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünleri, 7'nci bant negatif kontrol (distile su).

4.8. FARE GALT DİZİSİNE ÖZGÜ KONVANSİYONEL PCR DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

4.8.1. Fare GALT Dizisine özgü PCR reaksiyonunun insan DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının kontrolü

Fare GALT dizisine özgü PCR reaksiyonunun insan DNA'sını amplifiye edip etmediğini anlamak için sağlıklı bir bireyin kan ve serum örneklerinden izole DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR kuruldu. Amplifikasyon sonrasında serumdan izole insan DNA'sında amplifikasyon gözlenmezken, 25ng insan DNA'sının kullanıldığı reaksiyonda özgün banttan farklı bir bölgede bir bant gözlendi, 25ng'dan daha az miktarda kalıp kullanıldığında hiçbir bant gözlenmemiştir. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 16'de gösterilmiştir.

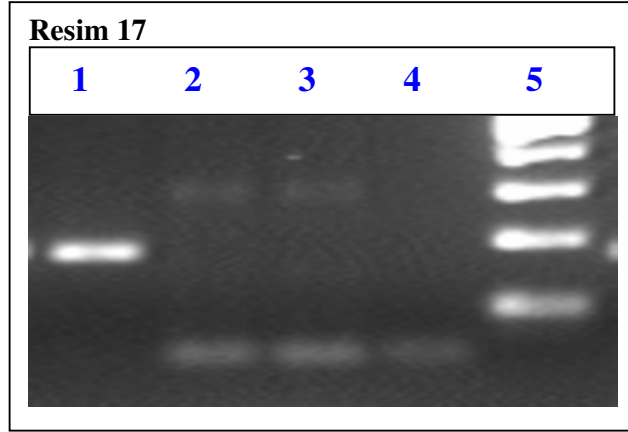


Resim 16: Fare GALT dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1'nci bant fare DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünleri. 2, 3 ve 4'ncü bantlar sırasıyla 25ng, 2,5ng ve 250pg insan DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünleri. 5, 6, 7'nci bantlar sırasıyla insan serumundan izole DNA'nın stok, 1:10 ve 1:100 dilüsyonunun kalıp olarak kullanıldığı PCR ürünleri. 8'nci bant negatif kontrol (distile su), 9'ncü bant 100bp DNA ladder.

4.8.2. DYS14 dizisine özgü Konvansiyonel PCR reaksiyonunun dişi fare DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının kontrolü

DYS14 dizisine özgü PCR reaksiyonunun dişi fare DNA'sında amplifikasyon yapıp yapmadığının anlamak için 25ng fare DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu kuruldu. Amplifikasyon sonunda DYS14 dizisine özgü primerlerin farede özgün bantları dışında bir bölgede zayıf bir bant verdiği gözlemlendi. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 17'de gösterilmiştir.

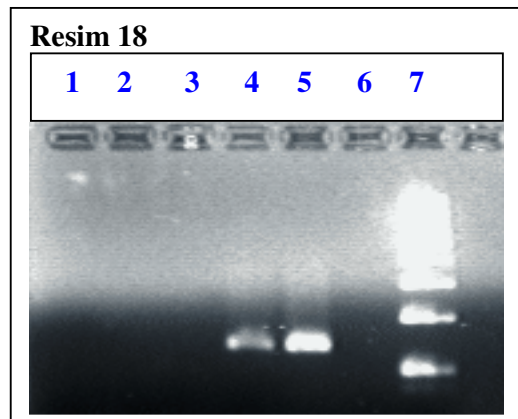
Kalıp olarak daha az dişi fare DNA'sı kullanıldığında amplifikasyon gözlenmemiştir. Bu deneye ilişkin jel görüntüsü gösterilmemiştir.



Resim 17: DYS14 dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1'nci bant 25ng erkek DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünü. 2 ve 3'ncü bantlar 25ng dişi fare DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon ürünleri. 4'ncü bant negatif kontrol (distile su), 5'nci bant 100bp DNA ladder.

4.8.3 DNA izolasyonuna başlamadan önce serum örneğine ne kadar dişi fare DNA'sı eklenmesi gerektiğinin ölçülmesi

Aynı sağlıklı erkeğe ait 5 tane 2ml'lik serum örneğine 3ng-200ng miktarlarında dişi fare DNA'sı eklendi. Kit ile DNA izolasyonu sonrasında fare GALT dizisi için tanımlanan reaksiyon karışımında ve termal profilinde PCR kuruldu. Reaksiyon sonucunda en az 100ng fare DNA'sının eklenmesi gerektiği gözlemlendi. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 18'de gösterilmiştir.



Resim 18: Fare GALT dizisi için amplifikasyon ürünleri. 1, 2, 3, 4 ve 5'nci kuyular sırasıyla 3ng, 10ng, 50ng, 100ng ve 200ng dişi fare DNA'sının eklendiği serum örneklerinden izole DNA solüsyonlarının kalıp olarak kullanılması sonucu elde edilen bantlar. 6. kuyu negatif kontrol (distile su). 7'nci kuyu 100bp DNA Ladder.

4.9. KONVANSİYONEL PCR İLE ANNE SERUMUNDAN FETAL CİNSİYETİN BELİRLENMESİ

4.9.1 DYS14 Dizisine özgü konvansiyonel PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi

Çalışmaya katılan toplam 40 gebe kadından 38'inin serum ısıtma yöntemi ile DNA çözeltileri hazırlandı. İki olgunun kan örnekleri kan alma merkezinden isimsiz gönderildiği için çalışmadan çıkarıldı. DNA çözeltileri hazırlanan tüm olgulara tam reaksiyon hacminin 50µl olduğu üç ayrı DYS14 konvansiyonel PCR reaksiyonu kuruldu. Otuz sekiz olgunun 26'sında erkek fetus bulunurken 12'sinde kız fetus bulunmuştur. Erkek fetus belirlenen 26 olgunun 17'sinde her üç PCR reaksiyonunda da DYS14 amplifikasyonu için pozitif sonuç elde edilirken 9 olgunun kurulan üç ayrı reaksiyonunun ikisinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Kız fetus belirlenen 12 olgunun her üç PCR reaksiyonunda da DYS14 amplifikasyonu için negatif sonuç elde edilirken bir olgunun kurulan üç ayrı reaksiyonunun ikisinde negatif sonuç elde edilmiştir. Kız fetus belirlenen 12 olgunun DNA çözeltilerinde DNA'nın varlığı insan GAPDH dizisine özgü PCR reaksiyonu kurularak gösterilmiştir. Kurulan tüm insan GAPDH PCR reaksiyonları pozitif sonuç vermiştir. Tüm olgulara ait sonuçlar Tablo 18'de gösterilmiştir.

Ticari kit ve serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı DYS14 duyarlılık deneylerinde aynı sonuçlar elde edildiği için olgulardan DNA elde edilmesi zaman ve maddi olarak daha tasarruflu olan serum ısıtma yöntemi ile yapılmıştır.

DYS14 dizisine özgü PCR reaksiyonu ile kız fetusa gebe olduğu belirlenen olguların DNA çözeltilerinde DNA'nın varlığı fare GALT PCR reaksiyonu yerine insan GAPDH dizisine özgü PCR reaksiyonu ile yapılmıştır. Serum ısıtma yöntemi ile DNA elde edilmeden önce seruma ne kadar dişi fare serumu eklenmesi gerektiği hesaplanmadığı için ve Costa ve arkadaşlarının deneylerindeki gibi seruma eklenen dişi fare DNA'sı miktarı 250pg yerine bizim deneylerimizde 100ng çıktığı için iç kontrol olarak dişi fare DNA'sı eklemekten vazgeçilmiştir. Onun yerine insan GAPDH dizisine özgü PCR reaksiyonu kullanılmıştır.

Tablo 18: Çalışmaya katılan gebe olguların DYS14 dizisi için konvansiyonel PCR sonuçları.

E: erkek, K: kız.

Olgu no	1.pcr	2.pcr	3.pcr	insanGAPDH	Sonuç
1	+	+	+		E
2	+	-	+		E
3	-	-	-	+	K
4	-	-	-	+	K
5	-	-	-	+	K
6	+	-	+		E
7	+	+	+		E
8	+	-	-	+	K
9					Çalışılmadı
10	+	+	+		E
11	+	+	+		E
12	-	-	-	+	K
13	+	+	+		E
14	+	+	+		E
15	+	+	+		E
16	+	+	+		E
17	+	+	+		E
18	+	+	+		E
19					Çalışılmadı
20	-	+	+		E
21	+	+	+		E
22	-	-	-	+	K
23	-	-	-	+	K
24	+	+	+		E
25	-	+	+		E
26	+	-	+		E
27	-	-	-	+	K
28	+	-	+		E
29	+	+	+		E
30	+	+	+		E
31	+	-	+		E
32	+	+	+		E
33	-	-	-	+	K
34	+	+	+		E
35	-	-	-	+	K
36	-	-	-	+	K
37	-	+	+		E
38	+	-	+		E
39	+	+	+		E
40	-	-	-	+	K

4.9.2 SRY Dizisine özgü konvansiyonel PCR ile Fetal Cinsiyetin Belirlenmesi

DYS14 dizisine özgü PCR reaksiyonu ile erkek fetusa sahip olduğu belirlenen 20 olgunun serum ısıtma yöntemi ile DNA çözeltileri hazırlandı. Tüm olgulara tam reaksiyon hacminin 50µl olduğu üç ayrı SRY konvansiyonel PCR reaksiyonu kuruldu. Kız fetusa sahip olduğu belirlenen olguların DNA çözeltilerinde DNA'nın varlığı insan GAPDH dizisine özgü PCR reaksiyonu ile belirlendi. Yirmi olgunun 10'unda erkek fetus bulunurken 10'unda kız fetus bulunmuştur. Erkek fetus belirlenen 10 olgunun 3'ünde her üç PCR reaksiyonunda da SRY amplifikasyonu için pozitif sonuç elde edilirken 7 olgunun kurulan üç ayrı reaksiyonunun ikisinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Kız fetus belirlenen 7 olgunun her üç PCR reaksiyonunda da SRY amplifikasyonu için negatif sonuç elde edilirken üç olgunun kurulan üç ayrı reaksiyonunun ikisinde negatif sonuç elde edilmiştir. Kız fetus belirlenen 10 olgunun DNA çözeltilerinde DNA'nın varlığı insan GAPDH dizisine özgü PCR reaksiyonu kurularak gösterilmiştir. Kurulan tüm insan GAPDH PCR reaksiyonları pozitif sonuç vermiştir. Tüm olgulara ait sonuçlar Tablo 19'da gösterilmiştir.

Ticari kit ve serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı SRY duyarlılık deneylerinde aynı sonuçlar elde edildiği için olgulardan DNA elde edilmesi zaman ve maddi olarak daha tasarruflu olan serum ısıtma yöntemi ile yapılmıştır.

DYS14 ve SRY dizilerine özgü PCR duyarlılık deneylerinde DHS14 dizisine özgü PCR reaksiyonunun daha duyarlı olduğu bulunduğu için SRY ile cinsiyet belirleme de tüm olgular yerine DHS14'ün erkek fetusu belirlediği 20 olgu SRY dizisi ile çalışılmıştır.

Tablo 19: DYS14 dizisine özgü PCR reaksiyonu sonucu erkek fetusa gebe olduğu belirlenen olguların SRY dizisi için amplifikasyon sonuçları.

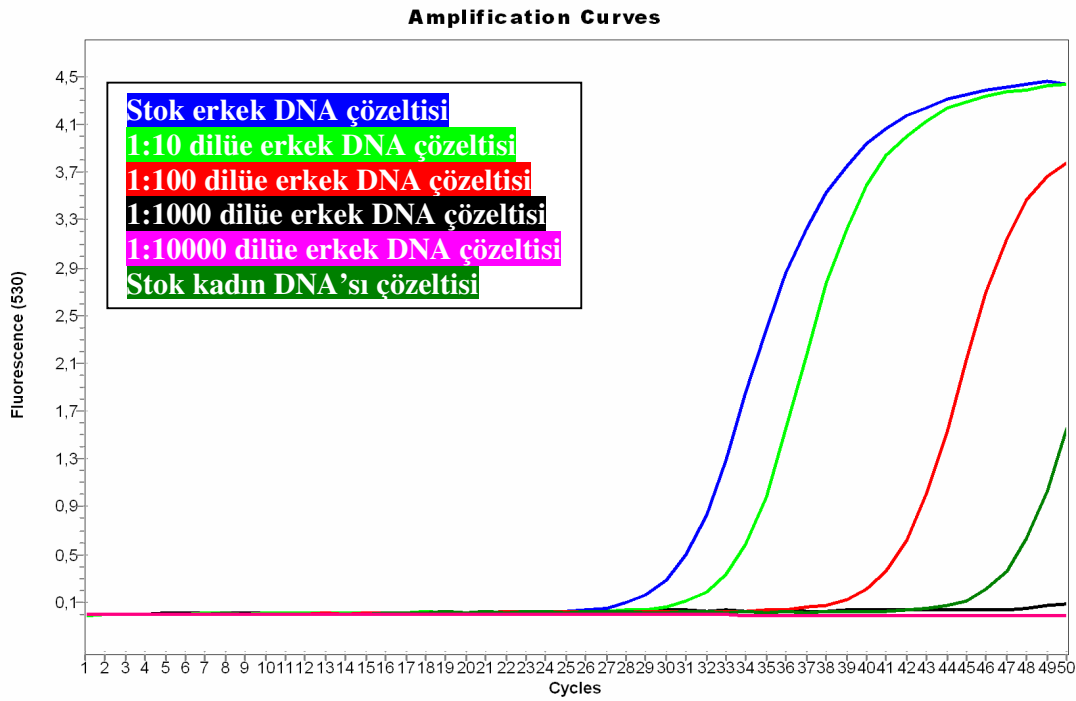
Olgu no	1.pcr	2.pcr	3.pcr	insanGAPDH	Sonuç
1	-	-	-	+	K
7	+	-	+		E
10	+	-	+		E
11	+	+	+		E
13	-	-	-	+	K
14	+	-	+		E
15	-	+	-	+	K
16	+	+	+		E
17	-	+	+		E
18	+	-	-	+	K
20	-	+	-	+	K
21	-	-	-	+	K
24	+	+	+		E
25	+	-	+		E
28	-	-	-	+	K
29	+	+	+		E
30	-	-	-	+	K
32	-	+	+		E
34	-	-	-	+	K
37	-	-	-	+	K

4.10. DYS14 DİZİSİNE ÖZGÜ GERÇEK ZAMANLI PCR DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

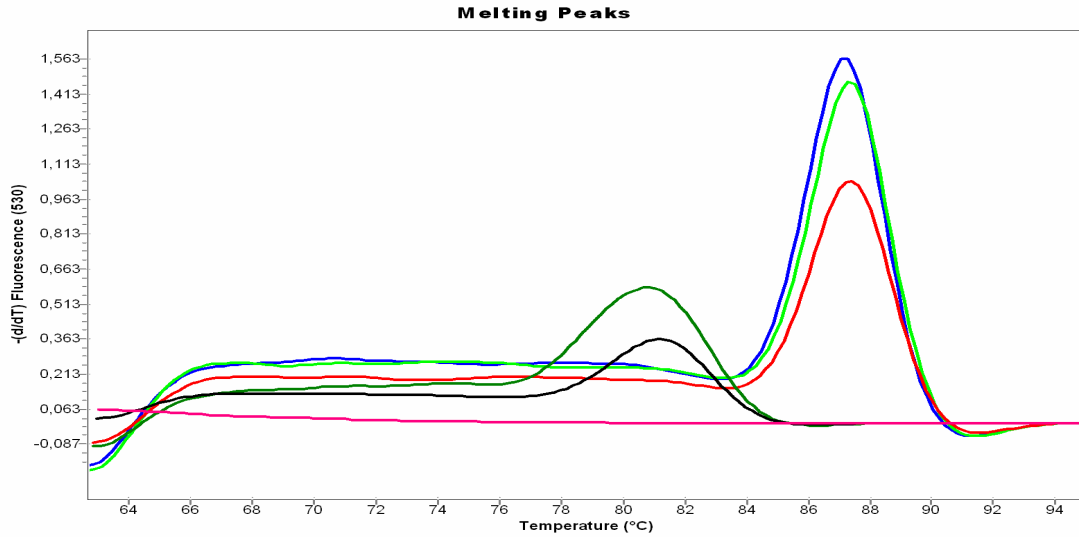
Sağlıklı bir erkeğin 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile izole edilen stok DNA çözeltisinden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiliden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde DYS14 için gerçek zamanlı PCR kuruldu. Tam reaksiyon hacminin 20µl olduğu reaksiyonda DYS14'e özgü primerlerin hedef

bölgelerini ticari kit ile izole edilen erkek serum DNA'sının hangi dilüsyonuna kadar belirleyebildiklerine bakıldı. Ayrıca sağlıklı gebe olmayan bir kadının 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile izole edilen stok DNA çözeltisinden alınan aynı miktardaki kalıba DYS14 dizisi için gerçek zamanlı PCR kuruldu.

Erkek serumundan elde edilen DNA'nın seri dilüsyonlarına DYS14 için kurulan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda konvansiyonel PCR'da olduğu gibi duyarlılık 1:100 bulunmuştur. Ayrıca kurulan reaksiyonda kadın serumundan izole DNA'nın da amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Yapılan erime ısısı analizi (Tm analizi) sonucunda kadın DNA'sındaki amplifikasyonun primerlerin özgün hedeflerinden farklı bir bölgede gerçekleştiği gözlenmiştir. Deneylere ilişkin grafik görüntüleri resim 19 ve 20'de gösterilmiştir.



Resim 19: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, amplifikasyon grafiği.

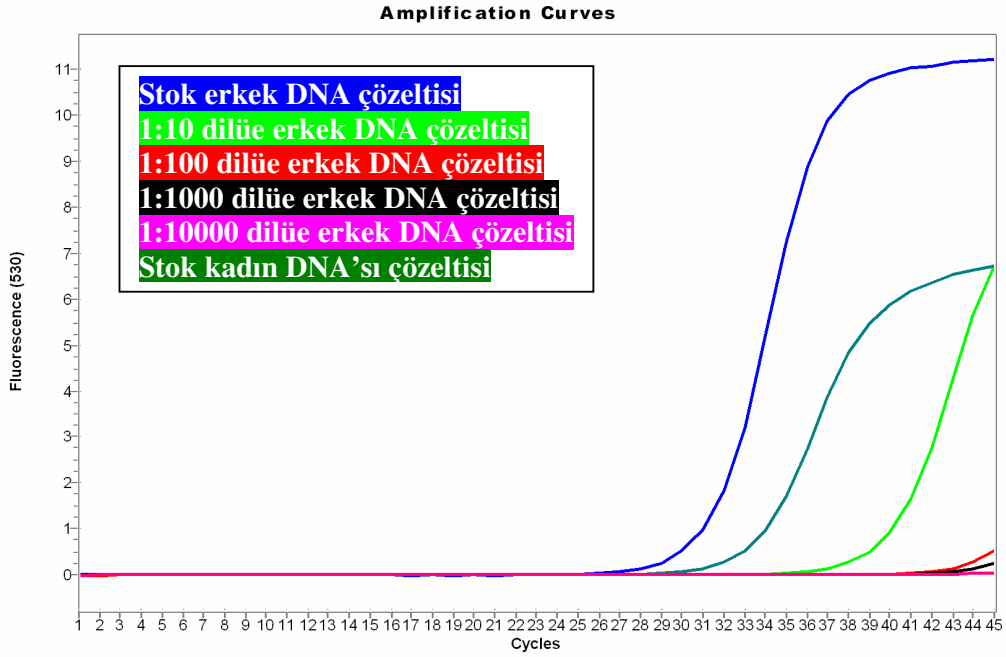


Resim 20: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, erime ısısı (T_m) grafiği.

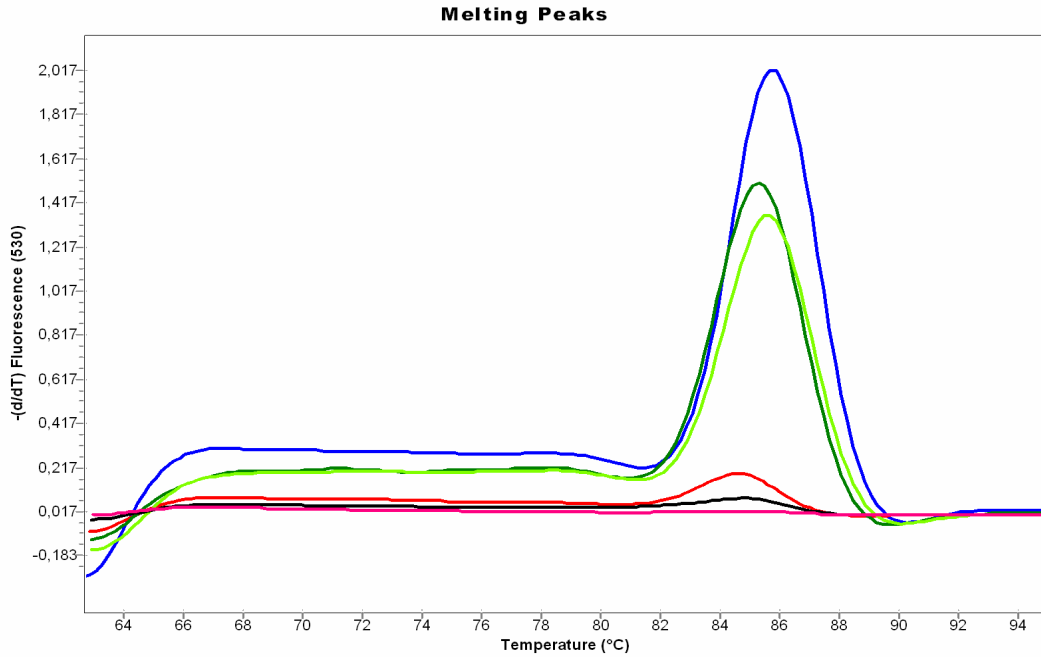
4.11. SRY DİZİSİNE ÖZGÜ GERÇEK ZAMANLI PCR DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

Sağlıklı bir erkeğin 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile izole edilen stok DNA çözeltisinden 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000 dilüsyonlarında DNA çözeltileri hazırlanarak her bir çözeltiliden alınan aynı miktardaki kalıba tanımlanan reaksiyon karışımlarında ve termal profillerinde SRY için gerçek zamanlı PCR kuruldu. Tam reaksiyon hacminin 20µl olduğu reaksiyonda SRY'ye özgü primerlerin hedef bölgelerini ticari kit ile izole edilen erkek serum DNA'sının hangi dilüsyonuna kadar belirleyebildiklerine bakıldı. Ayrıca sağlıklı gebe olmayan bir kadının 2ml serumundan NucleoSpin Blood L Genomik DNA İzolasyon kiti ile izole edilen stok DNA çözeltisinden alınan aynı miktardaki kalıba SRY dizisi için gerçek zamanlı PCR kuruldu.

Erkek serumundan elde edilen DNA'nın seri dilüsyonlarına SRY için kurulan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda konvansiyonel PCR'da olduğu gibi duyarlılık 1:10 bulunmuştur. Ayrıca kurulan reaksiyonda kadın serumundan izole DNA'nın da amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Yapılan erime ısısı analizi (T_m analizi) sonucunda kadın DNA'sındaki amplifikasyonun primerlerin özgün hedeflerine benzer bir bölgede pik verdiği gözlemlendi. Deneylere ilişkin grafik görüntüleri resim 21 ve 22'de gösterilmiştir.



Resim 21: SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, amplifikasyon grafiği.

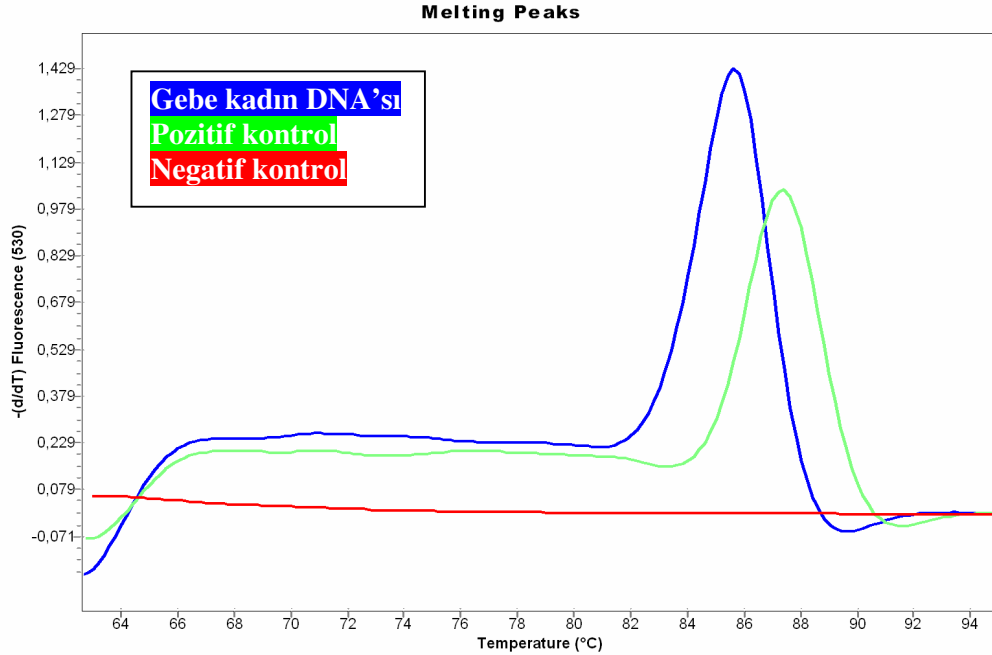


Resim 22: SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyi, erime ısısı (T_m) grafiği.

4.12. DYS14 DİZİSİNE ÖZGÜ GERÇEK ZAMANLI PCR İLE FETAL CİNSİYETİN BELİRLENMESİ

Gebe kadın serumundan ticari kit ile izole edilen DNA çözeltisi kalıp olarak kullanılarak DYS14 dizisine özgü gerçek zamanlı PCR kuruldu. Reaksiyonla eş zamanlı pozitif kontrol olarak erkek serumundan izole DNA çözeltisine ve negatif kontrol olarak PCR grade dH₂O'ya gerçek zamanlı PCR kuruldu. Amplifikasyon sonucu yapılan erime ısısı analizi ile gebe kadından izole DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR'ın özgün erime ısısı derecesinden farklı bir yerde pik verdiğini gözlemledik. Kurulan PCR'lar agaroz jel elektroforezinde görüntülendiğinde gebe kadından izole DNA'nın amplifikasyonun da çok sayıda non-spesifik bantların olduğu gözlenmiştir. Deneye ilişkin erime ısısı grafiği resim 23'de gösterilmiştir.

Non-spesifik bantlara bağlı olarak erime ısısı derecesinin pozitif kontrolden farklı bölgede pik vermesinden dolayı yeni optimizasyonun yapılması gerekmektedir. Deneyin optimizasyonu yapıldıktan sonra olgulardan DYS14 dizisi için gerçek zamanlı PCR ile fetal cinsiyet tayini yapılacaktır.



Resim 23: DYS14 dizisinin gerçek zamanlı PCR reaksiyonu ile fetal cinsiyetin belirlenmesi deneyi, erime ısısı (T_m) analizi.

4.13. SRY DİZİSİNE ÖZGÜ GERÇEK ZAMANLI PCR İLE FETAL CİNSİYETİN BELİRLENMESİ

SRY dizisinin gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyinde gebe olmayan kadın serumundan izole edilen DNA'nın amplifikasyonunun erkek serumundan izole DNA amplifikasyonu ile yakın değerlerde erime ısı (Tm) derecesi verdiği için grafiğe bağlı cinsiyet analizi yapılamamaktadır. Deneyin sağlıklı olabilmesi için SRY dizisindeki amplifiye olan bölgeye özgün prob izayn etmek gerekmektedir. Bu sebeplerden ötürü SRY dizisinin gerçek zamanlı amplifikasyonu ile anne serumundan fetal cinsiyet analizi yapılmamıştır.

4.14 KLİNİK VERİLERLE OLGULARIN PCR SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

DYS14 dizisine özgü PCR ile fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik deneylerde çalışmaya alınan toplam 40 olgudan 38'inin analizi yapılmıştır. PCR analizi sonucu 38 olgudan 26'sında DYS14 amplifikasyonu için pozitif sonuç elde edilirken 12'sinde negatif sonuç elde edilmiştir. Pozitif sonuçların erkek fetüs için marker olduğu kabul edilirken, negatif sonuçların dişi fetüs için marker oldukları kabul edilmiştir.

Bulgularımızın fetüsün cinsiyetini belirlemedeki doğruluğunu ölçmek için çalışmaya alınan olguların amniyosentez ya da ultrason ile belirlenen cinsiyetleri ile karşılaştırılmıştır. Otuz sekiz olgunun 25'inin cinsiyetine ilişkin bilgilere ulaşılabilirken 13 olgunun bilgilerine ulaşılammıştır. Yirmi beş olgunun gebelik yaşı 24 hafta ile 11 hafta + 3 gün arasında dağılım göstermekte olup ortalama 17.13 haftadır. Bu bulgular doğrultusunda toplam 25 olgunun 17'sinde erkek fetüsün varlığı ve 3'ünde dişi fetüsün varlığı doğru olarak gösterilmiştir; elde ettiğimiz sonuçlar testin %80 (20/25) doğrulukla fetüsün cinsiyetini belirlediğini göstermiştir. Kontrol yöntemleriyle erkek olduğu belirlenen 20 olgunun 17'si PCR ile gösterilebilmiştir ve 3 olguda amplifikasyon gözlenmemiştir; testin duyarlılığı %15 (3/20) yalancı negatif oranla birlikte %85 (17/20) olarak belirlenmiştir. Kontrol yöntemleriyle kız olduğu belirlenen 5 olgunun 3'ü PCR ile doğru olarak belirlenirken 2'si erkek olarak belirlenmiştir; testin özgüllüğü %40 (2/5) yalancı pozitif sonuçla birlikte %60 (3/5) olarak belirlenmiştir (Tablo 20 ve 21). Ancak kız fetüse sahip olan bu iki olgunun daha önceden erkek çocuk öyküleri olduğu için yalancı pozitif sonuçların gerçek yalancı pozitif sonuç olup olmadığı gösterilememiştir. Ayrıca fetüsün cinsiyetinin doğru olarak belirlendiği en erken gebelik yaşı 11 hafta + 4 gün olarak bulunmuştur.

Tablo 20: Çalışmaya dahil edilen olguların klinik verileriyle DYS14 konvansiyonel PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Olgu no	Gebelik Yaşı	Önceki Gebelikten Çocuk	Klinik Veriler		PCR Sonuçları
			Cinsiyeti Belirleyen Yöntem	Fetüsün Cinsiyeti	
1	24hafta	1995 kız	Ultrason	Erkek	E
2	19hafta	2004 kız	Ultrason	Erkek	E
3	17hafta	1994 erkek, 1999 kız	?	?	K
4	?	?	?	?	K
5	21hafta+5gün	?	?	?	K
6	17hafta+2gün	1990 kız, 1992 erkek	amniyosentez	Erkek	E
7	22 hafta	Yok	Ultrason	Erkek	E
8	15hafta+4gün	1997 erkek	amniyosentez	Kız	K
10	16hafta+2gün	Yok	?	?	E
11	16hafta+1gün	Yok	Ultrason	Erkek	E
12	?	?	?	?	K
13	14hafta	2003 erkek, 2004 7'nci hafta kürtaj	?	?	E
14	13hafta+4gün	1995 kız, 1998 abortus, 2000 kız, 2004 kız	Ultrason	Erkek	E
15	15hafta+5gün	2002 erkek	amniyosentez	Erkek	E
16	16hafta+1gün	2001 kız	Ultrason	Erkek	E
17	12hafta+1gün	2000 kız	Ultrason	Erkek	E
18	?	?	?	?	E
20	16hafta+6gün	?	amniyosentez	Erkek	E
21	20hafta	Yok	Ultrason	Erkek	E
22	?	?	?	?	K
23	?	?	?	?	K
24	?	?	?	?	E
25	16hafta+4gün	1995 kız, 1999 kız	?	?	E
26	?	?	?	?	E
27	11hafta+3gün	Yok	amniyosentez	Erkek	K
28	24hafta	Yok	Ultrason	Erkek	E
29	24hafta	Yok	Ultrason	Erkek	E
30	16hafta+3gün	1999 kız, 2002 erkek	Ultrason	Kız	E
31	16hafta+6gün	1993 erkek, 2001 kız	?	?	E
32	11hafta+4gün	Yok	amniyosentez	Erkek	E
33	21hafta	95 kız	Ultrason	Erkek	K
34	15hafta+3gün	91 erkek, 98 erkek	amniyosentez	Erkek	E
35	17hafta	2001 kız	amniyosentez	Kız	K
36	20hafta	2005 kız	ultrason	Kız	K
37	20hafta	Yok	ultrason	Erkek	E
38	24hafta	1997 abortus, 1997 kürtaj, 1998 abortus, 2000 erkek	Ultrason	Kız	E
39	12hafta+4gün	1996 kız	amniyosentez	Erkek	E
40	18 hafta	Yok	Ultrason	Erkek	K

Tablo 21: DYS14 PCR analizi ile fetal cinsiyeti belirleme istatistiksel oranları

	Olgu (n)	PCR Sonuçları			%
		Pozitif (n)	Pozitif (%)	Negatif (n)	
Erkek	20	17	85	3	15
Kız	5	2	40	3	60
Doğruluk	25	17		3	80
Duyarlılık	20	17			85
Özgüllük	5			3	60

Maternal serumdan elde edilen DNA'dan SRY dizisine özgü PCR ile fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik deneylerde çalışmaya alınan toplam 40 olgudan 20'sinin analizi yapılmıştır. Yirmi olgunun 15'inin cinsiyetine ilişkin bilgilere ulaşılabılırken 5 olgunun bilgilerine ulaşılamamıştır. On beş olgunun gebelik yaşı 24 hafta ile 11 hafta + 4 gün arasında dağılım göstermekte olup ortalama 17.86 haftadır. On beş olgunun PCR amplifikasyon sonuçlarına göre 7 olgunun pozitif sonuç 8 olgunun negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Kontrol yöntemleriyle bu olguların 14'ünün erkek fetüse 1'inin dişi fetüse gebe olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar testin %53.3 (8/15) doğrulukla fetüsün cinsiyetini belirlediğini göstermiştir. Kontrol yöntemleriyle erkek olduğu belirlenen 14 olgunun 7'si PCR ile gösterilebilmiştir ve 7 olguda amplifikasyon gözlenmemiştir. Testin duyarlılığı %50 (7/14) yalancı negatif oranla birlikte % 50 (7/14) olarak belirlenmiştir. Kontrol yöntemleriyle kız olduğu belirlenen 1 olgunun PCR ile amplifikasyonu gözlenmemiştir (Tablo 22 ve 23). Ayrıca fetüsün cinsiyetinin doğru olarak belirlendiği en erken gebelik yaşı 11 hafta + 4 gün olarak bulunmuştur.

Tablo 22: Çalışmaya dahil edilen olguların klinik verileriyle SRY konvansiyonel PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Olgu no	Gebelik Yaşı	Önceki Gebelikten Çocuk	Klinik Veriler		PCR Sonuçları
			Cinsiyeti Belirleyen Yöntem	Fetüsün Cinsiyeti	
1	24hafta	1995 kız	Ultrason	Erkek	K
2	19hafta	2004 kız	Ultrason	Erkek	
3	17hafta	1994 erkek, 1999 kız	?	?	
4	?	?	?	?	
5	21hafta+5gün	?	?	?	
6	17hafta+2gün	1990 kız, 1992 erkek	amniyosentez	Erkek	
7	22 hafta	Yok	Ultrason	Erkek	E
8	15hafta+4gün	1997 erkek	amniyosentez	Kız	
10	16hafta+2gün	Yok	?	?	E
11	16hafta+1gün	Yok	Ultrason	Erkek	E
12	?	?	?	?	
13	14hafta	2003 erkek, 2004 7'nci hafta kürtaj	?	?	K
14	13hafta+4gün	1995 kız, 1998 abortus, 2000 kız, 2004 kız	Ultrason	Erkek	E
15	15hafta+5gün	2002 erkek	amniyosentez	Erkek	K
16	16hafta+1gün	2001 kız	Ultrason	Erkek	E
17	12hafta+1gün	2000 kız	Ultrason	Erkek	E
18	?	?	?	?	K
20	16hafta+6gün	?	amniyosentez	Erkek	K
21	20hafta	Yok	Ultrason	Erkek	K
22	?	?	?	?	
23	?	?	?	?	
24	?	?	?	?	E
25	16hafta+4gün	1995 kız, 1999 kız	?	?	E
26	?	?	?	?	
27	11hafta+3gün	Yok	amniyosentez	Erkek	
28	24hafta	Yok	Ultrason	Erkek	K
29	24hafta	Yok	Ultrason	Erkek	E
30	16hafta+3gün	1999 kız, 2002 erkek	Ultrason	Kız	K
31	16hafta+6gün	1993 erkek, 2001 kız	?	?	
32	11hafta+4gün	Yok	amniyosentez	Erkek	E
33	21hafta	95 kız	Ultrason	Erkek	
34	15hafta+3gün	91 erkek, 98 erkek	amniyosentez	Erkek	K
35	17hafta	2001 kız	amniyosentez	Kız	
36	20hafta	2005 kız	ultrason	Kız	
37	20hafta	Yok	ultrason	Erkek	K
38	24hafta	1997 abortus, 1997 kürtaj, 1998 abortus, 2000 erkek	Ultrason	Kız	
39	12hafta+4gün	1996 kız	amniyosentez	Erkek	
40	18 hafta	Yok	Ultrason	Erkek	

Tablo 23: SRY PCR analizi ile fetal cinsiyeti belirleme istatistiksel oranları.

	Olgu (n)	PCR Sonuçları				%
		Pozitif (n)	Pozitif (%)	Negatif (n)	Negatif (%)	
Erkek	14	7	50	7	50	
Kız	1	0	0	1	100	
Doğruluk	15	7		1		53.3
Duyarlılık	14	7				50
Özgüllük	1			1		100

5. TARTISMA

Bu proje kapsamında gebe kadınların periferik kanındaki fetüse ait genetik materyalin varlığının PCR analizi ile gösterilebilirliğine bakılmıştır. Bu yüzden gebe kadınların periferik kanından ayrıştırılan serum örneklerinden izole edilen total DNA içinde fetal DNA'nın varlığı Y kromozomu üzerinde bulunan DYS14 ve SRY dizilerini hedefleyen primerlerin konvansiyonel ve gerçek zamanlı PCR analizi ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

Serum örneklerinden elde edilen DNA'nın saflık ve miktarını belirlemeye yönelik kullanılan yöntemlerden geleneksel spektrofotometrik analizlerin ve agaroz jel elektroforezinin kullanışsız oldukları bulunmuştur. İzole edilen DNA'nın varlığını göstermek için otozomal bir lokus olan insan GAPDH genine özgü dizinin konvansiyonel PCR ile amplifikasyonunun güvenilir bir analiz olduğu gösterilmiştir.

Y kromozomu üzerinde bulunan DYS14 dizisi için kurulan konvansiyonel PCR reaksiyonunun duyarlılığını belirlemeye yönelik deneylerde, en az 2.5pg erkek DNA'sını belirleyebildiğini, gebe olmayan kadın DNA'sının kalıp olarak kullanılması durumunda 250pg'a kadar primerlerin hedef dizisinden farklı bant verdiği, 250pg'dan daha az DNA'nın kalıp olarak kullanılması durumunda amplifikasyon vermediğini gözlemledik. Erkek serumundan izole edilen DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı deneylerde her iki izolasyon tekniğinin de duyarlılığı aynı bulunurken reaksiyon hacminin iki katına çıkarılması sonucunda duyarlılığın arttığı bulunmuştur. Bizim bulduğumuz 1:1000 dilüsyondaki duyarlılık değeri önceki çalışmalarla uyumludur (82,84). Ayrıca kadın serumundan izole edilen DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı deneylerde amplifikasyon gözlenmemiştir.

Y kromozomu üzerinde bulunan SRY dizisi için kurulan konvansiyonel PCR reaksiyonunun duyarlılığını belirlemeye yönelik deneylerde, en az 10pg erkek DNA'sını belirleyebildiğini, gebe olmayan kadın olgulardan alınan DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyonda özgün bantlarla uyuşmayan farklı bir bölgenin amplifiye olduğunu gözlemledik. Erkek serumundan izole edilen DNA çözeltilerinin kalıp olarak kullanıldığı deneylerde her iki izolasyon tekniğinin de duyarlılığı aynı bulunurken reaksiyon hacminin iki katına çıkarılması sonucunda duyarlılığın değişmediği bulunmuştur. Ayrıca kadın serumundan izole edilen DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı deneylerde amplifikasyon

gözlenmemiştir. Costa ve arkadaşlarının SRY dizisine özgü gerçek zamanlı PCR duyarlılık deneyleri de 10pg erkek DNA'sına duyarlı olup biz çalışmamızda aynı duyarlılığa konvansiyonel PCR ile ulaşmış olduk (7). Bu bulgular DYS14 dizisine özgü konvansiyonel PCR reaksiyonunun SRY'ninkinden daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

İnsan GAPDH dizisine özgü primerlerin konvansiyonel PCR reaksiyonunda en az 10pg erkek DNA'sını belirleyebildiğini, serumdan elde edilen DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı deneyde 1:100 dilüsyona kadar amplifikasyon yaptığını gözlemledik. Bu bulgular bize fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik PCR analizlerinde serumdan izole edilen DNA'nın verimliliğini göstermek için İnsan GAPDH dizisine özgü PCR analizinin kullanışlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Fare GALT dizisine özgü konvansiyonel PCR reaksiyonunda serumdan izole insan DNA'sında amplifikasyon gözlenmezken, 25ng insan DNA'sının kullanıldığı reaksiyonda özgün banttı farklı bir bölgede bir bant gözlendi, 25ng'dan daha az miktarda kalıp kullanıldığında hiçbir bant gözlenmemiştir. DYS14 dizisine özgü konvansiyonel PCR reaksiyonunda 25ng dişi fare DNA'sının kalıp olarak kullanılması durumunda DYS14 dizisine özgü primerlerin farede özgün bantları dışında bir bölgede zayıf bir bant verdiği gözlenmiştir. Ayrıca DNA izolasyonunun verimliliğini fare GALT dizisine özgü PCR reaksiyonu ile göstermek için DNA izolasyonuna başlamadan önce 2ml serum örneğine en az 100ng fare DNA'sının eklenmesi gerektiği gözlemlendik. Bulgularımız Costa ve arkadaşlarının fare GALT dizisine özgü gerçek zamanlı PCR deneylerindeki duyarlılığa ulaşmamıştır (7). Bu çalışmada 400µl seruma 250pg fare DNA'sı eklenerek DNA izolasyonunun verimliliğini gösterilmektedir. Duyarlılıkdaki farkın başlıca kullanılan DNA izolasyon kitine, gerçek zamanlı PCR'ın daha duyarlı bir yöntem oluşuna ve hedef bölgeyi belirlemek için prob kullanmalarına bağlı olduğunu düşünüyoruz. Elde ettiğimiz bulgular serumdan izole DNA'nın verimliliğini göstermek için İnsan GAPDH dizisine özgü konvansiyonel PCR analizinin fare GALT'ın konvansiyonel PCR analizine göre duyarlılık, zaman ve maliyet bakımından daha kullanışlı olduğunu göstermektedir.

Maternal serumdan elde edilen DNA'dan DYS14 dizisine özgü PCR ile fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik deneylerde çalışmaya alınan toplam 40 olgudan 38'inin analizi yapılmıştır. İki olgunun kan alma merkezinden örnekleri isimsiz geldiği için analizleri yapılmamıştır. PCR analizi sonucu 38 olgudan 26'sında DYS14 amplifikasyonu için pozitif

sonuç elde edilirken 12'sinde negatif sonuç elde edilmiştir. Pozitif sonuçların erkek fetüs için marker olduğu kabul edilirken, negatif sonuçların dişi fetüs için marker oldukları kabul edilmiştir. Negatif sonuçlarda DNA izolasyonunun verimliliğini göstermek için insan GAPDH dizisine özgü konvansiyonel PCR analizi yapılmıştır ve 12 olgunun tümü için pozitif sonuç elde edilmiştir.

Bulgularımızın fetüsün cinsiyetini belirlemedeki doğruluğunu ölçmek için çalışmaya alınan olguların amniyosentez ya da ultrason ile belirlenen cinsiyetleri ile karşılaştırılmıştır. Otuz sekiz olgunun 25'inin cinsiyetine ilişkin bilgilere ulaşılabilirken 13 olgunun bilgilerine ulaşamamıştır. Yirmi beş olgunun gebelik yaşı 24 hafta ile 11 hafta + 3 gün arasında dağılım göstermekte olup ortalama 17.13 haftadır. Bu bulgular doğrultusunda toplam 25 olgunun 17'sinde erkek fetüsün varlığı ve 3'ünde dişi fetüsün varlığı doğru olarak gösterilmiştir; PCR ile erkek olarak belirlenen 2 olgunun kontrol yöntemleriyle dişi fetüs olduğu, yine PCR ile dişi olduğu belirlenen 3 olgunun kontrol yöntemleriyle erkek olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar testin %80 (20/25) doğrulukla fetüsün cinsiyetini belirlediğini göstermiştir. Kontrol yöntemleriyle erkek olduğu belirlenen 20 olgunun 17'si PCR ile gösterilebilmiştir ve 3 olguda amplifikasyon gözlenmemiştir. Testin duyarlılığı %15 (3/20) yalancı negatif oranla birlikte %85 (17/20) olarak belirlenmiştir. Kontrol yöntemleriyle kız olduğu belirlenen 5 olgunun 3'ü PCR ile doğru olarak belirlenirken 2'si erkek olarak belirlenmiştir. Testin özgünlüğü %40 (2/5) yalancı pozitif sonuçla birlikte %60 (3/5) olarak belirlenmiştir. Ancak kız fetüse sahip olan bu iki olgunun daha önceden erkek çocuk öyküleri olduğu için, yalancı pozitif sonuçların gerçek yalancı pozitif sonuç olup olmadığı gösterilememiştir. Ayrıca fetüsün cinsiyetinin doğru olarak belirlendiği en erken gebelik yaşı 11 hafta + 4 gün olarak bulunmuştur.

Maternal periferik kandan fetüsün cinsiyetini belirlemeye çalışan araştırmacılardan bir kısmı %100 duyarlılıkta fetal cinsiyeti belirlerken bazıları uyguladıkları yöntem ve kullandıkları örnek tipine bağlı olarak daha düşük duyarlılıklarda fetal cinsiyeti belirlemişlerdir. Tablo 2'de araştırma gruplarının elde ettikleri duyarlılıklar gösterilmiştir. Duyarlılığı etkileyen başlıca faktörlerin seçilen örnek tipi (kan, plazma ya da serum), kullanılan DNA izolasyon yöntemi, uygulanan PCR yöntemi tipi (konvansiyonel ya da gerçek zamanlı), amplifikasyonda kullanılan enzim tipi, seçilen Y kromozomuna özgü primerler, laboratuvar koşulları, deneyimli personel ve gebelik haftasının olduğu konusunda fikir birliği vardır (13). Çalışmamız da %100 duyarlılığa ulaşamamızın nedenlerinin başlıca seçmiş

olduğumuz DNA izolasyon yöntemi ve amplifikasyon için kullandığımız enzim seçimi olduğunu düşünüyoruz. Serum ısıtma yöntemi ile elde edilen DNA'nın kullanıldığı daha önceki çalışmalar da %100 duyarlılığa ulaşmazken bizim sonuçlarımızla benzer sonuçlar elde etmişlerdir (33,84). Ayrıca gerçek zamanlı PCR'ın kullanıldığı yöntemler de gözle görülür bir üstünlük vardır (7,11,54,85). Gerçek zamanlı PCR'ın kullanıldığı tüm çalışmalarda hedef bölgelerin belirlenmesin de prob kullanılmasına bağlı olarak duyarlılığın artmış olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamız da ilginç olarak kontrol yöntemleriyle kız fetüse gebe olduğu belirlenen iki olguda DYS14 dizisine özgü konvansiyonel PCR analizi ile birinde kurulan üç ayrı PCR reaksiyonunda da pozitif sonuç elde edilirken diğerinde üç reaksiyonun ikisinde pozitif sonuç elde ettik. Reaksiyonlar sırasında negatif kontrollerde amplifikasyon gözlenmemiştir. Bu iki olgunun önceki gebelik öykülerine bakıldığında bir olgunun 2002 yılında erkek bir çocuk diğerinin de 2000 yılında erkek bir çocuğa sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 2000 yılında erkek çocuğa sahip olan annenin 1997 ve 1998 yıllarında düşük yaptığı, yine 1997 yılında kürtaj yaptırdığı belirlenmiştir. Literatür ışığında önceki gebeliklere ait fetal hücrelerin on yıllarca annenin vücudunda yaşamına devam ettikleri ve bu kimerik durumun oluşması için birkaç aylık gebeliğin yeterli olduğu bilinmektedir (41,42). Oysaki yapılan diğer çalışmalar fetal DNA'nın doğumdan kısa bir süre sonra annenin dolaşımından temizlendiğini göstermektedir (50). Elde ettiğimiz pozitif sonuçlar maternal sirkülasyondaki önceki gebeliklere ait fetal hücrelerin DNA'larından kaynaklanabileceği gibi DNA izolasyonu sırasında oluşabilecek çapraz kontaminasyondan da oluşabileceğini öngörmekteyiz. Ancak çapraz kontaminasyonun oluşması için yüksek miktarda DNA'nın bulaş yapması gerektiğinden bu olasılık daha zayıf kalmaktadır. Önceki gebeliklere ait fetal DNA'ya bağlı pozitif sonuç elde edilmiş olabileceği ihtimalinin planlanacak bir çalışma ile gösterilmesi gerekmektedir.

Maternal serumdan elde edilen DNA'dan SRY dizisine özgü PCR ile fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik deneylerde çalışmaya alınan toplam 40 olgudan 20'sinin analizi yapılmıştır. PCR duyarlılıkları arasındaki farkı göstermek için DYS14 dizisine özgü PCR amplifikasyonunda pozitif sonuç veren 20 olgu çalışmaya dahil edilirken kontrol yöntemleriyle bu olgulardan sadece 15'inin bilgilerine ulaşılmıştır. On beş olgunun gebelik yaşı 24 hafta ile 11 hafta + 4 gün arasında dağılım göstermekte olup ortalama 17.86 haftadır. On beş olgunun PCR amplifikasyon sonuçlarına göre 7 olgunun pozitif sonuç 8 olgunun

negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Kontrol yöntemleriyle bu olguların 14'ünün erkek fetüse 1'inin dişi fetüse gebe olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar testin %53.3 (8/15) doğrulukla fetüsün cinsiyetini belirlediğini göstermiştir. Kontrol yöntemleriyle erkek olduğu belirlenen 14 olgunun 7'si PCR ile gösterilebilmiştir ve 7 olguda amplifikasyon gözlenmemiştir. Testin duyarlılığı %50 (7/14) yalancı negatif oranla birlikte % 50 (7/14) olarak belirlenmiştir. Kontrol yöntemleriyle kız olduğu belirlenen 1 olgunun PCR ile amplifikasyonu gözlenmemiştir. Ayrıca fetüsün cinsiyetinin doğru olarak belirlendiği en erken gebelik yaşı 11 hafta + 4 gün olarak bulunmuştur.

Costa ve arkadaşları SRY dizisine özđü gerçek zamanlı PCR analizi ile maternal serumdan fetal cinsiyeti %100 duyarlılıkta belirlemiştirlerdir (7,54). Bizim deneylerimizde duyarlılığın düşük olmasının başlıca sebebinin konvansiyonel PCR yöntemi olduğunu, kullanılan DNA izolasyon kitinin de etkili olduğunu düşünüyöruz. Ayrıca gerçek zamanlı PCR analizinde prob kullanılmasının arka plan amplifikasyon (non-spesifik bantlar) ürünlerini göstermediğinden duyarlılığı artırdığını düşünüyöruz. Deneylerimiz SRY dizisini hedefleyen primerlerin dişi DNA'sında da amplifikasyon yaptığını gösterdiğinden tahminimizin haklı olabileceğini göstermektedir.

DYS14 dizisi için kurulan gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun duyarlılığını belirlemeye yönelik deneylerde, erkek serumundan elde edilen DNA'nın seri dilüsyonlarına DYS14 için kurulan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda konvansiyonel PCR'da olduğu gibi duyarlılık 1:100 bulunmuştur. Ayrıca kurulan reaksiyonda kadın serumundan izole DNA'nın da amplifikasyonu gerçekteşmiştir. Yapılan erime ısısı analizi (Tm analizi) sonucunda kadın DNA'sındaki amplifikasyonun primerlerin özđün hedeflerinden farklı bir bölgede gerçekteştiği gözlenmiştir. Maternal serumdan elde edilen DNA'dan DYS14 dizisine özđü gerçek zamanlı PCR ile fetüsün cinsiyetini belirlemeye yönelik deneylerde amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsünde non-spesifik bantların varlığı nedeniyle yöntemin optimizasyonunun gerekliliği doğmuştur. Bu yüzden olguların cinsiyetini belirlemeye yönelik deneyler optimizasyon aşamasından sonraya bırakılmıştır.

SRY dizisi için kurulan gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun duyarlılığını belirlemeye yönelik deneylerde, erkek serumundan elde edilen DNA'nın seri dilüsyonlarına SRY için kurulan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda konvansiyonel PCR'da olduğu gibi duyarlılık 1:10 bulunmuştur. Ayrıca kurulan reaksiyonda kadın serumundan izole DNA'nın da

amplifikasyonu gerekleŒmiŒtir. Yapılan erime ısısı analizi (T_m analizi) sonucunda kadın DNA'sındaki amplifikasyonun primerlerin özgün hedeflerine benzer bir bölgede pik verdiği gözlemlendi. Yakın değerlerde erime ısısı (T_m) derecelerine bağlı olarak grafiğe bağlı cinsiyet analizi yapılamayacağından deneyin sağlıklı olabilmesi için SRY dizisindeki amplifiye olan bölgeye özgün prob dizayn etmek gerekmektedir. Bu sebeplerden ötürü SRY dizisinin gerçek zamanlı amplifikasyonu ile anne serumundan fetal cinsiyet analizi yapılmamıŒtır.

Œimdiye kadar alıŒılan tüm olgulardan sadece 25'inin gebeliğine iliŒkin bilgilere ulaŒılmıŒtır. Tüm sonuçlar elde edilince istatistiksel tablonun deđiŒeceđini düşünmekteyiz. Ayrıca bazı bulgular ultrason ile elde edilmiŒtir; bu yüzden doğum sonrasında bu olguların cinsiyetlerine iliŒkin bilgiler alınıp istatistiksel tablo tekrar oluŒturulacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada DYS14 ve SRY dizilerine özgü primerler kullanılarak PCR analizi ile maternal sirkülasyondaki fetal DNA'nın varlığı araştırıldı ve elde edilen veriler olguların amniyosentez ve ultrason bulgularıyla karşılaştırılmıştır. DYS14 dizisine özgü konvansiyonel PCR analizi ile %80 doğrulukta fetal cinsiyet belirlenirken bu oran SRY için %53.3 doğrulukta bulunmuştur. Bulgularımız literatürle uyumlu olup duyarlılığın daha da yükseltmesi için ileri deneylerin planlanması gerektiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca DYS14 PCR analizinde kız fetüse gebe 2 olguda pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu iki olgunun gebelik öykülerine bakıldığında daha önceden erkek çocuğa sahip olmalarından dolayı pozitif sonuçların gerçek pozitif mi yoksa yalancı pozitif mi olduğunu gösterme gereksinimi doğmuştur. Bu yüzden erkek çocuk gebelik öyküsü olan kadınlardan alınan serum örnekleri ile ileri bir araştırma yapılması gerekmektedir. DYS14 konvansiyonel PCR analizinin SRY analizinden daha duyarlı olduğunun çalışmamızda gösterilmiştir. Literatürde DYS14 dizisi için gerçek zamanlı PCR analizi yokken SRY dizisi için uygulanan gerçek zamanlı PCR analizi %100 duyarlılığa ulaşmıştır. DYS14 için dizayn edilecek problarla gerçek zamanlı PCR analizinin, daha erken gebeliklerde %100 duyarlılığa ulaşacağını düşünmekteyiz.

Elde edilen verilerin doğum sonrası tüm gebeliklere ait cinsiyetler öğrenildikten sonra değişeceğini beklemekteyiz. İstatiksel analizlerin, bu veriler elde edildikten sonra yapılmasının, çalışılan olgu sayısı artacağından daha sağlıklı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Simpson JL, Elias S. Fetal cells in maternal blood: Overview and historical perspective. In: Simpson JL, Elias S, eds. *Fetal Cells in Maternal Blood: Prospective for Noninvasive Prenatal Diagnosis*. New York: New York Academy of Sciences; 1994. p.1-8.
2. Kuliev AM, Modell B, Jackson L, et al. Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagn* 1993;13:197-209.
3. Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, MacKenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation. *Lancet* 1991;337:762-3
4. Graves JC, Miller KE, Sellers AD. Maternal serum triple analyte screening in pregnancy. *Am Fam Physician* 2002;65:915-20.
5. Leo L.M. Poon, Y.M. Dennis Lo Circulating fetal DNA in maternal plasma *Clinica Chimica Acta* 313 (2001) 151-155
6. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–7
7. Jean-Marc Costa, Alexandra Benachi, Evelyne Gautier, Jean-Marie Jouannic, Pauline Ernault and Yves Dumez First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR *Prenat Diagn* 2001; 21: 1070–1074.
8. Smid M, Lagona F, de Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin Chem* 1999; 45: 1570–2
9. Al-Yatama MK, Mustafa AS, Ali S, Abraham S, Khan Z, Khaja N. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 2001; 21: 399–402
10. Costa J-M, Benachi AB, Gautier E, Jouannic J-M, Ernault P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn* 2001; 21:1070-4
11. Honda H, Miharu N, Ohashi Y et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110: 75–9
12. Costa J-M, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med* 2002; 346: 1502

13. Adrionne P. Rafa, Variations in Research Methods Using Polimerase Chain Reaction to Diagnose Fetal Gender from Maternal Blood UAHSJ1,14-18 (2004)
14. Fetal Tıp-Prenatal Tanı, Prof. Dr. M. Sinan Beksaç, Medical Network ve Nobel, 1996
15. Denise Goh Li Meng, Medical, Ethical, Legal and Social issues in Genetic Testing and Genetic Screening Programs (2005), www.bioethics-singapore.org/resources
16. OBSTETRİK, MATERNAL-FETAL TIP VE PERİNATOLOJİ, M.Sinan BEKSAÇ, Namık DEMİR, Acar KOÇ, Atıl YÜKSEL, MN MEDICAL ve NOBEL-2001
17. Genetic diagnosis before and during pregnancy, Prof. Dr. Dr. h.c. Spiros Simitis, 2003
Published by the German National Ethics Council
18. Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services, Report of a WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics, Geneva 1997
19. Christopher Cunniff and and Committee on Genetics, Prenatal Screening and Diagnosis for Pediatricians, Pediatrics 2004;114;889-894
20. UZUN VADELİ STRATEJİ VE SEKİZİNCİ BEŞ YILLIK KALKINMA PLANI
2001 – 2005, Ankara 2000
21. B.N. Chodirker, C. Cadrin, G.A.L. Davies, A.M. Summers, R.D. Wilson, E.J.T. Winsor, D.Young,Canadian Guidelines for Prenatal Diagnosis,GENETIC INDICATIONS FOR PRENATAL DIAGNOSIS, JOURNAL SOGC, 2001
22. Andrew McLennan, Advances in prenatal screening, Reprinted from Australian Family Physician Vol. 32, No. 3, March 2003 • 1
23. Z Alfirevic, SA Walkinshaw, AMNIOCENTESIS AND CHORIONIC VILLUS SAMPLING, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, RCOG Guideline No. 8, January 2005
24. R. D. Wilson, Greg Davies, Alain Gagnon, Valerie Desilets, Gregory J. Reid, Anne Summers, Philip Wyat, Victoria M. Allen, Sylvie Langlois, Amended Canadian Guideline for Prenatal Diagnosis (2005) Change to 2005-Techniques for Prenatal Diagnosis, J Obstet Gynaecol Can 2005;27(11):1048–1054
25. Reidun Øvstebø, Peter Kierulf and Kari Bente Foss Haug, Circulating nucleic acids in blood as biomarkers, Norsk Epidemiologi 2006; 16 (1): 41-49
26. Laird Jackson, Fetal cells and DNA in maternal blood, Prenat Diagn 2003; 23: 837–846.
27. Farideh Z.Bischoff, Mina K.Sinacori, Dianne D.Dang, Deborah Marquez-Do, Cassandra Horne, Dorothy E.Lewis and Joe Leigh Simpson, Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in

maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis, *Human Reproduction Update*, Vol.8, No.6 pp. 493-500, 2002

28. Diana W. Bianchi, John M. Williams, Lisa M. Sullivan, Frederick W. Hanson, Katherine W. Klinger, and Anthony P. Shuber, PCR Quantitation of Fetal Cells in Maternal Blood in Normal and Aneuploid Pregnancies, *Am. J. Hum. Genet.* 61:822–829, 1997

29. S S Y Ho, K O'Donoghue, M Choolani, Fetal Cells in Maternal Blood: State of the Art for Non-Invasive Prenatal Diagnosis, *Ann Acad Med Singapore* 2003; 32:597-604

30. Cees B. M. Oudejans, May Lee Tjoa, Bart A. Westerman, Monique A. M. Mulders, Inge J. VanWijk and John M. G. Van Vugt, Circulating trophoblast in maternal blood, *Prenat Diagn* 2003; 23: 111–116.

31. Sinuhe Hahn and Wolfgang Holzgreve, Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia, *Human Reproduction Update*, Vol.8, No.6 pp. 501-508, 2002

32. Simpson JL, Elias S. Fetal cells in maternal blood: Overview and historical perspective. In: Simpson JL, Elias S, eds. *Fetal Cells in Maternal Blood: Prospective for Noninvasive Prenatal Diagnosis*. New York: New York Academy of Sciences; 1994. p.1-8.

33. Shulman LP. Fetal cells in maternal blood. *Curr Womens Health Rep* 2003;3:47-54.

34. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: Frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993;91:427-32.

35. Shulman LP, Phillips OP, Tolley E. Frequency of nucleated red blood cells in maternal blood during the different gestational ages. *Hum Genet* 1998;103:723-6.

36. Hahn S, Sant R, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood: Current and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 1998;4:515-21

37. Sargent IL, Johansen M, Chua S, Redman CW. Clinical experience: Isolating trophoblasts from maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 1994;731:154-61.

38. Parano E, Falcidia E, Grillo A, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by isolation and analysis of fetal cells from maternal blood. *Am J Med Genet* 2001;101:262-7.

39. M. Galeazzi, G. Morozzi, M. Piccini, J. Chen, F. Bellisai, S. Fineschi, R. Marcolongo, Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders, *Autoimmunity Reviews* 2 (2003) 50–55

40. Hahn S, Holzgreve W (Eds): Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millennium. 11th Fetal Cell Workshop, Basel, 2000. Basel, Karger, 2001
41. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. *Autoimmun Rev.* 2004; 3(6):454-63
42. Diana W. Bianchi, Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 92 (2000) 103±108
43. Turco AE, Bambara LM. Pregnancy, microchimerism and autoimmunity: an update. *Lupus.* 2004; 13(9):659-60.
44. Ando T, Davies TF. Postpartum Autoimmune Thyroid Disease: The Potential Role of Fetal Microchimerism . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2003; 88(7):2965-71
45. Kristina M. Adams, J. Lee Nelson, Microchimerism An Investigative Frontier in Autoimmunity and Transplantation, *JAMA.* 2004;291:1127-1131
46. Talal El-Hefnawy, Siva Raja, Lori Kelly, William L. Bigbee, John M. Kirkwood, James D. Luketich and Tony E. Godfrey, Characterization of Amplifiable, Circulating RNA in Plasma and Its Potential as a Tool for Cancer Diagnostics, *Clinical Chemistry* 50:3 564–573 (2004)
47. Enders K. O. Ng, Nancy B. Y. Tsui, Tze K. Lau, Tse N. Leung, Rossa W. K. Chiu, Nirmal S. Panesar, Lydia C. W. Lit, Kam-Wing Chan, and Y. M. Dennis Lo, mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma, 4748–4753 *PNAS* 2003 vol. 100 no.8
48. Malcolm A. Ferguson-Smith, Placental mRNA in maternal plasma: Prospects for fetal screening, 4360–4362, *PNAS*, 2003, vol. 100 no. 8
49. D. W. Bianchi, Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential, *Placenta* (2004), 25, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 18, S93–S101
50. Y.M. Dennis Lo, Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications, *Clinical Chemistry* 46:12 1903–1906 (2000)
51. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
52. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768–75.

- 53.** E.Flori, B.Doray, E.Gautier, M.Kohler, P.Ernault, J.Flori and J.M.Costa, Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. *Human Reproduction* Vol.19, No.3 pp. 723±724, 2004
- 54.** Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique J.Guibert, A.Benachi, A.-G.Grebille, P.Ernault, J.-R.Zorn¹ and J.-M.Costa *Human Reproduction* Vol.18, No.8 pp. 1733±1736, 2003
- 55.** Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4360–2.
- 56.** Bianchi DW, LeShane ES, Cowan JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem* 2001;47:1867–9.
- 57.** Y.M. Dennis Lo, Recent Advances in Fetal Nucleic Acids in Maternal Plasma, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Volume 53(3): 293–296, 2005
- 58.** Y.M. DENNIS LO, Fetal DNA in Maternal Plasma/Serum:The First 5 Years, *PEDIATRIC RESEARCH*, Vol. 53, No. 1, 2003
- 59.** Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y (2001) First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn* 21:1070–1074
- 60.** Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, Okai T (2001) Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 47:1856–1858.
- 61.** Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE (1998) Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 352:1196
- 62.** Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, et al. (1998) Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 339:1734–1738
- 63.** Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S (2000) Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 107:766–769
- 64.** Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DHK, Lo YMD (2002) Prenatal exclusion of beta-thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 360:998–1000
- 65.** Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S (2003) Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. *Prenat Diagn* 23:393–396
- 66.** Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 46:301–302

67. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T (2000) Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 356:1170
68. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Gallardo E, et al. (2002) Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 22:946–948
69. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez De Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, et al. (2003) Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 23:232–234
70. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC (2001) Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 98:374–378
71. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, et al. (1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45:184–188
72. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, et al. (1999) Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 45:1747–1751
73. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM (1998) Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 352: 1904–1905
74. Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, et al. (2001) Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem* 47:2164–2165
75. Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JC, Wiegerinck E, Zusterzeel PL, Steegers EA (2002) Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 48:650–653
76. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang* 2001; 80: 112–6
77. Wei C, Saller DN, Sutherland JW. Detection and quantification by homogeneous PCR of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47: 336–8
78. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–7
79. Lagona F, Smid M, Papasergio N, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Multiple testing in fetal gender determination from maternal blood by polymerase chain

reaction. *Hum Genet* 1998; 102: 687–90

80. Falcinelli C, Battafarano S, Neri C et al. First-trimester fetal sex prediction by deoxyribonucleic acid analysis of maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 675–80

81. Rijnders RJP, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MAJM, Christiaens CML. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 374–8

82. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001; 47: 41–6

83. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47: 1856–8

84. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN, A. Çevik TUFAN, Babür KALELİ , Başak YILDIRIM, C. Nur SEMERCİ, Hüseyin BALCI, Analysis of Cell-Free Fetal DNA from Maternal Plasma and Serum Using a Conventional Multiplex PCR: Factors Influencing Success, *Turk J Med Sci* 35 (2005) 85-92

85. R. J. P. Rijnders, R. B. Van Der Luijt, E. D. J. Peters, J. K. Goeree, C. E. Van Der Schoot, J. K. Ploos Van Amstel and G. C. M. L. Christiaens, Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma *Prenat Diagn* 2003; 23: 1042–1044.

8. EKLER

8.1 BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Çalışma Başlığı: Maternal periferik kanda fetal genomik DNA'nın belirlenmesi

Hastane veya enstitü: Dokuz Eylül Üniversitesi tıp fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Son zamanlarda anne serum ve plazmasında fetusa ait DNA'nın bulunduğu ortaya koyulmasıyla invazif prenatal (doğum öncesi) tanı yöntemlerine başvurmadan anne kanından yararlanarak non-invasif olarak çeşitli prenatal tanı yöntemlerinin geliştirilmesi çalışmaları başlamıştır. Yaygın olarak kullanılan invazif yöntemler koryonik villus örnekleme (CVS) ve amniyosentezdir. Bu yöntemlerin uygulama prosedürlerinin fetus ve anneyi etkileyen riskleri taşımasından dolayı serumdaki fetus DNA'sından yararlanan yöntemlerin invazif tanı yöntemlerinin risklerini ortadan kaldıracığı gibi aynı zamanda invazif yöntemlerin uygulanacağı hamile kadınların duydukları endişeleri de ortadan kaldıracaktır.

Bu çalışmada anne kanından izole edilen DNA'dan yararlanarak, fetusun erkek olması durumunda, erkeklerde bulunan Y kromozomunun anne kanında belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece insanlarda cinsiyetin belirlenmesinde rol oynayan X kromozomuna bağlı ailesel geçiş gösteren hastalıkların prenatal tanısı daha az risk içerecek şekilde yapılabilecektir.

Bu çalışmada size herhangi bir ilaç verilmeyecek ve görmekte olduğunuz tedavi değiştirilmeyecektir. Sizden 10ml toplardamar kanı alınıp DNA izole edilecek ve fetüse ait Y kromozomunda bulunan özel gen bazı genlerin varlığına PCR yöntemi ile bakılacaktır. Analiz sonrası gerekli veriler elde edildikten sonra sizden alınan kan imha edilecektir. Ayrıca daha önce gebelik dönemi geçirdiyse bu konuda ilgili kısa bilgi alınacaktır. Bu çalışma için sizinle yalnız bir kez görüşülecektir.

Bu işlemin kan alınması dışında sizin üzerinizde hiçbir etkisi olmayacaktır. Kan alınması sırasında en sık görülen yan etkiler enjeksiyon yerinde ağrı ve morarmadır.

Bu çalışmaya katılacak 65 kişiden biri olacaksınız. Bu kişilerin 60'ı gebeliğinin 6-10. haftasında olan ve çeşitli sebeplerden dolayı amniyosenteze gönderilecek olan bayanlardan oluşmaktadır. Geriye kalan 5'i kontrol amaçlı erkeklerden oluşacaktır.

Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmaktasınız. Çalışmaya katılmamakta veya çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu çalışmaya katılmamanız veya başladıktan sonra herhangi bir noktada ayrılmamız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ücret ödenmeyecek ve sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içindeki kayıtların yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız her zaman kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız çalışmayı yürüten araştırmacılara, kurumun etik komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz (örneğin yaş...) yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri yayınlanabilir, ancak herhangi yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılmayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (veya bu metin bana okundu). Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum. Ve bu formun bir kopyasını aldım.

Tarih:

Gönüllünün

Adı Soyadı:

İmza:

Adres:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı Soyadı

İmza:

Adres

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı:

İmza: