

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**DOWN SENDROMUNUN HIZLI PRENATAL TANISINDA  
KANTİTATİF FLORESAN PCR TEKNİĞİNİN KULLANILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
Dr. Hatice KOÇAK

**TEZ DANIŞMANI**  
Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ

**MANİSA**  
2007

## TEŞEKKÜR

Celal Bayar Üniversitesi araştırma fonu tarafından 2005/028 no'su ile desteklenen bu projede; çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi aşamalarında desteğini ve bilimsel görüşlerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Oğuz Altungöz'e, tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nuray Altıntaş'a, laboratuvarın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya, zor günlerimde yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve başından beri her an destek ve fedakârlıklarını gördüğüm aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Hatice KOÇAK

Nisan 2007

## İÇİNDEKİLER:

<b>Tablo Listesi</b> .....	3
<b>Şekil Listesi</b> .....	5
<b>Resim Listesi</b> .....	6
<b>Kısaltmalar</b> .....	7
<b>1. GİRİŞ</b> .....	8
<b>2. GENEL BİLGİLER:</b> .....	11
2.1 Prenatal Tanı .....	11
2.2 Prenatal Tarama Testleri .....	14
2.2.1 Maternal Yaşın Değerlendirilmesi:.....	14
2.2.2 Maternal Serum Tarama Testleri:.....	16
2.2.3 Ultrasonografi:.....	19
2.2.4 Anne Dolaşımındaki Fetal Hücrelerin Ayırıştırılması:.....	20
2.3 Prenatal Tanı Testleri .....	21
2.3.1 Prenatal Tanının Amacı:.....	22
2.3.2 Prenatal Tanı Endikasyonları:.....	22
2.3.3 Prenatal Tanı Yöntemleri:.....	24
2.3.3.1 Amniyosentez:.....	24
2.3.3.2 Koryon Villüs Örnekleme:.....	25
2.3.3.3 Kordosentez:.....	27
2.3.3.4 Preimplantasyon Genetik Tanı:.....	28
2.4 Prenatal Tanıda Gold Standart: Fetal Karyotip Analizi .....	28
2.5 Moleküler Yöntemler.....	29
2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	29
2.5.2 Floresan İn Situ Hibridizasyon:.....	32
2.5.3 Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	33
2.5.3.1 Tanım ve Genel Bilgi:.....	33
2.5.3.2 Avantajları .....	34
2.5.3.3 Dezavantajları .....	37
2.5.3.4 Güvenilirliği .....	38
2.5.3.5 Analiz .....	40
2.5.3.6 Sonuçların değerlendirilmesi.....	43
2.6 STR Polimorfizmleri.....	47
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	51
3.1 Doku Örnekleri:.....	51
3.2 Hücre Sayımı:.....	51
3.3 Hücre Elde Edilmesi: .....	55
3.4 Hücre Dondurma: .....	56
3.5 DNA İzolasyonu:.....	56
3.6 DNA İzolasyon Kontrolleri:.....	59
3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonları: .....	59
3.8 Agaroz Jel Elektroforezi:.....	64
3.9 Genescan Analizi:.....	64
3.10 İstatistiksel Analizler: .....	64

3.11	Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Maddeler: .....	65
4.	<b>BULGULAR:</b> .....	67
4.1	Doku Örnekleri:.....	67
4.2	İstatistik Sonuçları .....	67
4.2.1	Kruskal Wallis Testi Sonuçları: .....	67
4.2.2	Spearman Korelasyon Testi Sonuçları: .....	68
4.3	DNA İzolasyonu:.....	69
4.3.1	DNA İzolasyon Kontrolleri:.....	70
4.4	PCR Sonuçları:.....	71
4.4.1	D21S1270 ile PCR Sonuçları: .....	71
4.4.2	D21S11 ile PCR Sonuçları: .....	71
4.4.3	D21S1411 ile PCR Sonuçları: .....	72
4.5	Genescan Analizi Sonuçları:.....	73
4.6	Genescan Analizinin İstatistik Değerlendirmesi: .....	77
5.	<b>TARTIŞMA:</b> .....	79
6.	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER:</b> .....	89
7.	<b>ÖZET:</b> .....	91
8.	<b>SUMMARY:</b> .....	92
9.	<b>EKLER:</b> .....	93
9.1	EK-1: Gebelik Haftası-Hücre Sayıları.....	93
9.2	EK-2: DNA'ların Safılık ve Konsantrasyonları .....	105
9.3	EK-3: QF-PCR Ürünlerinin Elektroforetogramları .....	110
10.	<b>KAYNAKLAR:</b> .....	131

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1:</b> Kromozom bozukluklarının görülme sıklığı.....	11
<b>Tablo 2:</b> Üçlü Test.....	17
<b>Tablo 3:</b> Erken spontan abortus materyallerinde saptanan kromozomal bulgular .....	24
<b>Tablo 4:</b> QF-PCR'ı kullanarak trizomi 21'in prenatal tanısına ilişkin çalışmaların sonuçları. ....	39
<b>Tablo 5:</b> Mikrosatellit belirleyicilerin karşılaştırması.....	59
<b>Tablo 6:</b> D21S1270 için PCR Profili: .....	60
<b>Tablo 7:</b> D21S1270 için PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları:.....	60
<b>Tablo 8:</b> D21S11 için PCR Profili: .....	61
<b>Tablo 9:</b> D21S11 için PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları: .....	61
<b>Tablo 10:</b> D21S1411 için Master Mix ile PCR Profili: .....	62
<b>Tablo 11:</b> D21S1411 için Master Mix ile PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları:.....	62
<b>Tablo 12:</b> D21S1411 için PCR Profili: .....	63
<b>Tablo 13:</b> D21S1411 için PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.....	63
<b>Tablo 14:</b> Kullanılan Gereçler ve Markaları .....	66
<b>Tablo 15:</b> 1 ml süspansiyondaki hücre sayısının Kruskal Wallis Testi sonucu .....	67
<b>Tablo 16:</b> 1 ml süspansiyondaki canlı hücre sayısının Kruskal Wallis Testi sonucu .....	68
<b>Tablo 17:</b> Canlı hücre oranının Kruskal Wallis Testi sonucu .....	68
<b>Tablo 18:</b> 1 ml amniyon sıvısındaki hücre sayısının Kruskal Wallis Testi sonucu .....	68
<b>Tablo 19:</b> ABI 310'da yapılan analiz sonuçları .....	73
<b>Tablo 20:</b> D21S1411 heterozigote frekansının karşılaştırılması .....	75
<b>Tablo 21:</b> Diallelik Örneklerdeki Pik Oranları.....	75

<b>Tablo 22:</b> Genescan analiz sonucu elde edilemeyen DNA örnekleri.....	76
<b>Tablo 23:</b> Genescan analiz sonucu yetersiz olan DNA örnekleri.....	76
<b>Tablo 24:</b> Genescan analiz sonucu uninformatif olan DNA örnekleri .....	76
<b>Tablo 25:</b> QF-PCR testinin öngörü değerleri .....	77
<b>Tablo 26:</b> QF-PCR analizi için gerekli amniyon sıvı hacminin gebelik haftasına göre dağılımı .....	78

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1:</b> Spontan abortuslarda otozomal trizomi oranları.....	12
<b>Şekil 2:</b> Doğumda anne yaşına özgül trizomi 21 ve kromozom anomali riskleri.....	14
<b>Şekil 3:</b> Plasenta.....	25
<b>Şekil 4:</b> Koryonik villus örnekleme ve Amniyosentez.....	26
<b>Şekil 5:</b> Kapiller elektroforez.....	40
<b>Şekil 6:</b> Floresan Boyalar.....	41
<b>Şekil 7:</b> Farklı STR belirleyicilerin birlikte kullanılması ile elde edilen informatif sonuç yüzdeleri.....	45
<b>Şekil 8:</b> Stutter bantların jel ve elektroforetogram görüntüleri.....	49
<b>Şekil 9:</b> Neubauer Hemositometre.....	54
<b>Şekil 10:</b> Belirleyicilerin kromozom 21 üzerindeki yerleşimi.....	63
<b>Şekil 11:</b> 2 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu.....	73
<b>Şekil 12:</b> 5 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu.....	73
<b>Şekil 13:</b> 6 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu.....	74
<b>Şekil 14:</b> 8 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu.....	74
<b>Şekil 15:</b> 2 no'lu DNA örneğinin D21S1270 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu.....	74
<b>Şekil 16:</b> 38 no'lu DNA örneğinin D21S1411 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu.....	74

## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 1:</b> 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 no'lu DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri. ....	70
<b>Resim 2:</b> 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 no'lu DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri.....	70
<b>Resim 3:</b> 1, 4/10x, 38/2x, 43 no'lu DNA örneklerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. ....	71
<b>Resim 4:</b> 53/4x, 54, 55/2x, 56/3x, 57/3x, 58, 59/2x, 60/2x, 61/2x, 62 no'lu DNA örneklerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. ....	71
<b>Resim 5:</b> 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140 no'lu DNA örneklerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	72
<b>Resim 6:</b> 20 ve 51 no'lu DNA'ların farklı oranlarda dilüsyonuyla kurulmuş PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. ....	72



## **KISALTMALAR**

**AFAFP:** Amniotic Fluid Alpha-FetoProtein

**AFP:** Alpha-FetoProtein

**bp:** Base Pair

**CCD:** Charge-Coupled-Device

**CVS:** Chorionic Villus Sampling

**DGGE:** Density Gradient Gel Electrophoresis

**dNTP:** Deoksi Nükleotit Trifosfat

**EtBr:** Etidyum Bromür

**FBS:** Fetal Blood Sampling

**FISH:** Fluorescence In situ Hybridization

**GDB:** Genome DataBase

**HBSS:** Hank's Balanced Salt Solution

**hCG:** human Chorionic Gonadotropin

**HPRT:** Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase

**IVF:** In Vitro Fertilizasyon

**İMY:** İleri Maternal Yaş

**MGP:** Magnetic Glass Particles

**µl:** Mikrolitre

**ml:** Mililitre

**MoM:** Multiples of the Median

**MSAFP:** Maternal Serum Alpha-FetoProtein

**NT:** Nuchal Translucency

**PAPP-A:** Pregnancy-Associated Plasma Protein A

**QF-PCR:** Quantitative Fluorescence Polimerase Chain Reaction

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**SSCP:** Single Strand Conformation Polymorphism

**STR:** Small Tandem Repeats

**TBE:** Tris Borat EDTA

**TGGE:** Temperature Gradient Gel Electrophoresis

**uE3:** Unconjugated Estriol

**UV:** Ultraviole

## 1. GİRİŞ

Anöploidi en sık gözlenen ve klinik açıdan en önemli kromozom bozukluğu türüdür. Klinik olarak teşhis edilen tüm gebeliklerin en az %3-4'ünde bulunur. Anöploid hastalıkların tümünde ya trizomi veya daha nadiren monozomi vardır. Trizomi genomun her bir parçasında olabilir ancak bir kromozomun tümünün trizomisi yaşamla nadiren bağdaşır. Canlı doğan bebeklerde en sık görülen trizomi tipi trizomi 21'dir (*Nussbaum et al, 2005*).

Biyokimyasal testler ve ultrason fetal kromozomal anomalilerin taranması için standart işlemler olmuştur (*Pertl et al, 1999; Norton et al, 1994; Miny et al, 2003, Holzgreve et al, 2003*). Riski belirlemek için anne yaşıyla beraber değerlendirilirler. Her iki yaklaşım, test edilen annelere fetuslarının major bir kromozomal bozukluğu olup olmayacağı ve tanıyı doğrulamak için invaziv bir işleme ihtiyaç duyulup duyulmadığı hakkında bilgi verir (*Pertl et al, 1999*).

Günümüzde kromozomal anomalilerin doğum öncesi tanısında, bu anomaliler için yüksek riskli olduğu düşünülen gebelere, gebelik yaşına uygun olarak amniyosentez veya koryon villüs örnekleme gibi invaziv işlemler uygulanır. Ancak bunlar invaziv bir işlem olduğu için gebelerin yaklaşık %1'inde düşüğe sebep olabilir. Örnekleme takiben tam bir karyotip elde edilir. Fetal kromozom anomalilerinin tek kesin tanı yöntemi karyotiplemedir. Bir prenatal karyotip analizinin ortalama rapor edilme süresi yaklaşık 14 gündür (*Elles et al, 2004; Zimmermann et al, 2004*). Fetal örneklerin toplanması ve fetal karyotipin sitogenetik analizinin tamamlanması arasındaki bu süre ebeveynler için endişeli geçen bir süreçtir.

1990'ların başında FISH ("Fluorescence In situ Hybridization") ve günümüzde QF-PCR ("Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction"); fetal hücre kültürüne ihtiyacı ortadan kaldırmak ve böylece

seçilmiş bazı kromozom anomalilerinin hızlı tanısına olanak sağlamak için prenatal tanı alanına girmiştir (*Elles et al, 2004; Klinger et al, 1992; Von Eggeling et al, 1993; Divane et al, 1994; Pertl et al, 1994; Pertl et al, 1999; Eiben et al, 1998; Yang et al, 2005*).

FISH yönteminde özgül DNA problemleri kullanılır. Bu problemler ya direkt floresan ışık yayan kimyasal olarak modifiye nükleotidlerle işaretlidir ya da floresan olarak işaretli bir haberci molekül bağlandığında tespit edilebilirler (*Kuo et al, 1991; Whiteman et al, 1991; Divane et al, 1994; Roberts et al, 1999*). İnterfaz FISH analizleri, örnek alımını takiben 48 saat içinde belli kromozom anöploidileri konusunda bilgi verebildiğinden fetal karyotiplemeye paralel yardımcı bir test olarak kullanım alanı bulmuştur (*Dudarewicz et al, 2005; Leung et al, 2001; Tepperberg et al, 2001*). İnterfaz FISH, pek çok genetik laboratuvarında tercih edilen bir metot olmasına rağmen, yüksek işlem hacminde bir tanı servisi için QF-PCR'a dayalı bir yaklaşım daha uygundur.

QF-PCR; bireyler arasında uzunlukları polimorfizm gösteren kromozoma özgül DNA sekanslarının amplifikasyonuna dayanan moleküler bir yöntemdir. Floresan primerler yoluyla, çoğaltılan kısımlar görüntülenebilir ve otomatik DNA tarayıcıda pik alanları olarak ölçülebilir (*Adinolfi et al, 1997*). QF-PCR ile analiz süresi 24 saate indirilmektedir ki bu hem ebeveynleri rahatlatmakta, hem de ileri dönem gebeliklerde gebeliğin sonlandırılması kararının daha rahat alınmasını sağlamaktadır. Kültüre edilmemiş amniyon hücrelerinde uygulanarak kültür başarısızlıklarını elimine etmesi, aileye sonuç verememe riskini ortadan kaldırmaktadır.

FISH ve QF-PCR analiz edilen kromozomlara ait anöploidi olup olmadığı konusunda hızlı (24–48 saat içinde) tanı sağlar. Her iki teknik de tüm kromozomları teşhis etmek için uygulanabilmekle beraber, yalnızca cinsiyet kromozomları ile 13, 18 ve 21. kromozomlar rutin olarak analiz edilir. Bu teknikler triploidileri de gösterebilir.

QF-PCR'ın, FISH'e kıyasla bazı avantajları vardır (*Cirigliano et al, 2001; Hulte'n et al, 2003*). QF-PCR daha az hücrede uygulanabilir ve analiz kolayca otomatize edilebildiğinden, aynı anda çok örnek çalışılabilir (*Grimshaw et al, 2003; Ogilvie et al, 2003; Leung et al, 2004*). FISH'in

açıklayamadığı maternal kontaminasyonu tanımlaması ve güvenilir, duyarlı bir test olması sebebiyle ailelere daha kesin sonuç vermeyi sağlamaktadır. Bilgisayar programları ile elde edilen sonuçlar nesnel olarak yorumlanabilmektedir. Maliyetinin düşük olması ülkemiz sosyo-ekonomik koşullarına uyumu kolaylaştırmaktadır. Böylece QF-PCR ile prenatal tanıda karşılaşılan problemler en aza indirgenecek, fetal anöploidilerin etkili klinik kontrolü için bu tür anomalilerin erken tanımlanması sağlanacaktır. Kromozoma özgül daha fazla sayıda STR (“Small Tandem Repeats”) belirleyici kullanılmasıyla QF-PCR yönteminin hem duyarlılığı artacak, hem de daha yaygın bir kullanım alanı bulacaktır (*Mansfield et al, 1993; Pertl et al, 1999a; Levett et al, 2001*).

Bu çalışmada, trizomi 21’i saptamada QF-PCR metodunun etkinliğini deneysel olarak göstermeyi amaçladık. 14–22. gebelik haftalarında elde edilen ortalama amniyosit sayısı birime gelen olgularda prospektif olarak bakıldı. Ayrıca, QF-PCR’in en az kaç hücrede trizomi 21’i güvenilir biçimde saptayabildiği test edildi. Her iki değerinde elde edilmesinden sonra QF-PCR’la trizomi saptama yaklaşımının, güvenilir ve optimal olarak hangi gebelik haftasında ne kadar hacimde amniyon sıvısından yapılabileceğine dair verilere dayalı bir çıkarım elde edildi. Bu sayede daha erken doğum öncesi tanı olanakları test edilmiş oldu.

## 2. GENEL BİLGİLER:

### 2.1 Prenatal Tanı

Kromozomal anomaliler, tüm canlı doğumların yaklaşık %0,5'inde görülür (*Beers et al, 1999; Zimmermann et al, 2004*). Klinik açıdan önemli kromozom bozukluklarının şimdiye kadar en sık görülen tipi anöploididir (*Nussbaum et al, 2005*). Yeni doğanlarda otozomal anöploidi insidansı %0,2 olup, pek çok otozomal anöploidi hayatla bağdaşmadığı için spontan abortuslarda daha yüksek insidansa sahiptir (Şekil-1). Otozomal anöploidilerin büyük çoğunluğu trizomilerdir (*Gersen et al, 2005*). Trizomi 13, 18 ve 21 olarak adlandırılan, doğuma kadar yaşayan otozomal anöploid gebelikler, ciddi fenotipli kromozom anomalilerinin %89'unu oluşturur (*Elles et al, 2004; Lewin et al, 2000*).

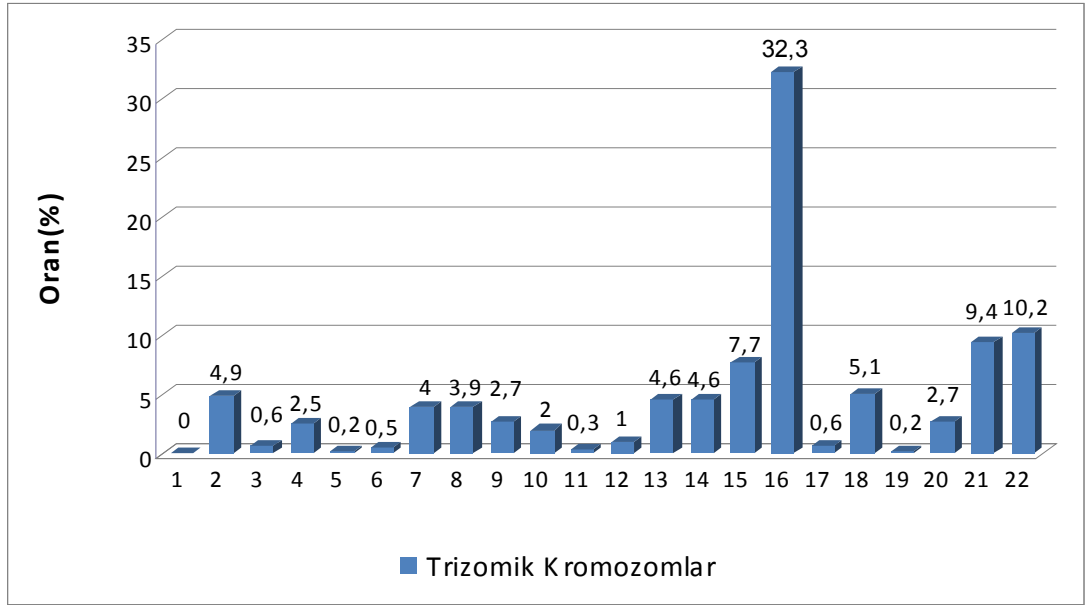
**Tablo 1:** Kromozom bozukluklarının görülme sıklığı

Anormal karyotip	İlk Trimester Düşükleri	35 Yaş Üstü Annelerin Fetusları	Canlı Doğumlar
Toplam görülme sıklığı	-	%2	%0,5
Sayısal anormallikler	%96	%85	%60
Yapısal anormallikler	%4	%15	%40
Dengeli	-	%10	%30
Dengesiz	%4	%5	%10

(*Nussbaum et al, 2005'den alınmıştır*)

Trizomi 21 insanlarda tanımlanan ilk kromozomal anomalidir. Fenotip 1866'da John Langdon Down tarafından tanımlanmış ve bugüne dek Down Sendromu olarak adlandırılmıştır. Mental retardasyonun bilinen en sık sebebidir. Down sendromu en yaygın otozomal anöploidi olarak bilinir. Anne

yaşına bağlı olarak değişmekle beraber, yaklaşık 700–800 yeni doğandan birinde görülür (Gersen et al, 2005; Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005; Valero et al, 1999; Nielsen et al, 1982). Down sendromlu pek çok fetus tarama sırasında ya da sonrasında kendiliğinden düştüğü için, tarama sırasındaki risk doğum sırasındaki riskten daha yüksektir. Hatta kendiliğinden düşüklerde görülen otozomal trizomiler arasında, trizomi 21'in üçüncü sırada yer aldığı görülmektedir (Şekil-1).



**Şekil 1:** Spontan abortuslarda otozomal trizomi oranları (Passarge E'dan alınmıştır).

Trizomi 21 tüm Down sendromu vakalarının yaklaşık %95'inden sorumludur. Kalan %5'ini mozaiklik ve robertson tipi translokasyonlar oluşturur (Gersen et al, 2005; Beers et al, 1999).

Yenidoğanda Down sendromu tanısı koyabilmek için, aşağıda görülmeliklikleriyle beraber verilen on kriterden en az dördünün görülmesi gerekir (Hall B, 1966; Jones KL, 2006):

- |                                  |                            |
|----------------------------------|----------------------------|
| %80 Hipotoni                     | %80 Oblik palpebral fissür |
| %85 Zayıf Moro refleksi          | %60 Kulak anomalileri      |
| %80 Eklemlerde hiperfleksibilite | %70 Pelvis displazisi      |
| %80 Ense kalınlığında artış      | %60 Klinodaktili           |
| %90 Basık yüz                    | %45 Simian çizgisi         |

Daha sonraki yaşlarda gelişme geriliği ve öğrenme güçlüğü giderek belirginleşir. Mental gerilik genelde çok ağır olmadığından Down Sendromlu hastalar eğitimden yarar görürler. Bu çocukların büyümeleri yavaş ve kemik yaşları geridir. Erişkin boyu normale oranla biraz kısadır. Ergenlik genellikle gecikir. Erkekler genelde infertildir, kızlar fertil olabilir. İleri yaşlarda en önemli sorunlar erken gelişen katarakt ve Alzheimer hastalığıdır. Down sendromlu çocukların yaklaşık %50'sinde yineleyen enfeksiyonlar nedeniyle işitme kaybı görülür. Ayrıca gözdeki kırma kusurları görme yeteneklerini azaltabilir. Hastaların yaklaşık yarısında doğumsal kalp defektleri (artiyoventriküler kanal, ventriküler ve atriyal septal defektler veya duktus arteriyozus açıklığı) vardır. Kalp hastalıkları ve akut lösemiye yatkınlıkları sebebiyle yaşam beklentisi azalmıştır. Ağır bir kalp anomalisi olmayanlar ileri yaşlara kadar yaşayabilir, ancak yaşlanma sürecinin hızlandığı görülmektedir (*Beers et al, 1999*). Daha az oranda duodenal veya anal atrezi tipinde gastrointestinal anomaliler de görülebilir. Bebeklik yaşlarında kalp anomalisi dışında en önemli ölüm nedeni enfeksiyonlardır. Down sendromlu çocuklar yeni doğan döneminde kalp anomalileri ve hipotiroidi yönünden mutlaka incelenmelidirler.

Tanı genellikle doğumdan önce prenatal tanı testleriyle kesinlik kazanır. Steele ve Berg 1966'da amniyon hücrelerini üretmeyi başardıktan 3 yıl sonra Valenti ve ark. (1969) Down sendromunun prenatal tanısını ilk kez rapor etmişlerdir. 1980'lerin başında CVS ("Chorionic Villus Sampling")'in gelişmesi ilk trimesterde tanı olanağı sağlamıştır (*Brambati et al, 1983; 1998; Spencer et al, 1988; Lippman et al, 1992*). Amniyosentez ve CVS örneklerinin prenatal tanısı için en yaygın endikasyon hala artmış fetal trizomi 21 riskidir (*Hu et al, 2004*). Trizomi 21 ve daha az ölçüde diğer kromozomal anomalilerin ilk ve ikinci trimesterdeki biyokimyasal ve ultrasonografik belirleyicilerinin tanımlanması, tek başına anne yaşına bağlı riske kıyasla daha iyi bir risk öngörüsüne olanak sağlamıştır (*Abramsky et al, 1997; Christian et al, 2000; Donague et al, 2003; Brun et al, 2004*). Ancak, en iyi tarama stratejisiyle bile, beklenen yanlış pozitiflik oranı %5'tir (*Cuckle et al, 2000; Petticrew et al, 2000; Wenstrom et al, 2003; Marteau et al, 2002*). Örneklemeden dolayı

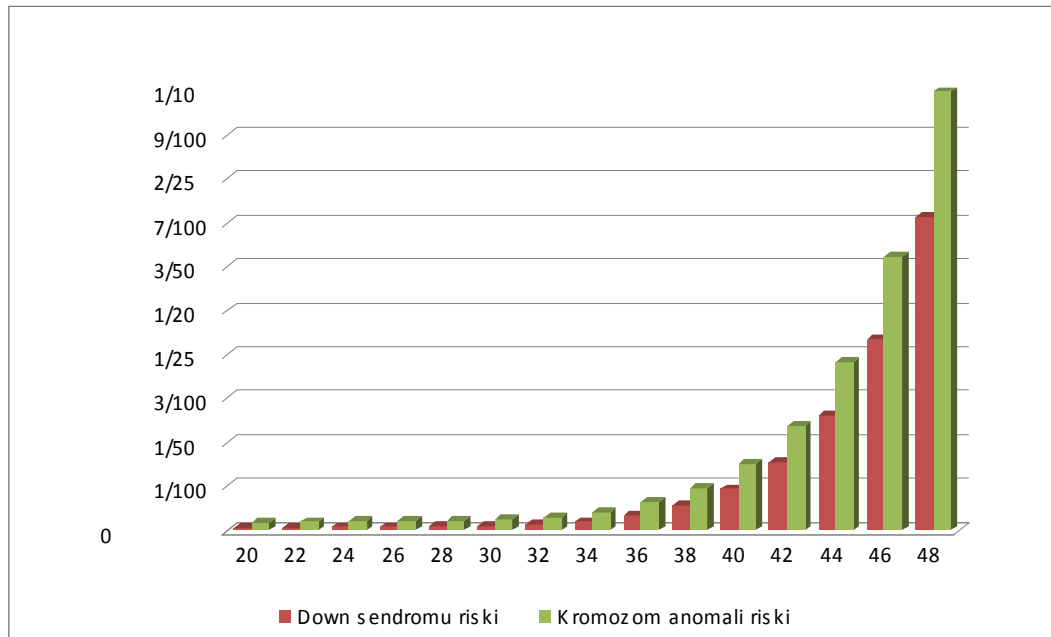
sağlıklı fetusun abortus riskinde anlamlı derecede artışın olduğu kadınlarda invaziv prenatal tanı önem arzeder. Bu vakalarda fetal hücreler (koryonik villüs hücreleri, amniyon sıvı hücreleri ya da umbilikal kord kanı lenfositleri) kültüre edilir ve tam karyotip analizi yapılır (*Kuppermann et al, 2000; Nicolini et al, 2004*).

Hem prenatal tarama hem de prenatal tanı, Down sendromunu en yüksek derecede duyarlılık ve doğrulukla teşhis etmeye yöneliktir. 1970'lerden beri sitogenetik analiz ikinci trimesterde yapılan amniyosentezle prenatal tanı için yaygın olarak uygulanan yöntemdir (*Hu et al, 2004*).

## 2.2 Prenatal Tarama Testleri

### 2.2.1 Maternal Yaşın Değerlendirilmesi:

Hesaplanmış risk, maternal yaşa göre istatistiksel olarak daha önce hesaplanmış olan riski modifiye etmek için kullanılır. Anne yaşı arttıkça Down sendromlu gebelik riski artar (*Sneijders et al, 1998*). (Şekil-2).



**Şekil 2:** Doğumda anne yaşına özgül trizomi 21 ve kromozom anomali riskleri (*Beers et al, 1999'dan alınmıştır*).

Düşük riske karşılık yüksek riskin cut-off değeri genetikçiler tarafından 1/250 olarak belirlenmiştir. Cut-off değerinin 1/250 seçilmesinin sebebi amniyosentezden kaynaklanan düşük yapma riskidir; şöyle ki risk 1/250 ya



da daha fazla ise, Down sendromlu bir bebeğe sahip olma riski, amniyosentez sebebiyle abortus riskinden daha fazladır. Risk 1/250'den az ise amniyosenteze bağlı abortus riski Down sendromlu bebeğinin olma riskinden daha fazladır. Cut-off değeri farklı makalelerde 1/270 – 1/200 arasında değişmekle beraber en yaygın kullanılan oran 1/250'dir (*Wald et al, 1999*).

Örneğin: Down sendromuyla ilişkili olmayan bir gebe için tipik düzende gelen test sonuçlarını varsayalım (tüm bileşenler için 1,0 MoM olacaktır). Bu sonuç, kadının Down sendromlu çocuk yapma riskini 4 kat (bu sayı klinik çalışmalara dayanır ve standarttır) azaltacaktır. Kadın 25 yaşındaysa, riski 1/1100'den 1/4400'e düşer. Kadın 35 yaşındaysa, riski 1/250'den 1/1000'e düşer. 45 yaşındaysa, bu onun riskini 1/20'den 1/80'e düşürür. Böylece serum tarama testi 36 yaşındaki kadının yüksek riskini düşük riske çevirirken, 25 yaşındaki kadının riskini cut-off değerinin altında, 45 yaşındakinin riskini cut-off değerinin üstünde devam ettirir (<http://www.ds-health.com/prenatal.htm>).

Şimdi Down sendromlu bir çocuğa gebelikle ilgili düzeyde gelen test sonuçları örneğini ele alalım. Bu, riski 4 kat artırır. Böylece 25 yaşındaki kadının riski 1/1100'den 1/275'e çıkar, ki bu hala sınırın altında bir risktir. Aynı durumda 36 yaşındaki kadının riski 1/250'den 1/62'ye çıkar ki her ikisi de yüksek risktir. 45 yaşındaki bir kadının riski 1/20'den 1/5'e çıkar ki yine yüksek riskte kalmış olur (<http://www.ds-health.com/prenatal.htm>).

Buradan anlaşılacağı gibi, serum tarama testlerinin sonuçları yorumlanırken en önemli nokta anne yaşıdır. Ancak serum tarama testlerinin %5–8 yanlış pozitif, %35–40 yanlış negatiflik oranına sahip olduğu ve bu yüzden Down sendromlu tüm fetusların yalnızca %60-65'ini tespit edebildiği unutulmamalıdır (*Marteau et al, 2001; Petrou et al, 2004*).

Günümüzde tarama, gebeliğin 15–20. haftaları arasında yapılır. Fakat en doğru saptama aralığı 16–18. haftalar arasındadır. Ayrıca, ilk üç ayda taramayı mümkün kılacak serum belirleyicilerinin (hatta anne idrarından bile) bazı kombinasyonlarını bulmak için araştırmalar devam etmektedir. Bu yeni belirleyiciler serum PAPP-A ("pregnancy-associated plasma protein A"),

serum inhibin A ve hCG (“human Chorionic Gonadotropin”)’in idrar metabolitlerini içerebilir (*Powell et al, 1995*).

### 2.2.2 Maternal Serum Tarama Testleri:

Down sendromu için maternal serum taraması ikinci trimesterde rutin olarak önerilir. Doğumda 35 yaşın altında olan ve son adet tarihine göre 15–18. gebelik haftasında olan tüm kadınlara “üçlü test” olarak bilinen bu tarama önerilebilir (*Beers et al, 1999*).

Üçlü test anne kanında Alfa-fetoprotein (AFP), serbest östriol (uE3) ve insan koryonik gonadotropin (hCG) ölçümlerine dayanarak yapılan bir risk belirleme yöntemidir. Bu üçü bağımsız ölçümlerdir ve anne yaşıyla beraber ele alındığı zaman (yukarıda tartışılmıştır) Down sendromlu bir bebeğe sahip olma riski hesaplanabilir (*Periodic Health Examination, 1996*).

❖ *Alpha-fetoprotein* temel olarak fetal karaciğerde ve yolk kesesinde üretilen, fetal dolaşıma salınan ve fetal böbrekler tarafından idrarla amniyotik sıvıya atılan bir glikoproteindir. Bir miktarı annenin dolaşımına geçer. Böylece hem anne serumunda (MSAFP), hem de amniyotik sıvıda (AFAFP) düzeyi ölçülebilir. Her iki ölçüm de prenatal tanıda değerlidir. Down sendromunda anne kanında AFP azalmıştır, bu olasılıkla yolk kesesinin ve fetusun normalden daha küçük olmalarından kaynaklanmaktadır (*ACOG Practice Bulletin, 2001; Copel et al, 1999*).

❖ *Estriol* fetal karaciğer ve adrenal bezin ürettiği bileşenleri kullanarak plasenta tarafından yapılan bir hormondur. Estriol Down sendromlu gebede azalmıştır. Bu test laboratuara bağlıdır, tüm taramalarda olmayabilir.

❖ *Human chorionic gonadotropin* plasenta tarafından üretilen bir hormondur ve gebelik testi olarak kullanılır. Beta subunit denen, hormonun daha küçük spesifik bir parçası Down sendromlu gebeliklerde artmıştır.

Tarama testlerinde önemli bir husus fetusun yaşıdır (gebelik yaşı). Farklı bileşenlerin doğru analizi gebelik yaşının kesin olarak bilinmesine bağlıdır. Bunu saptamanın en iyi yolu ultrasonografidir (*Filly et al, 2000*).

Önce serum testi sonuçları belirlenir. Test eden laboratuvarın referans değerlerine göre bir risk faktörü hesaplanır. Normallerin ortancası "population median" olarak adlandırılır. Test sonuçları bazen ortancanın çarpanları (Multiples of the Median, MoM) olarak rapor edilir. Böylece ortalama değer 1,0 MoM olarak adlandırılır. Down sendromu gebeliklerinde AFP ve estriol seviyeleri ortalamanın altında, yani 1,0 MoM'dan daha düşüktür (*Chard et al, 1995; Saller et al, 1996; Haddow et al, 1998*). AFP seviyesi ortalama 0,8 MoM olup, bu seviyeler anne yaşıyla beraber değerlendirilince 35 yaş altındaki kadınlarda Down sendromu gebeliklerin yaklaşık %25'i tespit edilebilir (*Beers et al, 1999*). Aynı şekilde ortalama uE<sub>3</sub> seviyesi yaklaşık 0,75 MoM'dur. uE<sub>3</sub> düzeyi sigara içen annelerde ve genel olarak fetal immatürite durumunda düşüktür. Çok düşük düzeyler ise steroid sülfataz eksikliği veya Smith-Lemli-Opitz sendromunun işareti olabilir. Down sendromlu gebeliklerde ortalama hCG seviyesi ise yaklaşık 2,5 MoM olup toplum ortalamasından oldukça yüksektir. Bazı çalışmalarda üçlü testte çalışılan hormonlardan  $\beta$ -hCG'nin daha önemli olduğu gösterilmiştir. Üç belirleyicinin tümünün kullanımı ile 35 yaş altındaki kadınlarda Down sendromlu fetusların yaklaşık %60'ı, ultrasonografinin de taramaya ilave edilmesiyle % 85'i saptanabilmektedir (*Beers et al, 1999*). Bu üç belirleyicinin hasta yaşına uyarlanmış ortalama seviyeleriyle Down sendromu için özgül bir risk elde edilir. Hesaplanmış riskleri 35 yaşında 16 haftalık gebe bir kadının riskinden (1/250) daha yüksek olan kadınların tarama testi pozitif kabul edilir (*Beers et al, 1999; Chard et al, 1995*).

**Tablo 2: Üçlü Test**

	AFP	uE <sub>3</sub>	HCG
Artmış Down sendromu riski	↓	↓	↑
Trizomi 18	↓	↓	↓
Nöral Tüp Defekti	↑	uygulanamaz	uygulanamaz

(*Beers et al, 1999'dan alınmıştır*).

Üçlü test ile ikili testten farklı olarak nöral tüp defektlerinin riski de belirlenebilmektedir. Ancak testin geç dönemde yapılması, sonuçlarının geç çıkması ve anormal bir sonuç çıkması durumunda, gebelik sonlandırılması işleminin 20–22. hafta gibi geç bir döneme denk gelmesi hastalar açısından önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Gebeliğin bu dönemde sonlandırılması hasta açısından önemli psikolojik sorunlara yol açabilmektedir. Ayrıca üçlü testin anomali saptama açısından duyarlılığının yüksek olmaması da ikinci önemli sorunu oluşturmaktadır.

Son zamanlarda kanda üçlü teste ek olarak inhibin-A düzeylerine de bakılarak (dörtlü-quadruple test) testin duyarlılığının arttığı gösterilmiştir. İnhibin-A pituiter bez tarafından folikül uyarıcı hormonunun üretimini inhibe etmek için tasarlanan, overler tarafından salınan bir proteindir. Down sendromlu fetusu olan annelerin kanlarında düzeyi artmaktadır (*Haddow et al, 1998*).

Down sendromu taraması için gebeliğin daha erken bir döneminde, 11–14. haftalar arasında yapılan ve “ikili test” adı verilen bir test klinik olarak uygulanmaya başlamıştır. İkili test kısaca PAPP-A ve serbest  $\beta$ -hCG adı verilen iki hormonun kanda ölçülmesi ile yapılan bir risk oranına dayanmaktadır (PAPP-A yeni fertilize olmuş yumurtanın kılıfı tarafından üretilir. Down sendromlu gebeliklerde ilk trimesterde bu proteinin düşük seviyelerde olduğu görülür). İkili testin avantajları arasında gebeliğin daha erken bir döneminde yapılması ve anormal bir sonuç durumunda daha fazla tanısal test seçeneğinin (koryonik villus örnekleme, erken veya geç amniosentez) olması, anomalili bebek durumunda ise gebelik sonlandırılmasının daha erken bir dönemde yapılabilmesidir. Ayrıca testin duyarlılığının üçlü teste göre daha yüksek olduğu rapor edilmektedir. Testin en önemli dezavantajı ise nöral tüp defektlerini saptayamamasıdır (*Snijders et al, 1998; Stewart et al, 1999*).

Sadece ikili test yapılması durumunda Down Sendromu olan bebeklerin %60'ı saptanabilmektedir. Aslında bu rakam üçlü test ile saptanan Down Sendromlu bebek sayısından farklı değildir, ancak ikili testte yalancı pozitif oranı daha düşüktür. Ayrıca ikili teste ek olarak ultrasonografide “ense

kalınlığı” ölçümü ile bu oran %85-90'lara ulaşmakta ve yalancı pozitiflik oranı % 5'e düşmektedir (*Stewart et al, 1999; Chard et al, 1995; Haddow et al, 1998*).

### **2.2.3 Ultrasonografi:**

Ultrasonografi gebelik sırasında sıkça kullanılır. Gebelik sırasındaki pek çok tanı işlemi için tamamlayıcıdır. Anne ya da fetus için bilinen bir riski yoktur. Down sendromu için anormal bir anne serum taramasından sonra ilk basamak, CVS ve amniyosentezden önce gebelik yaşını teyit etmek için ultrasonografik biyometrik ölçümler yapmaktır. Böylece bu girişimler gebelik sırasında uygun bir zamanda yapılabilir. Gebelik yaşını saptamanın yanı sıra birinci trimesterdeki ultrason muayenesi, gebelik kesesinin var olup olmadığını, fetus sayısını, plasental yerleşimi, fetusun canlı olup olmadığını ve uterusu değerlendirir. İkinci ve üçüncü trimesterdeki muayene ile fetusun duruşu da belirlenir. Ayrıca, amniyotik sıvı hacmi değerlendirilir ve gros malformasyonlar araştırılır. Fetal cinsiyetin tayini genellikle ikinci trimesterin sonlarında mümkündür (*Beers et al, 1999; Rotmensch et al, 1997; Chard et al, 1995*).

Ultrasonografi, koryon villüs örnekleme ve amniyosentez sırasında ise fetusu görüntülemek ve aletlerin yerleşimine rehberlik etmek için kullanılır (*Beers et al, 1999; Smith-Bindman et al, 2001; Benacerraf et al, 1996*).

Üçüncü aydan sonra, ultrasonografi fetusun açıkça belli yapısal bir doğum defekti olup olmadığını saptamak için kullanılabilir. Ultrasonografi gebe bir kadında yüksek ya da düşük alfa-fetoprotein düzeyi veya ailesel konjenital anomali öyküsü olduğu zaman genellikle fetusdaki anomalileri kontrol etmek için kullanılır. Bu şekilde hedeflenmiş bir ultrason muayenesi, intrakraniyal yapıları (özellikle ventriküller ve serebellum), omurilik, kalp, mesane, böbrekler, mide, göğüs kafesi, karın duvarı, uzun kemikler ve göbek kordonu giriş bölgesini değerlendirir (*Beers et al, 1999; Snijders et al, 1996*). İnce barsak tıkanıklığı, kalp defektleri gibi ciddi tıbbi problemlerin varlığından mümkün olduğu kadar erken haberdar olmak doğumdan sonra çocuğun tedavisine yardımcı olacaktır (*Rotmensch et al, 1997; Smith-Bindman et al, 2001*).

Fetusun değerlendirilmesi ve yapısal anomalilerin saptanabilmesi için yüksek çözünürlüklü ve gerçek zamanlı ultrasonografinin önemi giderek artmaktadır. Yüksek çözünürlüklü ultrasonografi, böbrek anomalilerini (renal agenezis [Potter sendromu], polikistik hastalık gibi), iskelet displazilerinin letal formlarını (akondrogezezis gibi), gut anomalilerini (diyafragmatik herni, obstrüksiyon gibi), mikrosefali ve hidrosefaliyi tespit edebilir. Ancak, testin tamamıyla hatasız olmaması sebebiyle normal bir ultrason sonucu, fenotipik olarak normal bir infantı garanti etmez. (*Beers et al, 1999; Benacerraf, 1996*).

Ultrasonografi ile saptanabilen fetal anomalilerin bazıları kromozomal anöploidilerle ilişkilidir. Fetal anöploidi riskini değerlendirmek için en yaygın kullanılan ultrason bulgusu “nuchal translucency” (NT) ölçümüdür. NT gebeliğin ilk trimesterinde (10–14. haftalar) fetal boyun bölgesinin arkasında anormal şekilde sıvı birikmesi nedeniyle artabilir. Bu tarama testi, Down sendromlu gebeliklerin %80'ine yakın bir kısmını saptayabilmektedir. Kromozom anöploidilerinin yanı sıra, artmış NT altta yatan bir kalp hastalığının veya genetik sendromların işaretçisi olabilir (*Beers et al, 1999; Stewart et al, 1999*).

#### **2.2.4 Anne Dolaşımındaki Fetal Hücrelerin Ayırıştırılması:**

1969 yılında anne dolaşımında çok az miktarda fetal hücre bulunduğu gösterilmiştir. Değişik teknikler kullanılarak anne kanında değişik tipte fetal hücreler ayırıştırılıp, monoklonal antikolar ile seçilebilir. Yoğunlaştırılmış bu fetal hücreler kromozom analizi, cinsiyet belirleme ve tek gen hastalıklarının moleküler tanısı için kullanılabilir (*Chiu et al, 2002; Nussbaum et al, 2005*).

Anne dolaşımında 1–6/1000 sıklıkta fetal hücre dolaştığı bilinmektedir. Bu sayısının pek çok anöploidide, özellikle de trizomi 21'de arttığı ve bu özelliğin de bu tip gebeliklerin saptanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (*Sekizawa et al, 2001*).

Anne kanında izlenen fetal hücreler lenfositler, trofoblastik hücreler ve nükleuslu eritrositlerdir. Fetal lenfositlerin maternal kanda yıllarca kalabileceği gösterilmiştir. Fetal lenfositlerin bu özelliği, sonraki gebeliklerde fetal hücre ayırışımı için anne kanını uygun kaynak olmaktan çıkarmaktadır. Trofoblastlar gebeliğin erken dönemlerinden gebeliğin sonuna kadar

dolaşımda bulunurlar. Nukleuslu eritrositler ise yolk sac tarafından üretilir ve eritropoezin karaciğere naklolduğu 12. haftadan sonra maternal kanda oranları giderek azalır ve 17. haftada saptanamaz. Buna karşın çalışmalar için en uygun hücreler nukleuslu eritrositlerdir. Çünkü maternal hücrelerden ayırılmaları diğer hücrelere göre daha kolaydır (*Spencer et al, 2003; Nussbaum et al, 2005*).

Bu metot henüz yeni gelişmekte olup, bazı teknik güçlüklerin aşılması için çalışmalar sürmektedir. Öncelikle anne kanındaki hücrelerden genetik çalışmalar yapabilmek için, kanda az sayıda bulunan bu hücreleri zenginleştirmek gerekir. Bunun için değişik kültür yöntemleri denenmiş ancak istenilen sonuç elde edilememiştir. Hücreleri floresan işaretleme yöntemleriyle fetal/maternal ayırımı yapmak ve flow sorting metodu ile fetal ve maternal hücreleri birbirinden ayırmak mümkündür (*Nussbaum et al, 2005; Mavrou et al, 2006*).

Bu yöntemin en önemli dezavantajı işlem sonrası hücrelerin ölmemesine rağmen üreme yeteneklerinin azalması ve dolayısıyla kromozom analizi için metafaz elde edilememesidir. Ancak bu yöntem FISH ve PCR tabanlı analizler için uygundur. Günümüzde yapılan çalışmalar daha çok bu zenginleştirme saflaştırma çalışmalarına yöneliktir.

### **2.3 Prenatal Tanı Testleri**

Prenatal tanısal testler, kalıtsal, sporadik ya da de novo belli bir genetik hastalığın varlığını saptamak için, fetusu doğumdan önce (prenatal olarak) test etmeyi amaçlar (*Beers et al, 1999*).

Prenatal tanı, prenatal tarama testlerinde yüksek riskli bulunan kişilere uygulanmalıdır (*Beers et al, 1999; Chard et al, 1995*). Bir tarama testi ile tanı testi arasındaki fark nedir? Tanı testlerinde, pozitif bir sonuç büyük ihtimalle hastanın hastalığa ya da şüphelenilen duruma sahip olduğu anlamına gelir. Tarama testlerinde, amaç hastanın hastalığa ya da ilgili duruma sahip olma riskini belirlemektir. Tanısal testler daha pahalı olma eğilimindedirler ve detaylı bir işlem gerektirirler; tarama testleri hızlı ve yapılması kolaydır. Fakat tarama testlerinin yalancı-pozitif ve yalancı-negatif gibi hata olasılığı daha fazladır (*Saller et al, 1996*).

### 2.3.1 Prenatal Tanının Amacı:

Prenatal tanının amacı, sadece anormallikleri fetal hayatta saptamak ve bulunduğu gebeliğin sonlandırılmasına olanak tanımak değildir. Prenatal tanının asıl hedefleri şunlardır (*Nussbaum et al, 2005*):

- Hastalıklı çocuk sahibi olma riski yüksek olan çiftleri bilgilendirerek değişik seçenekler sunmak.
- Özellikle yüksek risk grubundaki kişilere güven sağlamak ve onların endişelerini azaltmak.
- Normalde tekrar çocuk sahibi olmaya cesaret edemeyen, belli bir doğumsal bozukluklu çocuk sahibi olma riski yüksek olan çiftleri, hastalığın tanısının testler ile anne karnındayken konulabileceği konusunda bilgilendirerek, yeni gebeliğe başlama olanağı tanımak. Prenatal tanı olanakları sayesinde, ciddi genetik hastalıklı çocuk sahibi olma riski olan birçok çift sağlıklı çocuk sahibi olabilmektedir.
- Genetik hastalıklı çocuk sahibi olacak çiftlere, psikolojik olarak hazırlanma, gebeliğin/doğumun uygun izlemi ve yönlendirilmesi ve doğum sonrası bakım gibi konularda hazırlanma olanağı sağlamak.
- Etkilenmiş fetusun prenatal tedavisine olanak sağlamak. Bu şu anda çok az sayıda konjenital anomali için yapılmakla birlikte, uygulama sayısı hızla artmaktadır.

### 2.3.2 Prenatal Tanı Endikasyonları:

Bir gebenin, amniyosentez veya CVS gibi invaziv yöntemlerle prenatal tanı yapılmasına aday olmasında genel olarak kabul edilen ilke, bebekte anomali riskinin en azından işleme bağlı düşük yapma riskinden yüksek olmasıdır. Günümüz şartlarında temel prenatal tanı endikasyonları şunlardır:

- İleri anne yaşı: En yaygın endikasyondur (*Beers et al, 1999*). İleri anne yaşı genellikle gebelik anında 35 yaş ve üstü olarak kabul edilmektedir. Bunun sebebi kromozom anomalili fetus riski ile amniyosentez işlemine bağlı düşük riskinin bu yaşta neredeyse birbirine eşit olmasıdır.
- Önceden de novo kromozom anomalili çocuk varlığı: Kromozom anomalili çocuk sahibi olan çiftlerin kendi kromozom yapıları normal olmasına



rağmen, bazı durumlarda sonraki çocukta kromozom anomalisi görülmesi bakımından hala artmış bir risk olabilir. Örneğin, Down sendromlu çocuk sahibi olan 30 yaşında bir kadının, herhangi bir kromozom anomalisi için tekrarlama riski 1/100 iken, aynı yaştaki kadınlar için toplum riski yaklaşık 1/390'dır (*Nussbaum et al, 2005; Beers et al, 1999*).

➤ Ebeveynlerden birinde yapısal kromozom anomalisi varlığı: Bu durumda çocukta kromozom anomalisi riski, anomalinin tipine ve taşıyıcı ebeveynin kim olduğuna göre değişir (*Nussbaum et al, 2005; Beers et al, 1999*). En büyük risk (Down sendromu için %100) ebeveynlerden birinin der(21;21)(q10;q10) robertson tipi translokasyon veya izokromozom 21q taşıdığı durumda gerçekleşir.

➤ Aile öyküsünde biyokimyasal veya DNA analizi ile tanı konulabilen genetik hastalık varlığı: Bu gruptaki hastaların çoğu tek gen hastalıkları olup %25 veya %50 tekrarlama riskine sahiptir. Daha önceden hasta çocuk sahibi çiftler dışında, toplum taramaları ile taşıyıcı olduğu belirlenen çiftler de bu kategoridedirler.

➤ Özgül bir prenatal tanı testinin olmadığı X'e bağlı hastalık hikâyesi: Başka bir alternatif olmadığı durumda, daha önceden X'e bağlı hastalığı olan erkek çocuk sahibi çiftler, fetal cinsiyet tayininden faydalanmak isteyebilirler. Duchenne muskuler distrofi, hemofili-A ve B gibi DNA analiz yöntemi ile prenatal tanısı mümkün olan X'e bağlı hastalıklarda da öncelikle fetal cinsiyet tayini yapıp, bebek erkekse diğer testlere geçilmektedir. Yukarıda bahsedilen her iki durumda da preimplantasyon genetik tanı sadece söz konusu hastalıktan etkilenmemiş embriyoların uterusu transferini sağlamak için kullanılacak bir yöntem olabilir.

➤ Anne serumunda tarama ve ultrasonografi: Anne serumundaki belirleyicilerin tarama testlerinde anormal seviyelerde olması veya fetal ultrasonografi ile fetal anomaliler saptanması durumlarında daha ileri genetik değerlendirme ve testler önerilmektedir.

➤ Tekrarlayan spontan abortuslar: Erken spontan abortusların en az %50-60'ında fetusda kromozomal anomali vardır ve bunların yaklaşık yarısı trizomilerdir (Tablo-3). İlk kayıp anöploidide içeriyorsa sonraki kayıplarda da

anöploidi olması muhtemeldir. Ancak aynı kromozom olması gerekmez (*Beers et al, 1999*).

**Tablo 3:** Erken spontan abortus materyallerinde saptanan kromozomal bulgular

<b>Normal</b>	<b>%40</b>
<b>Anormal</b>	<b>%60</b>
Trizomi	%30
45,X	%10
Triploid	%10
Tetraploid	%5
Diğer	%5

(*Nussbaum et al, 2005 'den alınmıştır*)

### 2.3.3 Prenatal Tanı Yöntemleri:

#### 2.3.3.1 Amniyosentez:

Doğumdan önce anomalileri saptamak için kullanılan en yaygın işlemlerden biri amniyosentezdir. Amniyosentez, amniyotik sıvı örneğinin bir enjektörle transabdominal olarak alınması işlemidir (*Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005*). Amniyotik sıvı, kromozom analizi için kullanılacak olan fetus kökenli hücreleri içerir. Sonuçlar genellikle 2–4 haftada elde edilebilir (*ACOG Practice Bulletin, 2001; Nussbaum et al, 2005*). Amniyosentez, amniyotik sıvıda alfa fetoprotein seviyesini ölçme olanağı da sağlar. Bu ölçüm, fetusda bir beyin ve ya spinal kord defekti olup olmadığını anne kanındaki ölçümden daha güvenilir olarak gösterir (*Beers et al, 1999*).

Amniyosentez işlemi öncesinde fetusun canlı olup olmadığını, gebelik yaşını, fetus sayısını, fetal yapının normal olduğunu ve fetus ve plasenta pozisyonuna göre en uygun iğne giriş yerini saptamak için ultrasonografi rutin olarak kullanılır. Amniyosentez genellikle 15–16. gebelik haftasında uygulanır. Bazı merkezlerde işlem 10–14. gebelik haftasında olacak şekilde daha erken uygulanabilmekle beraber, komplikasyonlarda ve gebelik kaybında risk artışına sebep olacağı için gebeliğin 14. haftasından önce tavsiye edilmez (*Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005; Periodic Health Examination, 1996*).

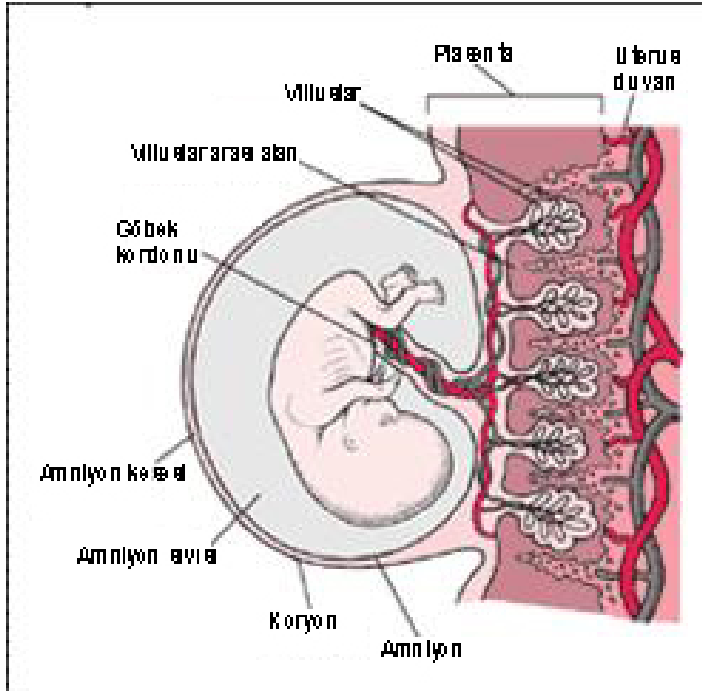
Amniyosentez anne ya da fetus için nadiren herhangi bir probleme sebep olur. İkinci trimesterde yapılan amniyosentez işleminin en belirgin

komplasyonu, normalde bu gebelik döneminde beklenen %2-3'lük gebelik kayıp riskine eklediği %0,5-1'lik ilave risktir (Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005; Wald et al, 1999). 10–14. haftalarda yapılan erken amniyosentez ile ikinci trimester amniyosentez işlemlerinin güvenliği ve fetal sonuçları karşılaştırıldığı zaman, erken amniyosentezde spontan abortus oranının %2,6 ikinci trimester amniyosentezdeki oranın ise %0,5–1 olduğu gösterilmiştir (Nussbaum et al, 2005). Fetusta iğne travmaları çok nadirdir. İkiz ya da daha çoğul gebeliklerde genellikle amniyosentez yapılır (Beers et al, 1999). Erken amniyosenteze bağlı arttığı gösterilen tek anomali talipes equinovarus (club foot)'tur. Genel toplumda risk %0,1–0,3 iken erken amniyosentez yapılanlarda risk %1,3'tür (Nussbaum et al, 2005).

Kadınların yaklaşık %1-2'sinde vajinadan kan lekesi ve ya amniyotik sıvı akıntısı olur, fakat bu etkiler uzun sürmez ve genellikle tedavisiz geçer. Ayrıca, Rh faktörüne karşı antikor geliştirmelerini önlemek için, invaziv girişimlerden sonra Rh negatif kadınlara, Rh<sub>0</sub>(D) immünglobulin enjeksiyonu rutin olarak yapılır (Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005).

### 2.3.3.2 Koryon Villüs Örneklemesi:

Koryonik villüsler plasentayı oluşturan küçük çıkıntılardır (Şekil–3).



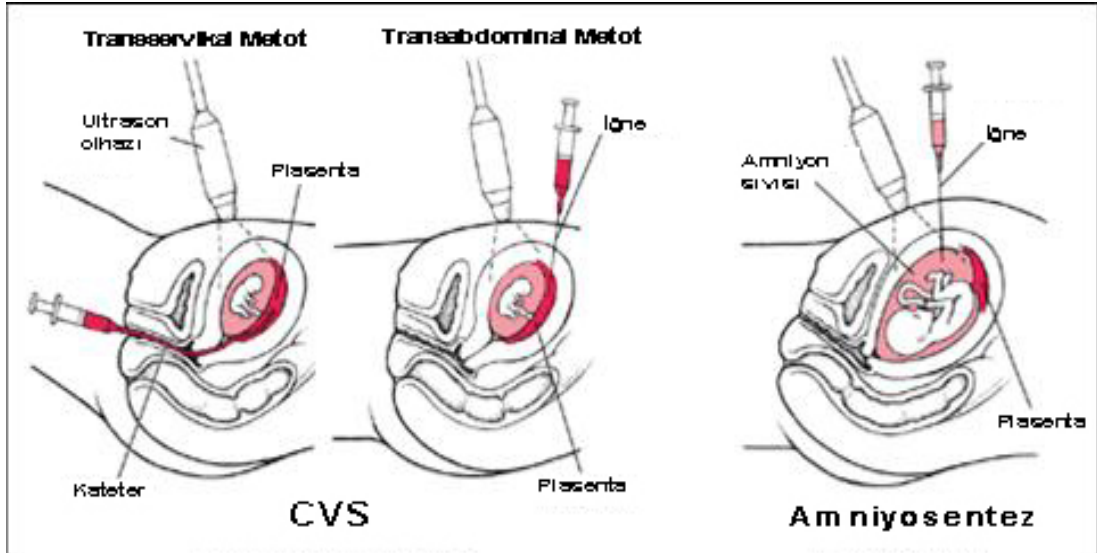
**Şekil 3:** Plasenta (Beers et al, 1999'dan alınmıştır).

CVS gebeliğin 10–12. haftalarında koryon villüslerden biyopsi alınması işlemidir. Bu biyopsi örneğinden kısa süreli ve uzun süreli kültürler kurulur. Her iki kültürden de karyotip elde edilir, ancak uzun süreli kültürlerden daha doğru sonuçlar elde

edilir. Kültüre amniyotik sıvı hücrelerindeki enzimlerin çoğu, koryonik villüslerin ya da kültüre villüs hücrelerinin ekstralarında de ölçülebilir ve moleküler genetik çalışmalar için DNA elde edilebilir. Ancak amniyon sıvısına ihtiyaç duyulan testlerde (amniyon sıvısında alfa-fetoprotein seviyesinin ölçümü gibi) CVS kullanılamaz (Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005).

İkinci trimester amniyosentez işlemi ile kıyaslandığında, CVS'nin en önemli avantajı, sonuçların gebeliğin daha erken döneminde elde edilmesi ve böylece, eğer tercih edilirse, gebeliğin sonlandırılması işleminin ilk trimesterde ve daha kolay, daha güvenilir metotlar kullanılarak yapılmasını sağlamasıdır. Tespit edilen bir anomali yoksa, çiftin sıkıntısı daha erken giderilmiş olacaktır. Aynı zamanda, bir anomalinin erken tespiti, doğumdan önce fetusun uygun tedavisi için gerekli olabilir. Mesela, konjenital adrenal hiperplazili bir dişi fetusta erkek özelliklerinin gelişimini önlemek için gebe bir kadına kortikosteroid verilebilir (Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005). İşlemden önce, amniyosentezde olduğu gibi CVS'te de fetusun canlı olup olmadığını belirlemek, fetusun yaşını teyit etmek, açıkça belli anomalileri gözden geçirmek ve plasentayı lokalize etmek için ultrasonografi yapılır.

Örnek amniyosentezde olduğu gibi aynı yolla toplanabilir ancak bu metot annenin anatomisine bağlıdır. İki CVS yaklaşımı vardır (Şekil-4).



**Şekil 4:** Koryonik villus örnekleme ve Amniyosentez (Beers et al, 1999'dan alınmıştır).

Transservikal CVS gebeliğin 10–13. haftalarında yapılabilir. Transabdominal CVS 10. haftadan gebeliğin sonuna kadar yapılabilir. Her iki

metotta ultrasonografi yol göstermek için kullanılır ve doku örneği şırınga ile bir katetere çekilir ve sonra analiz edilir (*Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005*).

Anneye yan etkileri amniyosentezle yaklaşık aynıdır. CVS işlemine bağlı düşük riski, 7–12. gebelik haftasında beklenen temel %2–5 riske ilave olarak yaklaşık %1 olup amniyosentezdekinden hafifçe daha fazladır. Erken yapılan CVS'lerde bir kısım bebeklerin el ve ayak parmaklarında kayıplar görülmüştür. Böyle hasar 3000 fetustan birinde görülür ve gebeliğin 10. haftasından önce CVS yapılmasıyla ilişkilidir (*Sneijders et al, 1998*)

Kromozom analizindeki başarı oranı amniyosentezdeki gibi %90'dan yüksektir. Ancak sonuçların yaklaşık %2'sinde kromozomal mozaikliğe bağlı belirsizlik vardır. Bu durumda amniyosentez ile kontrol önerilmektedir (*Beers et al, 1999; Nussbaum et al, 2005*).

Amniyosentezde olduğu gibi CVS'te de işlemden sonra, kanı Rh negatif olan ve Rh faktörü için antikor olmayan çoğu kadına, Rh immünizasyonunu engellemek için Rh<sub>0</sub>(D) immünglobulin enjeksiyonu yapılır. Kanı Rh negatif olan bir kadın, fetusun kanı Rh pozitif olup, koryonik villüs örnekleme sırasında olabileceği gibi kendi kanına karıştığı durumlarda bu antikorları oluşturabilir. Bu antikorlar fetusda problemlere sebep olabilir. Babanın kanı da Rh negatifse enjeksiyona ihtiyaç duyulmaz, çünkü fetusun kanı Rh negatif olacaktır (*Beers et al, 1999*).

### **2.3.3.3 Kordosentez:**

Kordosentez ("Fetal Blood Sampling", FBS), ultrasonografi rehberliğinde perkutan umbilikal kan örneklemeyle, fetal kan örneğinin doğrudan umbilikal kord veninden alınması işlemidir. Perkutan umbilikal kan örnekleme, özellikle üçüncü trimesterde fetal anomaliler tespit edildiği zaman hızlı kromozom analizi için faydalıdır. Ayrıca amniyosentezde kültür üremesi elde edilmediği veya çelişkili sonuçlar alındığı zaman ya da DNA yöntemiyle tanı konulamayan ancak tanı için fetal plazma veya kanda biyokimyasal testlerin yapılması gereken hastalıklar söz konusu olduğunda yapılır. Kordosentez genellikle gebeliğin 19–21. haftalarında yapılır. Kısa süreli lenfosit kültürleriyle 48–72 saatte sonuçlar elde edilebilir (*Beers et al,*

1999; Nussbaum et al, 2005). Ancak FBS %2'ye yakın fetal kayıp riski taşımakta ve hatta FBS endikasyonu, ultrasonografide tespit edilen yapısal bir anomali ise daha yüksek fetal kayıp oranları (%13) bildirilmiştir (Antsaklis et al, 1998).

#### **2.3.3.4 Preimplantasyon Genetik Tanı:**

Preimplantasyon genetik tanı, in vitro fertilizasyon (IVF) sırasında uterusu aktarım öncesi, belirli genetik hastalıklara sahip olmayan embriyoların seçiminde moleküler veya sitogenetik tekniklerin kullanılmasıdır. Bu teknolojinin gelişmesinde temel amaç, gebelik sonlandırmalarını önlemek ve yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırmaktır. Etik olarak daha kolay kabul edilebilir metotlar olduğu için, gebeliğin sonlandırılmasına karşı çıkan ve belli genetik hastalık veya anöploidi yönünden yüksek riskli bulunan çiftlere seçenek sunulmuş olur. Preimplantasyon genetik tanı için polar cismi almak amaçlı mikromanipülasyon teknikleri uygulanabilir veya IVF sonrası 6–8 hücreli blastomer aşamasında tek hücre biyopsisi yapılabilir. Etkilenmemiş embriyonun aktarımı, blastomerin moleküler veya kromozomal analizlerde, araştırılan genetik anomaliyi taşımadığının belirlenmesinden sonra gerçekleştirilmektedir (Handyside, 1996; Nussbaum et al, 2005).

Bu teknikler yalnızca belli mendelyan hastalıklar için yüksek genetik risk taşıyan çiftlere yapılır. İn vitro fertilizasyon tekniklerinin yüksek maliyeti, bu tekniklerin yaygın kullanımını engellemektedir (Beers et al, 1999).

#### **2.4 Prenatal Tanıda Gold Standart: Fetal Karyotip Analizi**

Standart karyotip analizi 23 çift kromozomun sayısal ve yapısal olarak incelenmesi anlamına gelir. Anne yaşıyla orantılı olarak sıklığı artan ve ayrılamama hatalarıyla ilişkili olan en yaygın kromozom anomalileri, ya tüm hücrelerde ve ya mozaik bir durumda bir kromozomun ekstra bir kopyasıyla ya da kaybıyla sonuçlanır ve kolaylıkla teşhis edilir (Ferguson-Smith et al, 1984). 1970'lerde ve 1980'li yılların başında hata oranı %0,1–0,6 olarak rapor edilmiştir (Hsu et al, 1992). Yüksek çözünürlüklü bantlama iki Mb ( $10^6$  baz) kadar küçük anomalilerin tanısına olanak sağlamasına karşın, rutin olarak yalnızca dört Mb ve üzeri büyüklükteki yapısal anomaliler teşhis edilebilir.

Özetle; bugünkü koşullarda tam karyotip, prenatal tanıda altın standarttır. Ancak yapısal kromozom anomalileri, kromozomun çok küçük bir parçasını içeriyorsa tanınmayabilir. En yaygın yapısal anomaliler olan dengeli translokasyonlar ve inversiyonlar, mevcut gebeliklerde klinik olarak önemsizdirler, ancak genetik danışma ve ek araştırmalar (çiftin karyotipi, seçilmiş vakalarda yüksek çözünürlüklü fetal ultrasonografi vb.) için gereklidirler (*Jacobs et al, 1974; Warburton et al, 1984; Warburton et al, 1991*).

Trizomi 21 hastalarının bölünen hücrelerinde uygulanan konvansiyonel sitogenetik metotlar, yüksek derecede çoğalan hücrelerle sınırlıdır ve fetal hücreleri kültüre etmek ve analizi tamamlamak 10–21 günlük bir zaman gerektirir (*Salk et al, 1983; Mostulsky et al, 1997; Zheng et al, 2006*). Bu sürecin genellikle psikolojik olarak ağır bir yük olduğu düşünülür ve patolojik bir tanıyı takiben gecikmiş gebelik sonlandırılmaları ile sonuçlanır. Bazı ülkelerde kromozom anomalilerinin ilk trimester tarama ve tanısına yönelik gerçekleştirilen değişiklikler, daha çok zaman faktörünün üstesinden gelmek amacıyla yapılan girişimlerdir. Ancak örnekleme ile tam karyotip analizinin tamamlanması arasındaki süre yine fazlasıyla uzun olarak kalır (*Simoni et al, 1983*).

Tam karyotip analizi, önemli ölçüde teknik uzmanlık gerektirir. Laboratuvarla ilgili teknik gelişmelere ve kısmi otomasyona rağmen, hala anlamlı derecede işgücü gerektirir ve bir uzmanın güvenli bir şekilde üstesinden gelebileceği analiz sayısı sınırlıdır (*Nicolini et al, 2004*).

Trizomi 21 tanısı için sitogenetik karyotip analiz, aşırı emek yoğun ve zaman alıcı olmasına ve klinik uygulamada pahalı olmasına rağmen, şimdiye kadar yüksek derecede güvenilir ve kesin bir metot olarak görülmüştür (*Hu et al, 2004*).

## **2.5 Moleküler Yöntemler**

### **2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki

tarafından geliştirilen PCR metodu nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanır. Moleküler biyolojik uygulamaların temel işlemlerinden biridir. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PCR'ın geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K. Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır (*Snustad et al, 2003*).

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak in vitro şartlarda çoğaltılması prensibine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Hızlı, verimli ve tekrarlanabilir olması yanında elde edilen ürünün daha sonra farklı yöntemler ile farklı amaçlar için değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Primerlerin seçimi, PCR koşulları gibi farklı etkenler PCR'ın özgüllüğünü ve verimliliğini değiştirmektedir (*Innis et al, 1990; Kidd et al, 1994*). Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır: DNA örneği, genelde genomik DNA; çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP); yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını ( $Mg^{+2}$ ) sağlayan tampon karışımı, genelde  $MgCl_2$  (*Snustad et al, 2003*).

Her PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenilen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. Bir PCR döngüsü sırasıyla, DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması ("Denaturation"); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması ("Annealing") ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması ("Extension") aşamalarından meydana gelir. Bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (sırasıyla  $94^{\circ}C-98^{\circ}C$ ;  $37^{\circ}C-65^{\circ}C$ ;  $72^{\circ}C$ ). PCR tekniği, tek ve çift sarmallı DNA, ya da RNA için kullanılabilir (*Snustad, 2003*). PCR'ın kullanıma geçmesiyle laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış, birçok durumda radyoaktivite kullanımı gereksiz hale gelmiştir. PCR yöntemi, kolay uygulanabilir olması ve hızlı



sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle, birçok farklı alanda kullanılabilir. Bu alanlar şöyle özetlenebilir (*Snustad et al, 2003*):

- 1) Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
- 2) Prenatal tanıda,
- 3) Adli tıpta,
- 4) Onkogenesinin araştırılmasında,
- 5) "Probe" oluşturulmasında, klonlamada, gen tanımlaması araştırmalarında,
- 6) DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
- 7) Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- 8) RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") analizinde,
- 9) IVF yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılmasında ve implantasyonun gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğumunun sağlanması sırasında,
- 10) DNA-Protein etkileşiminin araştırılmasında ("footprinting") kullanılabilir.

Bu uygulamalarda kullanılan kalıp DNA çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. DNA eldesinin yöntemleri kullanım amacına göre değişmekle beraber, hücreyi parçaladıktan sonra nükleik asitleri diğer hücre elementlerinden uzaklaştırma işlemi esasına dayanır (*Innis et al, 1990; Kidd et al, 1994*).

PCR sonrası elde edilen ürünlerin direk analizi için agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi kullanılan yöntemlerdendir. Elde edilen ürünün büyüklüğüne göre hazırlanmış agaroz konsantrasyonuna sahip jelle elektroforez gerçekleştirilir. DNA'nın çift ipliğine bağlanabilen UV altında floresans ışımaya yapan ve yüksek oranda mutajen olan EtBr (Etidyum Bromür) ile DNA'nın görünür hale gelmesi sağlanır. Çoğaltılan DNA'nın daha sonraki kullanım amacına göre EtBr jelle, yükleme solüsyonuna karıştırılabilir veya elektroforez sonrası jel EtBr'ün uygun konsantrasyonundaki solüsyonu içinde boyanabilir.

PCR ürünlerinin incelenmesinde kullanılan direkt olmayan metotlar arasında restriksiyon enzimi ile kesim analizi, SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"), TGGE ("Temperature Gradient Gel Electrophoresis"), DGGE ("Density Gradient Gel Electrophoresis"), direkt sekans analizi gibi yöntemler sayılabilir.

### **2.5.2 Floresan İn Situ Hibridizasyon:**

FISH; nükleik asit dizilerine özgül floresan işaretli DNA probları ile hedefin işaretlenmesi ve floresan mikroskobunda görüntülenmesi prensibine dayanan bir yöntemdir.

FISH tekniği DNA ve RNA nükleik asit dizilerinin sitolojik preparasyonlarda görülebilmesine olanak sağlayan bir yöntem olup, sitogenetik ve moleküler genetik arasında bir köprü oluşturmaktadır. FISH tekniği özgül DNA propları kullanılarak kromozomal değişiklikleri incelemeye olanak verir. FISH yönteminin avantajı hem bölünen hem de interfaz hücrelerinde kullanılabilmesidir. İnterfaz amniyositlerin FISH analizi, en yaygın görülen anöploidilerin hızlı taraması için kullanılan rutin bir metottur (*Pergament et al, 2000*).

Aslında DNA'nın çift sarmal yapısı normal koşullarda stabildir, ama ısı ve formamid gibi bazı maddelerle etkileşimi sonunda sabit yapı bozularak iki DNA ipliğini bir arada tutan hidrojen bağları kopmakta ve tek zincir haline gelmekte, eski koşullar yerine getirildiğinde iki iplikçiğin hidrojen bağları birbirine bağlanmaktadır. FISH'in temel özelliği işte bu DNA'nın komplementerini oluşturma özelliğine dayanır (*Başaran, 1996*). FISH, kişisel kromozom bölgelerine tamamlayıcı olan, floresan boyalı tek zincir DNA segmentlerini kullanır. Bu proplar örnekteki hedef DNA sekanslarıyla hibridize olur ve interfaz nükleuslarında floresan mikroskopla teşhis edilebilir. Anöploidi taramasında, floresan boyalar tarafından yayılan ışık sinyalleriyle, sayısal anomalilerde en yaygın etkilenen kromozomlar sayılabilir. Fetal hücrelerin nükleusları floresan mikroskopla analiz edildiği zaman; analiz edilen kromozomların her biri için bir nokta, yani normal şahıslarda iki nokta görüntülenir. Ekstra bir noktanın varlığı trizomileri gösterirken, bir noktanın yokluğu monozomiyi gösterir (*Trask et al, 1991; Dudarewicz et al, 2005*).

FISH'le anöploidilerin prenatal tanısında kullanılan DNA problemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

- Sentromerik alfa satellit sekanslar gibi, ardı ardına tekrarlayan insan DNA sekanslarından oluşan problemler; anöploidileri tanımlamak ve küçük belirleyici kromozomların kökenini teşhis etmek için kullanılırlar.
- Tek sekans problemleri, genomdaki küçük bölgelerin tanınması için kullanılır. Bu bölgeler belli sendromlarda eksik (delete) ya da iki kat artmış (duplicate) olabilir ve genellikle konvensiyonel sitogenetikle görülmez (Williams sendromu, Di George sendromu gibi). Ultrasonografide mikrodelsiyon sendromlarıyla ilgili belirti görüldüğü zaman bu problemlerin kullanılması endike olabilir.

İnterfaz hücrelerinin FISH ile analizi hücre kültürüne ihtiyacı ortadan kaldırır ve tüm sitogenetik değerlendirmeden önce başlangıçta hızlı bir tarama sağlar, böylece tanı için gerekli zamanı azaltabilir (*Dudarewicz et al, 2005; Ward et al, 1993*). Fakat bu teknik nisbeten emek yoğun olup, sağlam hücreler ve teknik uzmanlık gerektirir. Ayrıca dengeli yeniden düzenlenmeleri ve kullanılan prob setine tamamlayıcı sekanslardan başka kromozomal segmentleri içeren dengesiz bozuklukları tespit edemez. Gerçekte, yüksek riskli bir toplumda FISH'le doğru olarak tanı konan kromozomal anomalilerin oranı %65 kadar düşüktür (*Evans et al, 1994*). Prenatal olarak tanı konabilen major anöploidiler 13, 18, 21 otozomal kromozomlar ile cinsiyet kromozomlarını içermekte, ancak diğer anöploidiler, mozaiklik ve yapısal anomaliler FISH ile tanımlanamamaktadır. Ayrıca dişi fetuslarda maternal kontaminasyonu açıklayamaması, maliyetinin yüksek olması, daha fazla örnek gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir (*Mansfield et al, 1993; Pertl et al, 1994, 1997, 1999; Toth et al, 1998; Verma et al, 1998*).

### **2.5.3 Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

#### **2.5.3.1 Tanım ve Genel Bilgi:**

QF-PCR floresan işaretli primerler kullanarak kromozom spesifik polimorfik mikrosatellit belirleyicilerin çoğaltılmasını, bunu takiben spesifik kromozom materyalinin kopya sayısı ve/veya düzensizliklerini belirlemek için bir genetik analizörde ürünlerin kantitatif analizini içerir (*Elles et al, 2004*;

*Dudarewicz et al, 2005; Nicolini et al, 2004*). Bu yaklaşım ilk olarak monozomi X'in tanısı için kullanılmış, sonra bazı yaygın trizomilerin teşhisini kapsayacak şekilde değiştirilmiştir. QF-PCR, DNA'yı esas alan hızlı anöploidi araştırmalarında en yaygın kullanılan tekniktir. Nitekim pek çok çalışma bu metodun klinik faydalarını göstermiştir (*Eiben et al, 1999; Findlay et al, 1998; Levett et al, 2001; Hu et al, 2004*).

Anöploidilerin teşhisi için STR'lerin QF-PCR analizini ilk kez Mansfield (*Mansfield et al, 1993*) kullanmıştır. Bundan sonra Avrupada bir kısım laboratuarlarda anöploidilerin hızlı prenatal tanısında da başarıyla uygulanmıştır (*Verma et al, 1998; Pertl et al, 1999; Schmidt et al, 2000; Cirigliano et al, 2001; Levett et al, 2001; Mann et al, 2001; 2004*). Bu metotla, allellerin amplifikasyon ürünlerinin floresan yoğunluk oranları kullanılarak kromozom 21 üzerindeki STR lokuslarının allel sayısı analiz edilir (*Celi et al, 1994*).

QF-PCR analizi için 0,5–4 ml ya da örneğin 1/10'u kadar amniyon sıvısı alınması tavsiye edilir. Özellikle erken gebelik haftalarında ve örneğin az olduğu durumlarda karyotip analizini tehlikeye atacak kadar fazla miktarların alınması tavsiye edilmez (*Mann et al, 2005*). Nitekim QF-PCR ile hızlı sonuç çıkarılırken, kültüre hücrelerin mevcut olduğu tüm vakalarda tam karyotip analizine devam edilir.

### **2.5.3.2 Avantajları**

Birçok çalışma QF-PCR'ın güvenilir, kesin, güçlü ve mozaik olmayan trizomi 13, 18, 21 ya da triploidiler için yanlış tanı riski olmayan bir teknik olduğunu kanıtıyor (*Ogilvie et al, 2005*). FISH analizi ile karşılaştırıldığında QF-PCR'ın klinik uygulaması, seçilmiş major kromozom anomalilerini teşhis edebilmesi açısından aynı sınırlamalara sahiptir. Fakat klinik kullanılabilirliğini artıran birkaç avantajı vardır (*Mann et al, 2004; Cirigliano et al, 2001; Schmidt et al, 2000*). En büyük avantajı, testin çok duyarlı olması ve hızlı yapılabilmesidir (*Adinolfi et al, 1997; Chen et al, 2000; Yoon et al, 2002*). Floresan primerlerle PCR amplifikasyonu hibridizasyondan daha duyarlıdır ve çok küçük miktarlarda DNA ile çalışılıyorsa aynı zamanda daha güvenilir ve tekrarlanabilir (Sherlock et al, 1998). Analiz için 1–2 ml kültüre edilmemiş

amniyon sıvısı yeterlidir (*Bryndorf et al, 1997*). FISH analizi ise genellikle 2–5 ml amniyon sıvısı gerektirir (*Eiben et al, 1998; Jalal et al, 1998*). Test için az bir hacme ihtiyaç duyulması QF-PCR'ı, yavaş üreyen veya kontamine sitogenetik kültürler gibi, daha önce hızlı tanı planlanmamış vakalarda da uygulanabilir kılar. Etkinliği gebelik haftasından etkilenmez (*Cirigliano et al, 2001; Pertl et al, 1999*).

Gebelik sonlandırılmasında yasal sınırlara yakın olan ya da sonraki klinik uygulamalar için karar verilmesi gereken ileri gebelik haftasındaki vakalarda, kromozom 21'in hızlı analizi büyük öneme sahiptir (*Valero et al, 1999*). Günümüzde hızlı karyotipleme FBS ve plasenta biyopsisi ile yapılmaktadır. Ancak bu durumlarda fetal kayıp riski arttığından, trizomi 21'in hızlı prenatal tanısı için QF-PCR daha güvenilir bir alternatif olabilir (*Pertl et al, 1999; Valero et al, 1999*). İşlemin otomasyonu tek bir teknisyenin sekiz saatte 20–40 örneği birlikte çalışmasını ve sonuçların bir gün içinde elde edilmesini kolayca sağlamıştır (*Schmidt et al, 2000; Lee et al, 2004; Valero et al, 1999*). Multikapiller DNA sekans cihazının olması, kullanılan donanımına bağlı olarak 96 örneğin oldukça düşük bir maliyetle ve eş zamanlı çalışmasını mümkün kılar (*Adinolfi et al, 2000; Cirigliano et al, 2004; Mann et al, 2001; Verma et al, 1998; Pertl et al, 1999*). Hatta, acil hastalarda örnek alımını takiben 5 saatten daha az sürede sonuç alınan çalışmalar bildirilmiştir (*Cirigliano et al, 2001*). FISH tekniğinde ise bu mümkün değildir; minimum 6 saat süren bir harvest protokolü ve hibridizasyondan sonra (*Jalal et al, 1998*), her bir FISH analizi ortalama yarım saat süren yoğun bir mikroskopik işlem gerektirir (*Schmidt et al, 2000*). FISH analizinin emek yoğun ve zaman alıcı bir teknik olması, fazla sayıda örnek için uygulanmasını da kısıtlamaktadır.

Birkaç grup, maternal kan kontaminasyonunun FISH'le anöploidi teşhisinde problem teşkil ettiğini göstermiştir (*Bryndorf et al, 1997; Eiben et al, 1998; 1999*). Yüksek derecede polimorfik STR belirleyicilerinin kullanımı, maternal hücrelerle kontamine olduğu düşünülen örneklerin test edilmesine olanak sağlar. Schmidt (*Schmidt et al, 2000*) kontamine olduğu düşünülen örneklerin %98,7'sinde anormal bir STR paterni bulmamıştır. Buna göre kanlı amniyon sıvı örneklerinde potansiyel bir yanlış tanı riskinin QF-PCR'la çok

düşük olduğu, böylece kromozom anomalilerinin teşhis edilme oranının arttığı görülmektedir-ki bu, yöntemin etkinliği ve sonuçta klinik kullanılabilirliği için en önemli faktördür. Bundan başka, kontamine vakalarda fetal ve ilgili maternal kan örneğinde STR profillerin eş zamanlı analizi bize geçerli ve kesin bir bilgi sağlayarak, bu tekniğin tanısal değerini güçlendirecektir. Böylece maternal hücre kontaminasyonunun elimine edilmesinde doğru bir yorum yapmak mümkün olacaktır (*Yoon et al, 2002; Pertl et al, 1999*).

QF-PCR tekniği gerçek mozaiklik ile in vitro kültür şartlarından kaynaklanan yalancı-mozaikliğin ayırımını yapmadaki zorluğu giderir. Düşük seviyede mozaikliği teşhis edebilir (*Chen et al, 2000*). Ayrıca, anne kanından elde edilen fetal nukleuslu eritrositlerin DNAsı gibi, küçük miktarlardaki genetik materyalden analiz yapılmasında da kullanılabilir (*Samura et al, 2001*).

FISH, anöploidilerin rutin analizi için ilk seçim olabildiği halde, tüm kromozom bölgelerini içeren farklı proplar kullanılmadıkça, parsiyel anöploidiler fark edilmeyebilir. Moleküler veriler ise kromozomal kırılma noktalarını FISH'le olduğundan daha hızlı, ve konvensiyonel sitogenetikle kıyaslandığında daha kesin olarak ayırt etmeye olanak sağlar (*Valero et al, 1999*). Farklı kromozom 21 bölgelerini kapsayan birkaç seçilmiş belirleyicinin kullanımı parsiyel trizomilerin teşhisini de mümkün kılar (*Valero et al, 1999; Bryndorf et al, 1997; Chen et al, 2000; Cirigliano et al, 2004*). Bir çalışmada 21. kromozomun tamamen q kolunda yerleşik 25 belirleyiciyle parsiyel trizomi 21 ve monozomi 21'ler araştırılmıştır (*Valero et al, 1999*).

Amniyon sıvı örneklerinde ileri gebelik haftalarında FISH analiziyle elde edilen yüksek uninformatif oranlar (*Bryndorf et al, 1997; D'Alton Valero et al, 1999; 1997; Cirigliano Valero et al, 1999; 2001*) QF-PCR'la elde edilmemiştir. Pertl, ileri gebelik haftasındaki (>28 hafta) 12 örnekte yaptığı QF-PCR analizinin tamamını informatif bulmuştur. FISH'le oldukça yüksek oranlarda uninformatif sonuç elde edilmesinin sebebi tam olarak bilinmemektedir; ileri gebelik haftalarında amniyon hücrelerindeki artmış kromatin yıkımıyla ilgili olabilir. QF-PCR analiziyle, ileri gebelik haftalarında daha yüksek oranlarda informatif sonuçlar alınmıştır (*Pertl et al, 1999*).

QF-PCR kesin sonuç için saf kantitatif ölçümlere daha az ihtiyaç duyan, yarı-kantitatif bir testtir. Değerlendirilmesi kolaydır ve etkinliği gebelik yaşından etkilenmez (*Chen et al, 2000*). Bu gibi yaklaşımlar, anöploidilerin ana-babaya ait kaynağını ve mayoz- I ve ya mayoz- II'deki genetik oluşumunu eş zamanlı olarak tespit edebilir (*Adinolfi et al, 1997; Valero et al, 1999; Chen et al, 2000; Yoon et al, 2002; Dudarewicz et al, 2005*). Ayrıca STR profillerinin analizi, ikiz gebeliklerde zigozitenin değerlendirilmesini de mümkün kılar (*Chen et al, 2000*).

Maliyetinin düşük olması, sitogenetik analiz tamamlanmadan önce ebeveynin endişesini azaltmak için, bir ilk girişim olarak düşük riskli gebeliklerde de uygulanmasını mümkün kılar (*Cirigliano et al, 2001; Verma et al, 1998*).

### **2.5.3.3 Dezavantajları**

Şimdiye kadar, STR temelli strateji, anöploidilerin moleküler araştırmalarında seçilen metot olmuştur. Ancak bu metodun birkaç dezavantajı da vardır; en büyük sorun bilgi verici bir polimorfizme olan ihtiyaçtır. Çoklu sekanslar kullanılırken bile bazı hastalarda bilgi verici sekanslar bulunmayabilir. Polimorfik lokuslar farklı toplumlarda farklı sıklıkta görüldükleri için, bir toplumda optimal olduğu bulunan polimorfizmler başka birinde etkisiz olabilir (*Slater et al, 2003*). Bu sebeple QF-PCR, hedeflenen kromozoma özgül dizayn edilmiş bir belirleyici seti geliştirmeyi gerektirir (*Mann et al, 2001*).

Testin diğer bir dezavantajı, polimerazın adenin dizisi eklemesi yanlış uzunlukta ürünlere dolayısıyla yanlış tanıya yol açabilir. Bazı polimorfizmler bu hataya daha meyillidir ve genellikle daha iyi bir belirleyici ile değiştirilirler (*Dudarewicz et al, 2005*). Tetranükleotid tekrar belirleyicileri PCR'la üretilen stutter bantları en aza indirmek için kullanılır (*Elles et al, 2004*).

QF-PCR metodu, yalnızca seçilmiş kromozom anomalilerini tespit edebilmesi yönüyle FISH'le aynı sınırlamalara sahiptir (*Cirigliano et al, 2001*). Ayrıca, inversiyonlar, gizli translokasyonlar, küçük duplikasyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar gibi bazı güç fark edilen yapısal kromozom anomalilerini

teşhis etmede yetersiz olabilir (Lee et al, 2004; Levett et al, 2001; Chen et al, 2000; Schmidt et al, 2000).

Bu teknik sonuçların değerlendirilmesi için özel bir yazılım gerektirir (Mann et al, 2001).

#### 2.5.3.4 Güvenilirliği

Nicolini (Nicolini et al, 2004) prenatal tanıda kromozom anomalilerinin teşhisinde QF-PCR'in doğruluğuna dair 2004'e kadar yapılan çalışmaları gözden geçirmiştir. Tablo 4'te şimdiye kadar yayınlanan ve Medline'da yer alan bu çalışmalardan trizomi 21'e ilişkin sonuçları göstermektedir. 13 seriden ikisi yayınlanmamış ancak Hulte'n (Hulte'n et al, 2003) kişisel iletişimiyle alıntı yapmıştır ve Curcio et al. serisi ise yalnızca 2004'te Avrupa İnsan Genetik Konferansı'nda sunulmuştur. Tüm örneklerde QF-PCR, altın standart olarak görülen konvensiyonel sitogenetik analizle kombine olarak kullanılmıştır. QF-PCR farklı fetal dokularda (amniyon sıvısı, koryonik villüsler, fetal kan ve gebelik sonlandırılmalarından sonra elde edilen fetal dokular) uygulanmıştır. Prenatal örneklerden çoğunda DNA miktarının az olması testin esas sınırlamalarından birini oluşturur. Ancak son zamanlarda, analiz edilen kromozomların her biri için çoklu ("multiplex") PCR kurularak örneklerin araştırılabilmesi çalışmanın sınırlamalarını elimine etmiştir (Andonova et al, 2004). Böylece başlangıçtaki ardışık tek PCR'lara kıyasla analiz zamanında ve maliyetinde daha çok azalma sağlanmıştır.

Tablo 4'de yer alan 13 çalışmada toplam 22504 örnek gözden geçirilmiştir. Seçilmiş kromozomların (13, 18, 21, X ve Y) anöploidilerinin QF-PCR'la teşhis oranları %98,6 bulunmuştur. Trizomi 21'li olgular arasında bu oranın %99,5 (548/551) olduğu görülmektedir. Yanlış negatiflik oranı cinsiyet kromozom anomalilerinde diğerlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Nicolini et al, 2004).

Dengesiz yapısal anomali içeren dokuz kromozomdan dördü teşhis edilebilmiştir. QF-PCR; dört halka ("ring") kromozomu (ikisi kromozom 21, ikisi kromozom 18) ve kromozom 21'e ait bir tane dengesiz translokasyonu teşhis edememiştir. Mozaikliklerin yalnızca %45'ine (anormal hücre oranınının %30'dan fazla olduğu örnekler) doğru olarak tanı konmuştur.



**Tablo 4:** QF-PCR'ı kullanarak trizomi 21'in prenatal tanısına ilişkin çalışmaların sonuçları.

Referans	Kullanılan belirleyici sayısı	Teşhis edilen trizomi 21 sayısı / Gerçek trizomi 21 sayısı
Verma et al, (1998)	2-3	32/33
Pertl et al, (1999a)	4	15/15
Pertl et al, (1999b)	4	2/2
Schmidt et al, (2000)	3	5/5
Levett et al, (2001)	6	57/57
Voglino et al, (2002)	1	110/110
Bili et al, (2002)	5	11/13
Mann et al, (2003) (quoted in Hulte'n et al, 2003)	2-4	189/189
Cirigliano et al, (2003) (quoted in Hulte'n et al, 2003)	1	58/58
Leung et al, (2003)	1	24/24
Curcio et al, (2003)	4	26/26
Andonova et al, (2004)	4	8/8
Quaife et al, (2004)	4	11/11
Total		548/551 (%99,46)

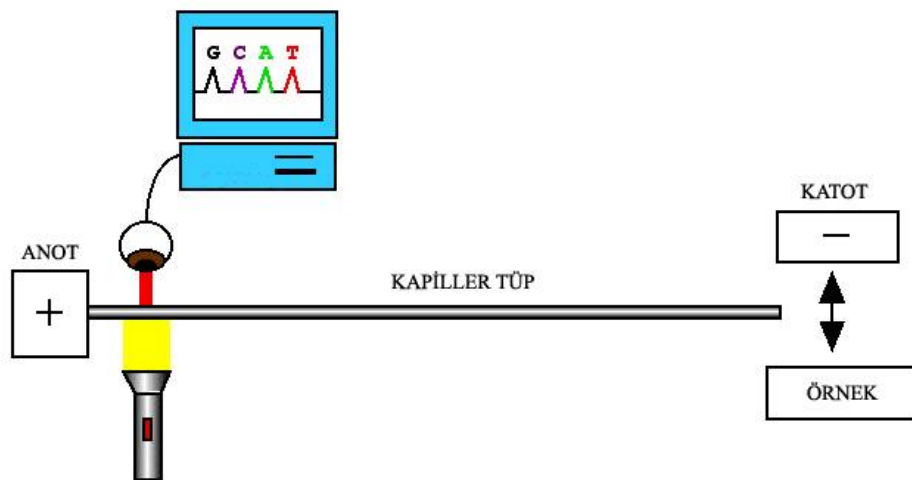
Pek çok çalışma QF-PCR'la sonuç elde etmedeki başarısızlık oranlarını bildirmemişlerdir. QF-PCR'ın tek başına kullanılmasıyla, test edilemeyen kromozomlar arasında klinik olarak anlamlı kaç anomalinin gözden kaçtığını bildiren yalnızca birkaç çalışma (*Pertl et al, 1999b; Schmidt et al, 2000; Levett et al, 2001; Voglino et al, 2002; Leung et al, 2003; Andonova et al, 2004; Quaife et al, 2004*) vardır. Bu verilere göre 9189 örnek içinde 386'sında non-mozaik otozomal kromozomal anomali görülmüş ve bunların 26'sı teşhis edilememiştir. Bu; her 15 anormal karyotipten birinin ve analiz edilen 353

örnekten birinin tanısının gözden kaçtığı anlamına gelir. Bu oranlar muhtemel üç yorumu akla getirir: Öncelikle; bu çalışmalar ilk deneyleri içeriyordu, bu yüzden bazı hatalar yeni çalışmalara kıyasla daha az sayıda belirleyici kullanımıyla ilişkilendirilebilir. Diğer yandan, tekniğin daha az özelleşmiş merkezlere yayılmasından önce elde edilen bu veriler, doğruluğu daha üstün olan laboratuarlarda başlatıldı. Son olarak seçim kriterleri çalışmadan çalışmaya değişti. Başlıca yaş açısından riskli olan kadınları içeren serilerde, sayısal ve yapısal kromozom anomali oranının, ultrasonografik olarak fetal anatomik defekt belirlenmesini takiben test edilen kadınların çalışmalarından daha düşük olacağı (böylece QF-PCR'in doğruluğunun artacağı) kabul edilebilir. Ancak daha önceki çalışmalarda, özellikle CVS'de mozaiklik oranı daha yüksek olabilir (böylece QF-PCR'in doğruluğu düşer). Bu düşüncelere dayanarak, analiz edilen her örnekte ve/veya her anomalili doğumda klinik olarak anlamlı olan tanılarının oranı hakkında doğru bir yorum yapmak için bildirilen vaka sayısının hala çok az olduğu tartışılabilir (Nicolini et al, 2004).

Pek çok çalışmada; QF-PCR ile elde edilen sonuçların, altın standart olan sitogenetik karyotip analiz sonuçlarıyla büyük oranda tutarlı oldukları görüldüğünden, QF-PCR tekniğinin zaman kazandırdığı ve trizomi 21'in hızlı tanısı için kullanılabileceği önerilir (Hu et al, 2004).

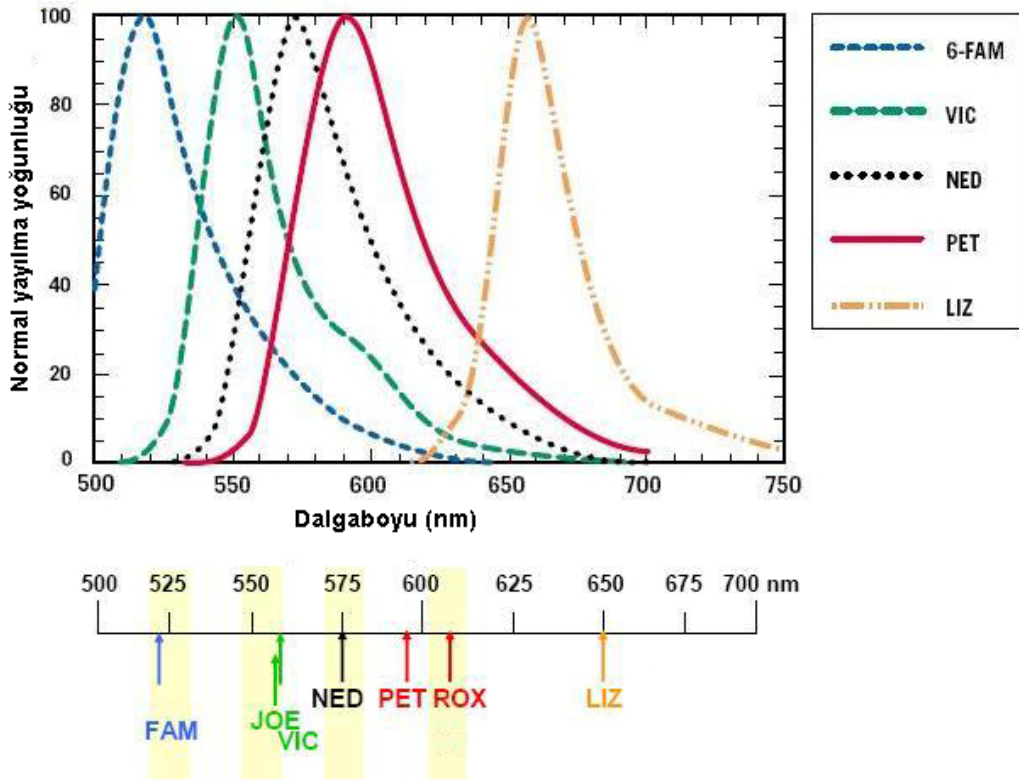
### 2.5.3.5 Analiz

Genescan analiz, PCR örneklerinin içerdiği belirli dizilerin miktarını ve boyunu karşılaştırmak için kullanılan kapiller elektroforez yöntemidir(Şekil-5).



Şekil 5: Kapiller elektroforez

Analiz için genetik analizörler (Applied Biosystems [ABI]) kullanılır. ABI 3730’da; Genescan analiz ile bir örnekten beş farklı boya için ölçüm almak mümkündür (6-FAM, VIC, NED, PET ve LIZ). Bu nedenle gönderilen örneklerin 6-FAM, VIC, NED ve ya PET ile işaretlenmiş olması gereklidir (Şekil-6). Aynı PCR reaksiyonunda bu dört floresan boya ile işaretli primerler, multiplex olarak kullanılabilir. Jele yüklenmeden önce, PCR ürünlerine deiyonize formamid ve “size standard” eklenir. Her bir jele floresan olarak işaretli 50–500 bp belirleyici yüklenir. LIZ boyası ise bu boyut belirleyicinin analizi için kullanılır. Böylece 500 baza kadar olan ampliconlar analiz edilebilir.



**Şekil 6:** Floresan Boyalar

Kapiller uzunluğu ve kullanılan polimerler cihazın modeline göre değişkenlik arz eder. PCR ürünleri kapiller boyunca yürürken ayrışır ve tekrar uzunlukları floresan pikler olarak görüntülenir. Boyut belirleyiciden

yararlanılarak bir standart eğri çizilir, örneklerin boyutu bu eğriye göre hesaplanır. Hesaplanan bu değerler gerçek değerden 3–5 bazlık farklılıklar gösterebilir. Bu durumda, eğer analiz boyut tespiti amacıyla yapılacaksa, standart eğri oluşturmak için, o çalışma için hazırlanmış boyutu bilinen PCR ürünlerinin boyut belirleyici olarak kullanılması önerilir. Diğer bir yöntem de sonuçların bir düzeltme faktörü ile çarpılarak düzeltilmesidir. Analiz, PCR ürününün miktarını belirlemek amacıyla yapılmışsa, kapiller elektroforez sonucunda oluşan piklerin altındaki alan ya da pik yüksekliği ölçülmelidir. Her bir örneğin analizi yaklaşık beş dakika sürer (*Elles et al, 2004; Blake et al, 1999; Grimshaw et al, 2003*).

STR ürünlerinin analizi için kullanılan genetik analizörün 2 bp allel çözünürlüğü ve pik alanı/pik yüksekliği ölçümü yapabilecek kapasitede olması gerekir. Daha fazla çözünürlük gerekliyse, POP6 polimer hem 310 hem de 3100 genetik analizörde kullanılabilir. Ancak bu durumda işlem daha uzun sürer. Hem elektroforetogram hem pik ölçümlerinin analiz edilmesi önerilir. Pik ölçümleri çizelgeye aktarılabilir. Verilerin kalitesini garantiye almak için en küçük ve en büyük pik yükseklik değerlerinin kullanılması önerilir. Bunlar genetik analizör'ün şartnamesi ile uyum içinde olmalıdır. Mesela ABI 3100 için, pikleri 6000 floresan ünitenin üzerinde olan belirleyicilerin analizin dışında tutulması önerilir. Eğer sürekli ve yaygın olarak gözlenen gürültü eğrileri varsa kişisel belirleyiciler başarısız olarak kabul edilir (*Mann et al, 2005*).

Serbest boya pikleri floresan moleküllerin işaretli primerlerden ayrılması sebebiyle oluşur. Bu moleküller, genellikle 180 bp büyüklüğe kadarki ana pikler olarak ayrılır ve böylece allel piklerinden ayırt edilebilirler. Serbest boya moleküllerinin ayrışması, fragment büyüklüklerine uygun olarak doğrusal değildir, fakat hem sıcaklıktan hem de ayırıcı matriksten etkilenir. -20 °C'de stoklanmış deiyonize formamidin kullanılmasıyla ve işaretli primerlerin -20 °C'nin yukarısındaki sıcaklıklara maruziyetini azaltmakla, floresan primerlerin yıkımı en aza indirilebilir. Allel pikleriyle çakışan serbest boya moleküllerini ayırtmak için farklı bir polimer kullanılmalıdır (*Elles et al, 2004*).

4000 floresan üniteden daha büyük allel pik yükseklikleri analiz edilmez. CCD ("charge coupled device") kamera bu sınırdan doymuş olur ve pik floresan bu değerin altında gibi gösterilebilir. Örnek aşırı yüklü ise, DNA konsantrasyonundaki farklılıklara uydurmak için ve amplifikasyona uygun olarak enjeksiyon süresi azaltılabilir. Bu, kapillere dayalı genetik analizörlerin avantajlarından biridir, çünkü tekrar bir enjeksiyon tekrar örnek hazırlığı gerektirmez (*Elles et al, 2004*).

### 2.5.3.6 Sonuçların değerlendirilmesi

Burada listelenen kriterler, karyotip analizi ile teyit edilmiş 1200 QF-PCR testine dayanır (*Elles et al, 2004*):

➤ Seçilen polimorfik sekanslar sınırlı bir döngü sayısında çoğaltıldıktan sonra, floresan işaretli PCR ürünleri elektroforez ile analiz edilir. Kopya sayısının kantitatif değerlendirmesi, elektroforetogramdaki özgül piklerin eğrileri altında kalan alanın hesaplanmasıyla yapılabilir (*Dudarewicz et al, 2005; Elles et al, 2004*). Allel oranlarını hesaplamak için pik alanı kullanılabilir gibi, pik yüksekliği ya da her iki ölçüm birlikte kullanılabilir. Ancak bir genetik analizörden elde edilen sonuçlar için pik alanı kullanılması önerilir. Çünkü bu seçim; geniş alan kaplayan alleller sebebiyle oluşacak pik bozukluklarını en aza indirir. POP4 matriksin kullanımı allel çözünürlüğünde azalma ile sonuçlanabilir. Bu vakalarda pik yüksekliği de ölçüme eklenebilir. Boyu daha kısa olan allelin alan/yüksekliğinin daha uzun olan alleline bölünmesi önerilir. Normal heterozigotlarda iki pikin floresan yoğunluklarının oranı 0,8–1,4 arasındadır (~1:1, dizomik). Trizomik bir hastada ise, 0,65'ten daha az ya da 1,8'den daha fazla (~1:2/2:1) oran gösteren iki pik (trizomik diallelik) ya da floresan yoğunlukları eşit (~1:1:1) üç pik (trizomik triallelik) görülür. Bu sonuçların tamamı bilgi verici ("informatif") olarak tanımlanır (*Elles et al, 2004; Mann et al, 2005; Pertl et al, 1994; Lee et al, 2004; Adinolfi et al, 1997; Yoon et al, 2002*). Triallelik trizomilerde, trizomi tanısı güvenilirdir. Bu oranlar ayrışmamanın mayoz-I'de olduğunu gösterir. Ebeveynlere ait kaynak ile, mayotik kaynağın teşhisi için, her iki ebeveynin QF-PCR analizi gereklidir (*Machatkova et al, 2005*).

Allel büyüklük heterojenitesi ve örnek cinsi ve kalitesindeki farklılıklar sebebiyle, testte diğer belirleyicilere kıyasla bir tek belirleyicinin amplifikasyonu büyük oranda değişebilir. Bu nedenle, kromozom kopya sayısının bir göstergesi olarak, belirleyiciler arasında allel pik alanlarının kıyaslanması tavsiye edilmez. Ayrıca, yalnızca tek bir lokustaki pik alanları karşılaştırılınca, allel dozaj oranları PCR'ın plato fazının etkilerine diğer dozaj testlerinden daha esnektir (*Elles et al, 2004; Lubin et al, 1991*).

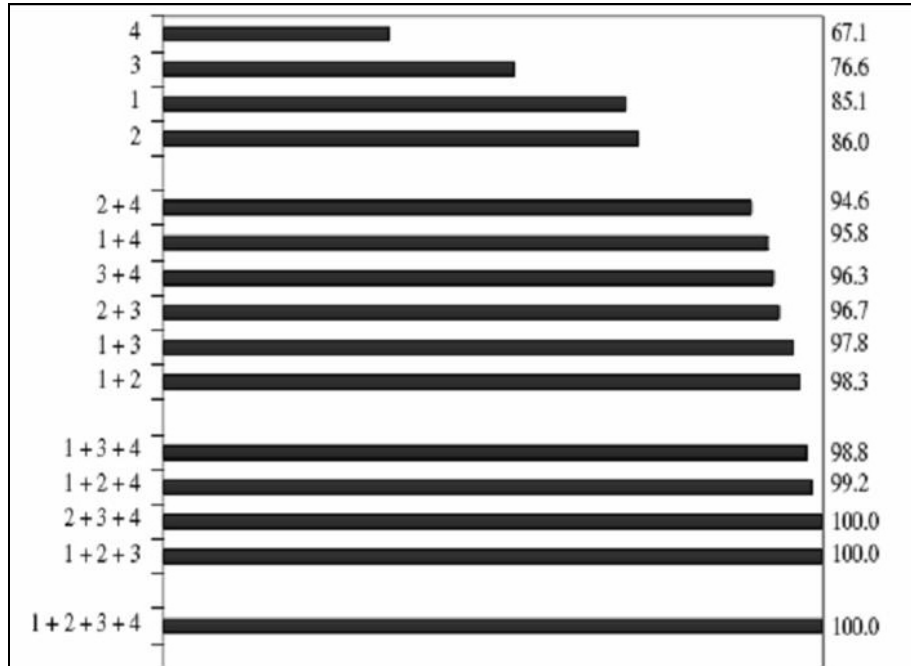
Belirleyici bilgi verici değilse, yalnızca bir pik gözlenir ve "uninformatif" olarak tanımlanır. Bu durum, aynı büyüklükte allel taşıyan iki ya da üç kromozomun varlığını gösterebilir. Böylece bu belirleyici ile normal bir örnek trizomik bir fetusunkinden ayırt edilemez ve bilgi verici, farklı bir allel kullanarak analizin tekrarlanması gerekir (*Dudarewicz et al, 2005; Elles et al, 2004*). Kullanılan STR belirleyici yüksek derecede polimorfik ise, bir pik veren yani homozigote gösteren örnek sayısı az olacaktır (*Pertl et al, 1994; Lee et al, 2004*). Normal örneklerin büyük çoğunluğu STR belirleyicilerin her biri için heterozigottur (*Yoon et al, 2002*).

Allel ayrılışlarına dayalı standart sapma ölçümleri, veri kalitesini değerlendirmek için ek bir analiz olarak kullanılabilir. Bu hesaplamalar allellerin yükseklik ve alan oranlarıyla kombine edilebilir (*Mann et al, 2005*). 24 bp'den daha fazlasıyla ayrılmış olan alleller için, allel oranı 1,5'e kadar normal kabul edilebilir Tetranükleotid tekrarlar kullanılıncaya normal sınırların geniş tutulması gerekir. Bunlar geniş bir alanda yerleşmiş allellerle sonuçlanabilir (50 bp uzaklığa kadar), ve daha küçük allellerin belirgin bir şekilde tercihli amplifikasyonu, çarpık allel dozaj oranlarıyla sonuçlanabilir. Ancak yakın yerleşmiş allellerin, daha az allele özgül tercihli amplifikasyon göstermesi gerekir ve 1,0'a daha yakın dozaj oranlarına sahip olması beklenir (*Elles et al, 2004; Dudarewicz et al, 2005*).

➤ QF-PCR sonuçlarını emin olarak değerlendirmek için, her bir kromozom için yüksek derecede heterozigoteye sahip en az iki informatif STR belirleyiciye ihtiyaç olmakla beraber, genellikle dört ya da daha fazla belirleyici kullanılır (*Andonova et al, 2004; Toth et al, 1998; Schmidt et al, 2000*) (Şekil-7). Bu, primer bölge polimorfizmleri ve/veya somatik tekrar

değişkenliğinin sebep olacağı yanlış tanı riskini en aza indirir (*Elles et al, 2004*).

Her bir kromozom için en az iki informatif sekans kullanarak nadir polimorfik STR duplikasyonları teşhis edilebilir. Bu vakalarda aynı kromozom için diğer tüm belirleyicilerde normal heterozigot profil izlenirken, bir STR için trizomik patern izlenmiştir. Aynı sonuç parsiyel trizomilere (dengesiz translokasyon gibi) bağlı da oluşabilir. Her iki ebeveynin aynı belirleyiciyle analizi nadir kalıtsal polimorfizmleri ayırt etmeye olanak sağlar. Mikrosatellitlerdeki submikroskobik duplikasyonları bulmak, bir tek informatif STR ile tespit edilen otozomal bir trizomiye rapor etmedeki risk hakkında da uyarıcı niteliğinde olabilir (*Machatkova et al, 2005; Cirigliano et al, 2001;2004*).



**Şekil 7:** Farklı STR belirleyicilerin birlikte kullanılması ile elde edilen informatif sonuç yüzdeleri (1-D21S11, 2-D21S1411, 3-D21S1270, 4-D21S1440) (*Andonova et al, 2004*'den alınmıştır)

Mann (*Mann et al, 2003*) %4.2 CVS örneğinde, hücrelerin yalnızca bir kısmında tek bir STR belirleyici için dengesiz triallelik patern göstermiştir. Bu, somatik de novo allel oluşumunun bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir. Cirigliano (*Cirigliano et al, 2004*) bu oranı %0,2 olarak gözlemlemiştir. Ancak,

her bir kromozom için birkaç STR belirleyiciyi kullanmakla, bu mutasyonların QF-PCR tanısını etkilemeyeceği vurgulanmıştır.

Bir sonucu anormal olarak değerlendirmek için, diğer tüm belirleyicilerin uninformatif olmasına karşı, triallelik genotiple uyumlu en az iki informatif belirleyici sonucu gereklidir. Yalnızca bir belirleyiciyle gösterilen bir sonucu anormal olarak değerlendirmek kabul edilemez. Bir sonucu normal olarak değerlendirmek için, diğer tüm belirleyicilerin uninformatif olmasına karşı, normal diallelik paternle uyumlu en az iki informatif belirleyici sonucu gereklidir. Ancak, sonuç normal diallelik patern gösteriyor ve diğer tüm belirleyiciler normal bir kromozom komplemanı ile uyumlu olarak uninformatifse, raporda sonucun tek belirleyici sonucuna dayandığı ve bu sonucun teyit edilmesi gerektiği belirtildiği takdirde, tek belirleyici sonuçlarını rapor etmek kabul edilebilir (*Mann et al, 2005; Machatkova et al, 2005*).

Bir kromozomal anöplödiye sahip olduğu bulunan örnekler için, sonucu interfaz FISH ya da karyotip analizi gibi başka bir teknikte teyit etmek de uygun olabilir (*Elles et al, 2004*).

➤ Allel oranları yukarıda verilen sınırların dışında kalan (0,65–0,80 arası ile 1,4–1,8 arasındaki değerler) belirleyiciler, trizomiyi göstermeyen extra piklere sahip herhangi bir belirleyici (pik alanlarının farklı olması gibi) ve sıradışı stutter bantlar gibi nadir özellikler sergileyen belirleyiciler 'yetersiz' ("inconclusive") olarak sınıflanır. Yetersiz sonuçlar genellikle tek belirleyici analizi kullanılarak tekrar test etmekle çözülebilir (*Elles et al, 2004; Mann et al, 2003*).

Primer bağlanma bölgesindeki polimorfizmler sebebiyle oluşan çarpık oranlar, PCR'ın bağlanma ("annealing") ısısını düşürmekle çözülebilir. Ebeveyne ait DNA'nın analizi de, özellikle primer bölge polimorfizmleri ve tekrar değişkenliğinin araştırılması için faydalı olabilir (*Elles et al, 2004*). İki bp ile ayrılan allelleri olan dinükleotid tekrar belirleyicilerinin analiz edilmemesi önerilir. Çünkü 'stutter' bantlar kısa boydaki allelle birleşip, allel oranlarını saptırabilir. İki bp'den daha fazlasıyla ayrılmış olan alleller için, hesaplama oranlarında stutter pik alanlarını içermesi kabul edilebilir. Tek kromozom için hem anormal hem normal allel paternleri elde edilirse,



devamında çalışma yapılmaksızın sonucu normal ya da anormal olarak değerlendirmek kabul edilemez. Bu sonuçlar; primer bağlanma bölgesi polimorfizmleri sebebiyle olabileceği gibi, somatik mikrosatellit mutasyonların göstergesi de olabilir (*Mann et al, 2003*), ya da parsiyel kromozom dengesizliklerini de (submikroskopik olabilir) gösterebilir (*Mann et al, 2005*).

## 2.6 STR Polimorfizmleri

Kısa tandem tekrarları ("Small Tandem Repeats", STR) olarak da bilinen mikrosatellit DNA'lar; hücrel fonksiyonları kodlayan DNA sekansları arasında dağıtılmış 1–6 bp'lik ardı ardına tekrarlayan DNA dizi kümeleridir. En sık mono ve dinükleotidlik tekrarlara rastlanılmaktadır (*Hearne et al, 1992; Wooster et al, 1994*). Genomun %0,5'ini teşkil eden ve yüksek polimorfizm gösteren CA ile %0,3'ünü teşkil eden AT tekrarları oldukça sık gözlenmekte iken GC tekrarları daha nadirdir. Genomun %0,2'sini oluşturan CT/AG tekrarları da sık görülmektedir ve ortalama her 50 kb'de bir izlenir. CG/GC tekrarları nadirdir (*Hearne et al, 1992*). Mikrosatellit diziler genetik haritalama, klonlama, klonite tayini, LOH çalışmaları ve kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir (*Keagle et al, 1999; Strachan et al, 1996; Vogel et al, 1997*). STR'ler günümüzde adli DNA testlerinde de en sık kullanılan DNA tipidir.

STR; kısa, tekrarlayan herhangi bir DNA sekansını tarif eden genel bir terimdir. Tam olarak bilinmeyen sebeplerle, en azından bazı STR lokusları için, tekrarlayan ünitelerin sayısı bir allelden diğerine değişir (*Utah Marker Development Group, 1995*). Mesela D21S1411 lokusunda bulunan "ATGG ATGG ATGG ATGG" DNA sekansı, dört bazdan ibaret tekrar motifine sahip (tetranükleotid tekrar) bir STR'dir. STR'nin uzunluğu gen transkripsiyonunu etkileyebilir ki bu da farklı fenotiplerin oluşması demektir (*Tran et al, 2004*). Bu nedenle STR'ler insan genomunda polimorfik belirleyiciler olarak anöploidilerin tanısında da yaygın bir şekilde kullanılırlar (*Yoon et al, 2002*).

PCR destekli STR tiplemesini anlamak için, böyle PCR'ların nasıl tasarlandığını kısaca gözden geçirmek faydalı olur: Promega ve PE, 'Applied Biosystem' test kitleri çoğunlukla farklı primerler kullanılırlar. Mesela upstream primer, çoğaltacağımız sekansın 100 baz yukarısındaki DNA'yı, downstream

primer de benzer şekilde daha aşağıdaki DNA'yı tanıyacak şekilde dizayn edilebilir. Primerlerin bu dizaynla daha ileri yerleştirilmeleri, STR'in yakınına yerleştirilen primerlerden daha uzun olan tüm STR allelleri (varyasyonlar) görünür kılabilir. Primerlerin bağlandığı yer, incelediğimiz bölgeyi tarif eder. O halde STR'lerdeki değişikliklere bağlı olarak, bu bölge kişiler arasında değişecektir (<http://www.biotechnology.uwc.ac.za>).

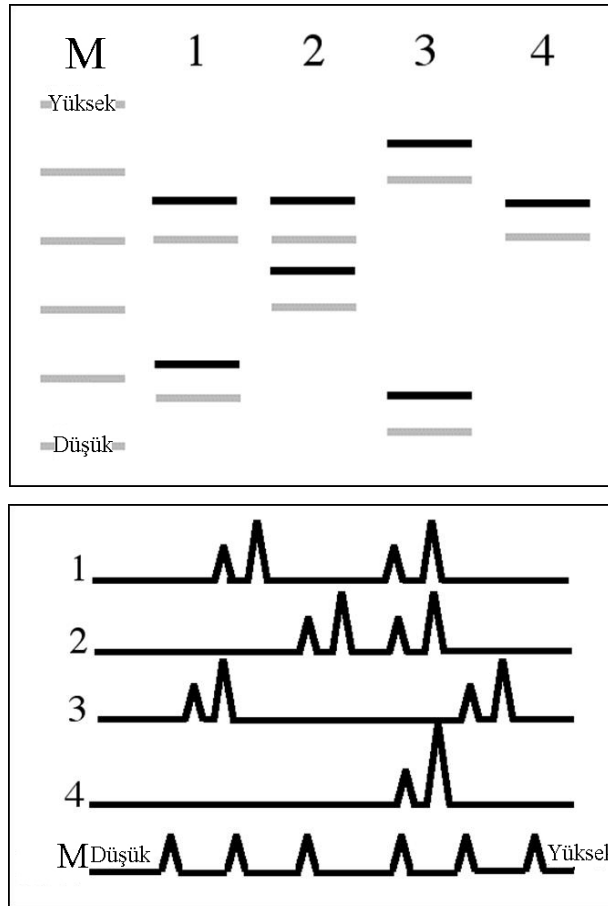
PCR'la kişiye ait STR'in pek çok kopyası elde edildikten sonra, bir elektroforetik jelde ürünler büyüklüklerine göre ayrılır. Jel düz olabilir ya da kapiller adı verilen ve bitiminde bir dedektör bulunan yuvarlak bir tüpte olabilir. Tipik düz jel "agaroz jel elektroforezi" başlığı altında kısaca anlatılmıştır. Tipik düz jel STR sonuçları şöyle görünür:

Siyah çubuklar bant olarak adlandırılır. Her bir bantta, PCR'la üretilen aynı büyüklükteki çok miktarda DNA molekülü toplanır. Jel daha küçük DNA moleküllerini, daha büyük olanlardan ayırır. Jelin sonuna yakın daha aşağıdaki bantlar, tepeye yakın olanlardan daha küçüktür (boyu daha kısa olan DNA fragmanleridir). Tek bir kişi için, her bir lokusta normalde iki allel vardır. Bu alleller farklı (heterozigot) ya da aynı (homozigot) olabilir.

STR'ler gölge ("stutter, shadow") bantlar adı verilen bir artefakta meyillidirler. Stutter bantlar; gerçek allel boyutundan daha küçük, 1–3 tekrar üniteleri olan çoğaltılmış sekanslardır (*Elles et al, 2004*). Bunların, PCR işlemi sırasında kaydedilenin dışındaki kaçak DNA tekrarları sebebiyle olduğu düşünülür. Bunlar, genellikle bir tekrar uzunluğunda esas banttan daha küçük, sahte PCR ürünleridir. Tekrarnükleotid alleller gözle görülür birkaç stutter bant gösterebilirler ve yalnızca esas allel piki işaretlidir. Ancak bazı mikrosatellit belirleyiciler (D21S1270 gibi) hem tetranükleotid hem de dinükleotid tekrarların bir karışımını içerir ve anlamlı stutter bantlar oluştururlar. D21S1270 gibi daha büyük alleller, muhtemelen daha uzun tekrarlar sebebiyle, daha küçük allellerden daha anlamlı stutter etkiler gösterirler. En azından ilk stutter piki ve içerdiği pik alanı ölçümünü anlamak gereklidir (*Elles et al, 2004*). Asıl problem; parlaklığı yoğun olan bantların, stutter sebebiyle mi yoksa bir karışımın varlığı sebebiyle mi olduğunu ayırt etmenin olanaksız kadar zor olmasıdır. Stutter bantlar tahminen esas banttan

daha aşağıda (daha küçük olduğu için) olması gerekirken, sıklıkla yaygın alleller ile hiza yaparlar (Şekil-8).

Günümüzde STR belirleme/tipleme planlarının bazıları, düz jellerin yerine kapiller adı verilen ince tüpleri kullanır. Kapiller kullanıldığı zaman, sonuçlar genellikle grafik üzerinde eğriler olarak gösterilir. Böyle grafiksel eğriler üzerinde, stutter bantlar daha küçük pikler olarak (solda) görünürken, her bir esas STR ürünü büyük bir pik olarak görünecektir. Bu eğri örüntüleri elektroforetogram olarak adlandırılır. Bu verilere sayısal veriler eşlik edebilir. Sayısal veriler; ölçülmüş her bir PCR ürününün, yoğunluğunu (pik yüksekliği) ve hesaplanmış allel büyüklüğünü gösterir. Sayısal veriler sonuçların kalitesini belirlemede önemli olabilir.



**Şekil 8:** Stutter bantların jel ve elektroforetogram görüntüleri

Yukarıdaki iki figür STR sonuçlarının sunulmasında bazı alternatif yollar olduğunu göstermiştir. Kullanılan donanıma göre, eğriler jel dışına çıkan bantların yerini veya jel içindeki yerleşimini gösterir. Daha büyük DNA

parçaları sağda ve daha küçük olanlar soldadır. Pik yükseklik oranları, stutter pikleri kolayca ayırt etmeye olanak sağlar. Piklerin ne kadar yüksek ya da ne kadar düşük olabileceği konusunda, eşik değeri ("threshold") adı verilen önerilmiş standartlar vardır. Bir bandın stutter sebebiyle olmadığını (ve böylece bir karışımın göstergesi olduğunu) düşünmek için eşik değeri laboratuara özgül olmakla beraber, genellikle yakınındaki büyük bandın %5-15'idir.

PCR'a dayalı test, çok küçük DNA miktarlarını çoğaltmanın günümüzde tek hızlı yöntemi olduğu için, potansiyel olarak faydalıdır. Ancak, PCR'a dayalı metodların kontaminasyona şiddetle duyarlı olduğunu ve aşırı dikkatle yorumlanması gerektiğini fark etmek önemlidir. Bazı STR tiplene sistemleriyle oluşturulan benzer olasılıklar aşırı derecede nicelik içerebilir, hatta mutlak bir sonuç izlenimi verebilir. Bilimsel katılık genellikle, laboratuvar hata oranları ve teknik sınırlamalar dahil test ettiği bütün yaklaşımları hesaba katan bir kontekste aşırı nicel bilginin yer almasını gerektirir (<http://www.scientific.org/tutorials/articles>).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Doku Örnekleri:

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Prenatal Tanı Laboratuvarına rutin olarak başvuran hastaların amniyon sıvıları kullanıldı. Ayrıca bu hastalar ile, aynı birime gelen bir CVS materyalinin kültüre edilmiş hücreleri ve daha önce trizomi 21 tanısı konmuş dört çocuğun kanları kullanıldı.

Prenatal Tanı Laboratuvarına başvuran 224 hastanın amniyon sıvısında total ve canlı hücre sayımı yapıldı. Bulunan değerler gebelik haftaları ve ön tanılarıyla birlikte kaydedildi.

Bir CVS, 130 amniyosit hücre kültürü olmak üzere 131 materyalin, karyotip analiz sonucu rapor edildikten sonra, kültüre edilmiş hücreleri ile, daha önce trizomi 21 tanısı konmuş dört çocuğa ait kan örneği DNA ekstraksiyonu için kullanıldı.

#### 3.2 Hücre Sayımı:

Amniyosentez laboratuvarına rutin olarak başvuran 142 hastanın 0,5 ml amniyon sıvılarından ve sitogenetik karyotip analizi tamamlanmış hastaların 25 cm<sup>2</sup> tek tabaka (monolayer) kültürlerinden (DNA elde edeceğimiz hücre sayısını belirlemek için) olmak üzere iki tip örnekten hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı hemositometre ile hücre sayımı protokolüne uygun olarak yapıldı:

##### ➔ Hücreleri Hazırlama:

##### ❖ Amniyon sıvısından:

- ✓ 20 ml amniyon sıvısı 10 ml'lik steril tüplere bölündü.
- ✓ Bu tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

✓ Santrifüjden sonra üst faz atıldı, üzerine 5 ml ortam kondu, iki tüpteki pelletler süspansede edildi ve birleştirildi.

✓ Homojenize iken 0,5 ml sayım için alındı.

❖ Kültürden<sup>1</sup>:

✓ Flasktaki tüm ortam çekildi.

✓ 3 ml Hank dengeli tuz çözeltisi (HBSS) (Ca, Mg'suz) ile yıkama yapıldı.

✓ Tüm çözeltiler flasktan çekildi.

✓ Önceden 37 °C'ye getirilmiş 1 ml Tripsin-EDTA flaska kondu.

✓ 37 °C'deki CO<sub>2</sub>'li etüvde 1–2 dk bekletildi.

✓ Hücrelerin yüzeyden ayrılması ters-bakışlı ("inverted") mikroskopta kontrol edildi.

✓ Flaskın içerisine 2 ml ortam eklenerek kalkan hücreler steril tüpe alındı (serum tripsin aktivitesini inhibe eder), 1.5 ml ortam ile ikinci kez flask yıkandı ve aynı tüpe kondu.

✓ Steril tüpe alınan tripsinli ortamdaki hücreler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

✓ Santrifüjden sonra üst faz atıldı, üzerine en az  $1 \times 10^6$  / ml hücre elde edecek kadar ortam kondu.

✓ Süspansede edilip bir mikrotüpe transfer edildi.

Kanser hücreleri ya da hücre hatları gibi hızlı çoğalan hücrelerle çalışıldığı zaman; santrifüjleme aşamasına gerek duymaksızın tripsinize monolayer, ortamla resüspansede edildikten sonra (yine en az  $1 \times 10^6$  / ml hücre elde edecek kadar ortamla resüspansede edilmeli) hücre sayımı için 0,5 ml örnek bir mikrotüpe alınır.

➡ Preparat Hazırlama:

✓ Lamın yüzeyi %70'lik alkolle temizlendi.

✓ Lamel de temizlendi ve sayım alanının üzerine kapatıldı (Lam üzerinde sayım alanının yanındaki sütunlar hafif ıslatılarak lamelin yapışması

---

<sup>1</sup> Amniositler gibi yavaş ve az üreyen hücrelerde bu protokol uygulanmasının nedeni, santrifüjden sonra 1 veya 2 ml gibi az besiyeri ile süspansede ederek ml'de en az  $1 \times 10^6$  hücre elde edebilmektir.

sağlanır. Lamelin tam oturup oturmadığı bu alanda oluşan gökkuşağı renklerinden anlaşılır).

➔ **Boya Hazırlama:**

✓ 0.4 ml trypan blue + 0.6 ml HBSS

➔ Önce 0,5 ml örnekten direk sayım yapıldı. Sonra bu örnek 600 g'de 5 dk santrifüj edilip üzerindeki 400 µl süpernatant atıldı. Kalan 100 µl'ye 100 µl seyreltik trypan blue ilave edildi (nihai seyreltme katsayısı 2/5 oldu). Hücre yoğunluğuna göre örnekler bazen 250 µl'ye konsantre edildi, bazen hiç konsantre edilmedi. Ancak her durumda örnekle eşit miktarda seyreltik trypan blue ilave edildi. Hesaplamalar da bunlara göre yapıldı. Herhangi bir kümeleşmeyi, yığılı önlemek, hücreleri dağıtmak için şiddetli pipetaj yapıldı<sup>2</sup>.

➔ Hücre süspansiyonu derhal hemositometre odacığının kenarına transfer edildi (10 µl) ve pipetten boşaltıldı<sup>3</sup>. Hemositometre iki odacıklı olduğu için pipet tekrar yüklendi ve 2. odacık dolduruldu (10 µl). Kapillarite ile lamelin altına çekildi.

➔ Preparat mikroskop aşamasına aktarıldı (Şekil-9).

✓ 10X objektif seçildi. Görebileceğimiz en geniş alan 3 paralel çizgi ile sınırlıdır ve bu alan 1 mm<sup>2</sup>'dir.

✓ Bu 1 mm<sup>2</sup> alandaki hücreler sayıldı. Sayımı kolaylaştırmak için bu alan 4X4 daha küçük alana bölünmüştür. Aynı hücreyi iki kez saymaktan kaçınmak için her bir karenin üst ve sol çizgileri üzerine gelen hücreler sayıldı, alt ve sağ çizgiler üzerine gelenler sayılmadı.

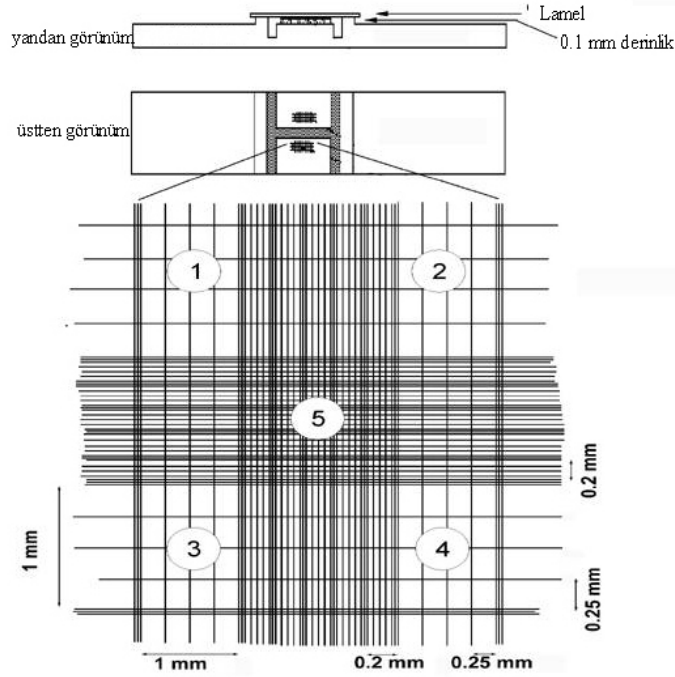
✓ Çok az hücre olunca (100↓/mm<sup>2</sup>) merkezi karenin etrafındaki kareler de (her biri 1 mm<sup>2</sup>) sayıldı. Ortalamaları alındı.

➔ Preparatın ikinci odacığında da aynı sayım yapıldı.

---

<sup>2</sup> Pastör pipetiyle çalışma hücre kaybına sebep olacağından mikropipetle örnek alınması tavsiye edilir.

<sup>3</sup> Hücreler tüpte ve pipette birkaç saniyede kümeleştikleri için, hızlı çalışılmalı.



**Şekil 9:** Neubauer Hemositometre

➔ Analiz:

✓ İki sayımın ortalaması hesaplandı ve  $c = \frac{n}{v}$  formülü kullanılarak örneğin konsantrasyonu bulundu. Burada:

$c$  → Hücre konsantrasyonu (hücreler/ml)

$n$  → Sayılan hücre sayısı

$v$  → Hesaplanmış hacim (ml)

✓ Düzeltilmiş Neubauer preparatı için odacığın derinliği 0,1 mm ve yalnızca merkezdeki 1 mm<sup>2</sup>'nin kullanıldığı farzedilirse  $v=0.1 \text{ mm}^3$ , ya da  $1 \times 10^{-4}$  ml. O zaman formül şöyle olur:

$$c = \frac{n}{10^{-4}} \text{ ya da } c = n \times 10^4$$

✓ Hücre konsantrasyonu yüksek ise ve yalnızca merkezdeki 1 mm<sup>2</sup> ile köşelerdeki kareler sayıldıysa (totalin 1/5'i) bu eşitlik şöyle olur:

$$c = n \times 5 \times 10^4$$

✓ Hücre konsantrasyonu düşük ise ve merkezdeki 1 mm<sup>2</sup> ile birlikte diğer 8 tane 1 mm<sup>2</sup> sayılmışsa (totalde 9 kare eder) bu ifade şöyle olur:

$$c = \frac{n \times 10^4}{9}$$



✓ Buradaki hesaplamalar ölçüm boyayla yapıldığı zaman dilüsyon oranıyla ve örneğin toplam hacmiyle çarpılarak total hücre sayısına ulaşılır.

✓ Bu prensipler doğrultusunda ml'deki hücre sayısını hesaplamak için kullanılan formüller aşağıda sıralanmıştır;

▪ Örnek 500 µl'den 100 µl'ye konsantre edilmişse;  $c = n \times 2 \times 10^4 / 5$

▪ Örnek 500 µl'den 250 µl'ye konsantre edilmişse;  $c = n \times 10^4$ ,

▪ Örnek hiç konsantre edilmemişse;  $c = n \times 2 \times 10^4$

✓ Elde ettiğimiz bu değer bize bir ml süspansiyondaki hücre sayısını verir. 20 ml amniyon örneğindeki total hücrenin 5 ml süspansiyonda olduğunu hatırlarsak bir ml amniyon sıvısındaki hücre sayısını bulmak için bulunan bu değer 5'le çarpılıp 20'ye bölünür.

Hemositometri sayımı ucuzdur ve bize saydığımız şeyi görme fırsatı verir.

Hücreler eşit hacimde bir viabilite boyası ile karıştırıldığı için burada aynı zamanda hücrelerin viabilite tespiti de yapılmıştır. Canlı hücreler boyasız ve şeffaf görünürler, etraflarında ışığı kıran bir halka vardır. Cansız hücreler boyayı aldıkları için trypan blue ile mavi görünürler ve refraktil halkaları yoktur.

Bu işlemde hataların çoğu yanlış örneklemeden ve hücrelerin odacığa transferinden kaynaklanır. Örnek almadan önce, hücre süspansiyonunun uygun bir şekilde karıştığından emin olunmalı ve odacığa transfer etmeden önce pipetin ucunda hücrelerin yapışmalarına ya da küme oluşturmalarına fırsat verilmemelidir.

### 3.3 Hücre Elde Edilmesi:

Karyotip analizi tamamlanmış 1 CVS ve 130 amniyon hücre kültürü olmak üzere 131 materyalin flasklarından aşağıdaki işlemlerle hücre pelleti elde edildi:

- Flasktaki tüm ortam çekildi.
- 3 ml Hank dengeli tuz çözeltisi (Ca, Mg'suz) ile yıkama yapıldı.
- Tüm çözeltiler flasktan çekildi.
- Önceden 37°C'ye getirilmiş 1 ml Tripsin-EDTA flaska kondu.

- 37°C'deki CO<sub>2</sub>'li etüvde 1–2 dk bekletildi.
- Hücrelerin kalkıp kalkmadı ters-bakışlı mikroskopta kontrol edildi.
- Flaskın içerisine 2 ml ortam eklenerek kalkan hücreler steril tüpe alındı. 1,5 ml ortam ile ikinci kez flask yıkandı ve aynı tüpe kondu.
- Steril tüpe alınan tripsinli ortamdaki hücreler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra üst faz atıldı, üzerine 1 ml ortam kondu, süspansiyon edilip bir mikrotüpe transfer edildi.
- Mikrosantrifüjde (Tablo–14) 600g'de 5 dk çevrildi.
- Süpernatant atıldı, elde edilen hücre pelleti DNA izolasyonu için kullanıldı.

### **3.4 Hücre Dondurma:**

Karyotip analizi tamamlanmış hastalardan Down sendromu tanısı konanların kültürlerinden 75 cm<sup>2</sup> flaska pasaj yapıldı. 25 cm<sup>2</sup> flaskadaki kültürden elde edilen hücre pelleti DNA izolasyonu için kullanıldı, 75 cm<sup>2</sup> flaskadaki kültürden elde edilen hücreler ise donduruldu. Bunun için önce dondurma ortamı hazırlandı:

- %10 DMSO (dimethyl sulfoxide)
- %40 Besiyeri (Bio AMF)
- %50 Serum (PBS)

Bunlar çalkalanmadan karıştırıldı. Sonra yukarıdaki işlemlerle dondurulacak hücreler elde edildi;

- Santrifüjden sonra üst faz atıldı, üzerine 1 ml dondurma ortamından kondu, süspansiyon edilip bir cryobox'a kondu.
- Cryobox önce 2 saat -20°C'de bırakıldı.
- Sonra -80°C'de stoklandı.

### **3.5 DNA İzolasyonu:**

Kültürlerden elde edilen hücre pelletlerinden ve dört hastanın kanından DNA izole edildi. Bunun için DNA izolasyon kiti (Bkz: 3–11) kullanıldı.

- Amniyositlerden DNA izolasyonu için kullanılan kit protokolünün optimizasyon çalışmaları ile modifiye edilmiş şekli aşağıdaki gibidir:

1. Uygun bir tüpe lizis tampondan aşağıdaki hacimde alındı:

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	200 µl	400 µl

2. Lizis tampona steril, çift distile su eklendi ve karıştırıldı:

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	200 µl	400 µl

3. Hücre pelletine bu çözelti eklendi ve şiddetli vortexlendi.

4. Proteinaz K eklendi ve 10 sn süreyle iki kez vortexlendi.

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	20 µl	40 µl

5. MGP tabletlerinden eklendi ve 10 sn vortexlendi.:

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	1 tablet	2 tablet

Hibridizasyon fırınında (Tablo–14) kendi sabit hızında 20°C'de 15 dk inkübe edildi.

6. Bir manyetik partikül ayırıcıda (Tablo–14) MGP 5 dk ayrıştırıldı ve süpernatant atıldı. Ayrılmış MGP, her ml'si 2µl RNaz içeren yıkama tamponunda pipetaj ile suspanse edildi.

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	0.5 ml	1 ml

15 dk 37°C'de inkübe edildi<sup>4</sup> ve MGP bir manyetik partikül ayırıcıda 5 dk ayrıştırıldı ve süpernatant atıldı.

7. Yıkama tamponu kullanılarak MGP iki kez yıkandı. Yıkama basamakları aşağıdaki gibi yapıldı:

Ayrılmış MGP tablodaki miktarda yıkama tamponuyla suspanse edildi:

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	0.5 ml	1 ml

Daha sonra MGP bir manyetik partikül ayırıcıda 5 dk ayrıştırıldı ve süpernatant atıldı.

<sup>4</sup> *İnkübasyon basamağından sonra tüpün kapağında damlacıklar olabilir, bu yüzden önceki yıkama için örneği taze bir tüpe transfer etmek tavsiye edilir.*

8. MGP aşağıdaki miktarlarda elüsyon tamponunda resüspande edildi:

Örnek miktarı	1x10 <sup>6</sup> hücre	2x10 <sup>6</sup> hücre
Volüm	100 µl	200 µl

Hibridizasyon fırınında kendi sabit hızında 70°C'de 30 dk inkübe edildi ve son olarak mikrosantrifüjde 12000 g'de 10 dk santrifüjleyerek MGP ayrıştırıldı ve süpernatant alındı.

➤ Kandan DNA izolasyonu için hastalardan ikişer ml kan alındı. Çalışma için 200 µl kullanıldı. Kullanılan kit protokolü ise aşağıdaki gibi uygulandı:

1. Uygun bir tüpe kan koyuldu ve 20 µl Proteinaz K eklendi. Pipetaj yaparak karıştırıldı.

2. 200 µl lizis tampon eklendi ve hemen 10 sn vortexlendi.

3. 1 tane MGP tableti eklendi, 10 sn vortexlendi. Hibridizasyon fırınında kendi sabit hızında 20°C'de 15 dk inkübe edildi.

4. Bir manyetik partikül ayırıcıda MGP 5 dk ayrıştırıldı ve süpernatant atıldı.

MGP, yıkama tamponu kullanılarak üç kez yıkandı. Yıkama basamakları aşağıdaki gibi yapıldı:

Ayrılmış MGP 0,5 ml yıkama tamponuyla süspande edildi. Sonra bir manyetik partikül ayırıcıda 5 dk ayrıştırıldı ve süpernatant atıldı.

5. MGP 100 µl elüsyon tamponunda resüspande edildi.

Hibridizasyon fırınında kendi sabit hızında 70°C'de 30 dk inkübe edildi ve son olarak mikrosantrifüjde 12000 g'de 10 dk santrifüjleyerek MGP ayrıştırıldı ve süpernatant alındı.

Elde edilen tüm DNA'lar -20°C'de stoklandı.

Kültürlerden elde edilen hücrelerden seri dilüsyonlar yapılması ve her bir dilüsyon örneğinden DNA izolasyonu yapılması hedeflenmişti. Ancak DNA izolasyon kit protokolü en az 1x10<sup>6</sup> hücreden izolasyona olanak tanıdığından bu dilüsyonlar gerçekleştirilmedi.

### 3.6 DNA İzolasyon Kontrolleri:

Örneklerdeki DNA miktarı ölçümü spektrofotometrede (Tablo–14) (260 / 280 / 320 nm’lerde) absorbans ölçümü ile belirlendi. 260 nm’deki absorbans (A260nm) ile 320 nm’deki absorbans (A320nm) arasındaki fark dilüsyon faktörü ve 50 µg/ml ile çarpılarak DNA derişimi hesaplandı. DNA’nın saflığı ise A260nm-320nm / A280nm-320nm oranı alınarak belirlendi. DNA izolasyonu için optimizasyon çalışmaları yapılırken bu oranın 1.8±0.1 olması hedeflendi.

İzole DNA’nın kırık olup olmadığının (intakt) ve/veya kırılma düzeyinin belirlenmesi amacı ile örnekler %1’lik 0,5 µg/ml EtBr içeren agaroz jelde 0.5xTBE (“Tris Buffer EDTA”) tamponunda 80 volt 25 amp sabit güçte 1,5 saat yürütüldü. Örnekler jele, 9 µl örnek 1,5 µl yükleme tamponu oranı ile yüklendi (Bkz: 3–11).

### 3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonları:

İzolasyonu ve agaroz jel elektroforezinde değerlendirmesi yapılan kalıp DNA’lar mikrosatellit belirleyici bölgelerine özgül floresan işaretli primer çiftleri ile PCR’a tabi tutuldu.

**Tablo 5:** Mikrosatellit belirleyicilerin karşılaştırması

Belirleyici	Yerleşim	Heterozigote	Tekrar	Boyut Aralığı (bp)
D21S11-F, -R	21q21.1	0.9	Tetra	225–280
D21S1411-F, -R	21q22.3	0.933	Tetra	256–340
D21S1270-F, -R	21q21-q22.1	0.83	Tetra	174–198
		0.86		285–340

Kullanılan her bir belirleyiciye ait PCR koşulları şu şekildedir:

#### **D21S1270 PCR:**

D21S1270 lokus amplifikasyonu için 187 bp bölgeyi sınırlandıran aşağıdaki primer dizisi kullanıldı (*GDB; Andonova et al, 2004; Mann et al, 2001*):

D21S1270 (F) 5’...TET-CCC ACT GTA TTA TTC AGG GC...3’

D21S1270 (R) 5'...ACA CAC ACA CAC ACA CAT GC...3'

Forward Primer yeşil renkli bir floresan boya olan TET ile işaretletirildi. D21S1270 primerleri için (Roche-TIB Molbiol, Germany) T<sub>m</sub> değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmış olup 60°C'dir (*Temizkan ve ark, Temizkan*):

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

D21S1270 forward ve reverse primerler 50 şer µl dH<sub>2</sub>O (Bkz: 3–11, DNaz RNaz free dH<sub>2</sub>O) ile sulandırılarak 100 µM (100 pmol/µl) konsantrasyonda ana stoklar hazırlandı. Buradan 25 µM konsantrasyonda ara stoklar hazırlanarak primer optimizasyonu için kullanıldı.

Primer optimizasyonu 25 µM, 15 µM, 10 µM miktarlar denenerek toplam 25 µl'lik hacimde yapıldı. Optimal annealing sıcaklığını ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunu bulmak için 55 °C, 57 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C ile 1 mM, 1.2 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> denenmiştir.

PCR aşağıdaki koşullar ve son konsantrasyonlarla gerçekleştirildi:

**Tablo 6:** D21S1270 için PCR Profili:

Sıcaklık	Süre	Aşama	Döngü sayısı
94°C	5 dk	İlk denaturasyon	1
94°C	35 sn	Denaturasyon	
57°C	35 sn	Tutunma	30
72°C	40 sn	Uzama	
72°C	5 dk	Son uzama	1

**Tablo 7:** D21S1270 için PCR'da kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları:

Bileşenler	Eklenecek Miktarlar	Son Konsantrasyon
10x PCR Tamponu	2.5 µl	1x
2 mM dNTP Karışımı	2.5 µl	200 µM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2 µl	1.2 mM
Forward Primer	0.4 µl	10 pmol
Reverse Primer	0.4 µl	10 pmol
Taq DNA Polimeraz (Fermentas)	0.2 µl	1 Unite
Kalıp DNA	1–4 µl	140–220 ng
dH <sub>2</sub> O	Tamamlayacak kadar	
TOPLAM	25 µl	

D21S1270 belirleyiciyi için optimize edilen bu koşullarda 1, 4, 9, 31, 38, 40, 43, 64 no'lu DNA örneklerinin PCR reaksiyonu kuruldu. PCR işlemi

otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan alette (Tablo–14, Thermal Cycler) yapıldı.

#### **D21S11 PCR:**

242 bp'lik D21S11 lokusunun amplifikasyonu için;

D21S11(F) 5'...ATATGTGAGTCAATTCCCAAG...3'

D21S11(R) 5'...6-TAMRA-GTATTAGTCAATGTTCTCCAG...3'

primerleri kullanıldı (*GDB; Schmidt et al, 2000; Pertlet al, 1996; Blake et al, 1999; Yoon et al, 2002*). Reverse primer kırmızı renkli TAMRA floresan boya ile işaretlidir. Primerlerin yukarıdaki formüle göre hesaplanmış Tm değerleri sırasıyla 62 °C ve 60 °C'dir.

D21S11 forward ve reverse primerlerin 100 µM (100 pmol/µl) konsantrasyonda ana stoklarını hazırlamak için sırasıyla 50 µl ve 44 µl DNaz RNaz free dH<sub>2</sub>O kullanıldı. Buradan yine 25 µM konsantrasyonda ara stoklar hazırlanarak primer optimizasyonu için kullanıldı.

Optimal annealing sıcaklığını ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunu bulmak için 50 °C, 58 °C, 60 °C ile 1.2 mM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> denenmiştir. Ayrıca denaturasyon ve annealing sürelerinde değişiklikler yapılarak D21S11 primer optimizasyonu aşağıdaki koşullarda ve ilk denaturasyon basamağından sonra hot start teknik uygulayarak sağlanabilmiştir:

**Tablo 8:** D21S11 için PCR Profili:

Sıcaklık	Süre	Aşama	Döngü sayısı
94 <sup>0</sup> C	5 dk	İlk denaturasyon	1
94 <sup>0</sup> C	35 sn	Denaturasyon	
58 <sup>0</sup> C	35 sn	Tutunma	30
72 <sup>0</sup> C	40 sn	Uzama	
72 <sup>0</sup> C	5 dk	Son uzama	1

**Tablo 9:** D21S11 için PCR'da kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları:

Bileşenler	Eklene Miktarlar	Son Konsantrasyon
10x PCR Tamponu	2.5 µl	1x
2 mM dNTP Karışımı	2.5 µl	200 µM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2 µl	1.2 mM
Forward Primer	0.4 µl	10 pmol
Reverse Primer	0.4 µl	10 pmol
Taq DNA Polimeraz (Fermentas)	0.2 µl	1 Unite
Kalıp DNA	0.4–6 µl	50–75 ng
dH <sub>2</sub> O	Tamamlayacak kadar	
TOPLAM	25 µl	

D21S11 belirleyici için optimize edilen bu koşullarda, tüm DNA örneklerinin PCR reaksiyonu kuruldu. Aynı şartlar hot start reaksiyon mixi (Bkz: 3–11) kullanılarak uygulandı. Ancak PCR ürünü elde edilemedi.

#### **D21S1411 PCR:**

D21S1411 primerleri ile 298 bp'lik amplifikasyon yapılmaktadır. Bu lokus için kullanılan primerler (*GDB; Cirigliano et al, 2001; Adinolfi et al, 1997; Sherlock et al, 1998; Schmidt et al, 2000; Pertl et al, 1996; 1997*):

D21S1411 (F) 5'...6-FAM-ATGATGAATGCATAGATGGATG...3'

D21S1411 (R) 5'...AATGTGTGTCCTTCCAGGC...3'

Forward primer mavi renkli 6-FAM floresan boya ile işaretlidir. Primerlerin 4(G+C) + 2(A+T) formülüne göre hesaplanmış Tm değerleri sırasıyla 60 °C ve 58 °C'dir.

D21S1411 forward ve reverse primerlerin sırasıyla 38 µl ve 50 µl dH<sub>2</sub>O kullanılarak 100 µM (100 pmol/µl) konsantrasyonda ana stokları hazırlandı. Buradan 25 µM konsantrasyonda ara stoklar hazırlanarak optimizasyon çalışmaları için kullanıldı.

D21S1411 primer optimizasyonu aşağıdaki 2 koşulda sağlanabilmiştir:

**Tablo 10:** D21S1411 için Master Mix ile PCR Profili:

Sıcaklık	Süre	Aşama	Döngü sayısı
94°C	10 dk	İlk denaturasyon	1
94°C	35 sn	Denaturasyon	
58°C	35 sn	Tutunma	30
72°C	40 sn	Uzama	
72°C	5 dk	Son uzama	1

**Tablo 11:** D21S1411 için Master Mix ile PCR'da kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları:

Bileşenler	Eklene Miktarlar	Son Konsantrasyon
10x Master Mix*	2.5 µl	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl	2 mM
Forward Primer	0.4 µl	10 pmol
Reverse Primer	0.4 µl	10 pmol
Kalıp DNA	1–4 µl	60–65 ng
dH <sub>2</sub> O	Tamamlayacak kadar	
TOPLAM	25 µl	

\*Master mix 10 mM MgCl<sub>2</sub> içermektedir.



Master mix ile optimize edilen koşullarda tüm örneklerle sonuç alınamadığından, kalan örneklerin PCR'ı aşağıdaki şartlarda ve hot start olarak kurulmuştur. Hot start PCR, reaksiyon duyarlılığını artırmak, özgül olmayan PCR ürünlerini azaltmak ve PCR verimini artırmak için kullanılabilen bir yöntemdir (Elles et al, 2004):

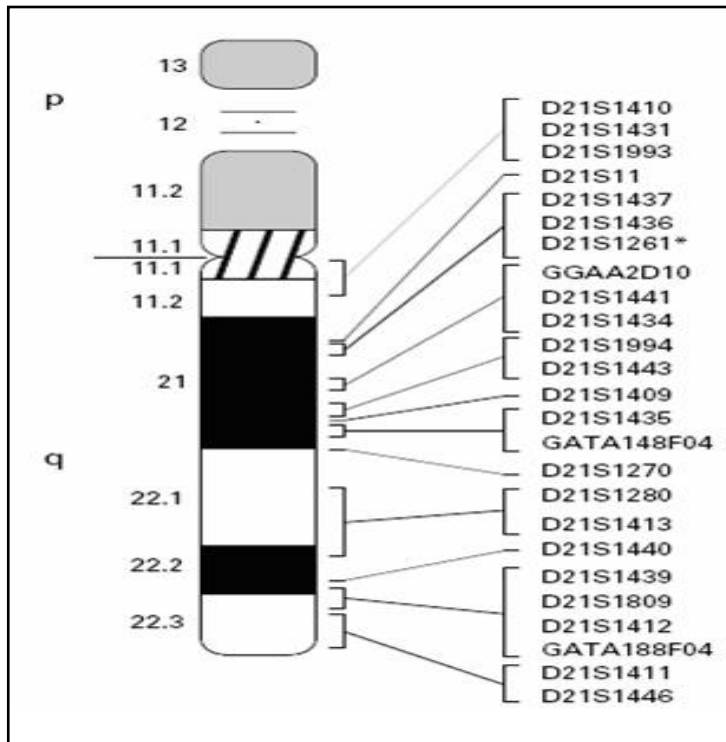
**Tablo 12:** D21S1411 için PCR Profili:

Sıcaklık	Süre	Aşama	Döngü sayısı
94 <sup>0</sup> C	5 dk	İlk denaturasyon	1
94 <sup>0</sup> C	35 sn	Denaturasyon	
58 <sup>0</sup> C	35 sn	Tutunma	30
72 <sup>0</sup> C	40 sn	Uzama	
72 <sup>0</sup> C	5 dk	Son uzama	1

**Tablo 13:** D21S1411 için PCR'da kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları

Bileşenler	Eklenecek Miktarlar	Son Konsantrasyon
10x PCR Tamponu* (Roche)	2.5 µl	1x
2 mM dNTP Karışımı	2.5 µl	200 µM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.5 µl	2 mM
Forward Primer	0.4 µl	10 pmol
Reverse Primer	0.4 µl	10 pmol
Taq DNA Polimeraz (Roche)	0.2 µl	1 Unite
Kalıp DNA	1-4 µl	60-65 ng
dH <sub>2</sub> O	Tamamlayacak kadar	
TOPLAM	25 µl	

\*10x PCR Tamponu 15 mM MgCl<sub>2</sub> içermektedir.



**Şekil 10:** Belirleyicilerin kromozom 21 üzerindeki yerleşimi (Valero et al, 1999'dan alınmuştır)

### 3.8 Agaroz Jel Elektroförez:

PCR ürünleri, 0.5xTBE (Bkz: 3–11) tamponu içinde, son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde EtBr içeren %2'lik agaroz jelde 80 volt 25 amp sabit akımda 20–25 dk yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğü UV transilüminatörde (Tablo–14) 100 bp ve son reaksiyonlarda 8–587 bp moleküler ağırlık belirleyici (Bkz: 3–11) kullanılarak doğrulandı.





### 3.9 Genescan Analizi:

Hücre sayımı, hücre kültürleri, DNA izolasyonu, DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri, PCR optimizasyonları, DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin agaroz jel elektroförez ile kontrolü DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'da yapılan D21S1411 belirleyicisine ait PCR ürünlerinin fragment analizi (GeneScan) "ABI PRİSM 3730xl Genetic Analyzer"de hizmet alımı şeklinde yaptırıldı (Macrogen, Seoul-Korea). Bu modelin filtre sistemi "Standard dye" olarak 6-FAM, VIC, NED, PET ve LIZ ile uyumludur. "Molecular Size Standard" olarak ise Genescan–120 (GS120) ve Genescan–600 (GS600) kullanılarak elektroförez sonuçları GeneScan Analiz Software'de analiz edildi.

### 3.10 İstatistiksel Analizler:

Araştırmamızda gruplar arasındaki farklılıklar SPSS 10,0 bilgisayar istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplardan en az birinde olgu sayısı <30 olduğu durumlarda parametrik olmayan yöntemlere başvurmak gerektiğinden (*Aksakoğlu, 2006*), istatistiksel analizlerde Kruskal Wallis Testi ve spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

Verilerimizde 14, 15, 19, 20, 21 ve 22. haftadaki olgu sayısı <30 olduğundan aşağıdaki dört parametrenin gebelik haftası ile ilişkisi Kruskal Wallis Testi ile değerlendirildi:

-  1 ml süspansiyondaki hücre (amniyosit) sayısı
-  1 ml süspansiyondaki canlı ("viable") hücre sayısı
-  Canlı hücre oranı
-  1 ml amniyon sıvısındaki hücre sayısı

Kruskal Wallis testi sonrasında iki sürekli değişken arasındaki bağintıyı (korelasyon) belirlemek amacı ile spearman korelasyon testi kullanıldı. Ölçüm değerleri sıra düzeneğine dönüştürülerek işlem yapıldı (*Aksakoğlu, 2006*); 14 ve 15. haftalar “15. hf≥” ve 20, 21 ve 22. haftalar “20. hf≤” şeklinde kategorize edildi.

### **3.11 Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Maddeler:**

- DNA izolasyon kiti: Roche (DNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow/Tissue, Cat No: 2 032 805)
- Hot start reaksiyon mixi: Roche (LightCycler FastStart DNA Master HybProbe, Cat. No. 03 003 248 001)
- Taq DNA Polimeraz Enzimi (5U/μl): Fermentas (Cat No: EP0402) ve
- Taq DNA Polimeraz Enzimi (5U/μl): Roche (Cat No: 11 146 165 001): PCR reaksiyonuna; 25 μl için 1 ünite olacak şekilde eklendi.
- 10X Taq Tamponu (MgCl<sub>2</sub>'siz) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> veya KCl'li: Fermentas (Cat No: EP0402) ve
- 10x PCR Tamponu (MgCl<sub>2</sub>'lü): Roche (Cat No: 11 146 165 001):  
PCR reaksiyonuna toplam hacimde 1X olacak şekilde ve primerlere uygun olarak (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'lı tampon kullanıldı. Bu tampon Taq Polimeraz enzimi ile birlikte üretici firma tarafından verilmiştir.
- dNTP'ler (100 μmol/ml): Fermentas (Cat No: T-R071, A-R0141, G-R0161, C-R0151):  
100 mM'lık her bir dNTP'den (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) 10 μl alındı (toplam 40 μl). Üzerine 460 μl steril distile su ilave edildi. Karışım 100 μl halinde tüplere bölünüp eksi 20<sup>0</sup>C'ye kaldırıldı. PCR reaksiyonunda bu stoktan (2mM dNTP) alınıp kullanıldı.
- 25 mM MgCl<sub>2</sub>: Fermentas (Cat No: EP0402):  
PCR reaksiyonu başına toplamda primere göre optimizasyonlar yapılarak 1 ila 4 mM arası eklendi. Bu çözelti Taq Polimeraz enzimi ile birlikte üretici firma tarafından verilmiştir.
- 8–587 bp moleküler ağırlık belirleyici: Roche (Cat No: 10 821 705 001)
- 100 bp moleküler ağırlık belirleyici: GeneMark (Cat No: GM100-LC)
- Yükleme Tamponu (Loading Buffer) 6X:

100 bp moleküler ağırlık belirleyici yanında üretici firma tarafından verilen (GeneMark, GM100-LC) tampon kullanıldı.

➤ DNaz RNaz free dH<sub>2</sub>O---Fermentas

➤ EtBr: Sigma:

20 mg/ml son konsantrasyonunda olacak şekilde 200 mg Etidyum Bromide çeker ocak içinde, yüksek izolasyon koşulları altında 10 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü.

➤ Agaroz: Promega (Cat No: V312A)

✓ %1'lik: 0.300 g agaroz 30 ml 0,5 X TBE içinde çözüldü.

✓ %2'lik: 0.600 g agaroz 30 ml 0,5 X TBE içinde çözüldü.

➤ 5X TBE Stok Tampon Hazırlanışı:

54 gr Tris-Base (Sigma, T-8524) ve 27,5 gr Borik Asit (Sigma, B-0394) tartılarak 800 ml distile suda çözüldü. Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8,0) (Sigma, E-5134) ilave edilerek bir litreye tamamlandı. Jel hazırlamada ve elektroforez tankına 0.5X TBE hazırlanılarak kullanıldı.

**Tablo 14:** Kullanılan Gereçler ve Markaları

<b>Gereç:</b>	<b>Marka:</b>
Spektrofotometre	Varian-Carry 50 Australya
Thermal Cycler	PTC-100, MJ Research
Güç kaynağı	ATTA-crospower 500
UV Transilüminatör	Eagle Eye
Elektroforez ekipmanı	Thermo, EC330
Hibridizasyon fırını	ATTO Hybridizer AB-1950
Mikrosantrifüj	Eppendorf Centrifuge 5417 R
Manyetik Partikül Ayırıcı	Boehringer Mannheim (Cat No:1858025)

#### 4. BULGULAR:

##### 4.1 Doku Örnekleri:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı prenatal tanı laboratuvarına 14 Mart–10 Ağustos 2006 tarihleri arasında rutin olarak başvuran 224 gebenin amniyon sıvılarında total ve canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Hastaların büyük çoğunluğu ileri maternal yaş (İMY) ve, ikili ve üçlü serum tarama testlerinde artmış trizomi 21 riski olmak üzere çeşitli ön tanılarla başvurmuş olup, endikasyonların tamamı hücre sayıları ve gebelik haftalarıyla beraber Ek–1’de verilmiştir. Gebelik haftalarına göre gelen vaka sayısı şu şekildedir:

Gebelik haftası	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Vaka sayısı	2	12	65	67	44	21	8	2	3

Dördü trizomi 21 (%1,79) olmak üzere, sekiz (%3,57) hastada anomali saptandı. Ayrıca hastalardan üçünde (%1,34) ikiz gebelik mevcuttur.

##### 4.2 İstatistik Sonuçları

###### 4.2.1 Kruskal Wallis Testi Sonuçları:

Birim hacimdeki total ve canlı hücre sayıları ile canlı hücre oranının gebelik haftalarına göre değişimi Kruskal Wallis Testi ile değerlendirildi ve her biri için bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu:

**Tablo 15:** 1 ml süspansiyondaki hücre sayısının Kruskal Wallis Testi sonucu

	Hücre sayısı/ml süspansiyon Ortalama $\pm$ SD	p*
15. hf $\geq$	27071.43 $\pm$ 16088.53	< 0.001
16. hf	55646.15 $\pm$ 41862.30	
17. hf	79119.40 $\pm$ 41482.94	
18. hf	119931.82 $\pm$ 56993.82	
19. hf	192571.43 $\pm$ 99894.23	
20. hf $\leq$	316923.08 $\pm$ 163675.73	

\* Kruskal Wallis Testi

**Tablo 16:** 1 ml süspansiyondaki canlı hücre sayısının Kruskal Wallis Testi sonucu

	Viable hücre sayısı/ml süsp. Ortalama $\pm$ SD	p*
15. hf $\geq$	13600.00 $\pm$ 7356.94	< 0.001
16. hf	28356.92 $\pm$ 22669.40	
17. hf	36800.00 $\pm$ 18466.05	
18. hf	51181.82 $\pm$ 24659.80	
19. hf	60761.90 $\pm$ 32021.72	
20. hf $\leq$	107000.00 $\pm$ 60620.40	

\* Kruskal Wallis Testi

**Tablo 17:** Canlı hücre oranının Kruskal Wallis Testi sonucu

	Viable hücre oranı Ortalama $\pm$ SD	p*
15. hf $\geq$	53.41 $\pm$ 11.29	< 0.001
16. hf	52.70 $\pm$ 10.60	
17. hf	47.61 $\pm$ 8.87	
18. hf	44.60 $\pm$ 9.37	
19. hf	32.52 $\pm$ 9.05	
20. hf $\leq$	34.20 $\pm$ 7.49	

\* Kruskal Wallis Testi

**Tablo 18:** 1 ml amniyon sıvısındaki hücre sayısının Kruskal Wallis Testi sonucu

	Hücre sayısı/ml amniyon Ortalama $\pm$ SD	p*
15. hf $\geq$	7121.43 $\pm$ 4467.52	< 0.001
16. hf	14524.62 $\pm$ 10709.66	
17. hf	20631.34 $\pm$ 10688.09	
18. hf	31552.27 $\pm$ 18307.89	
19. hf	51476.19 $\pm$ 26887.95	
20. hf $\leq$	112076.92 $\pm$ 136272.07	

\* Kruskal Wallis Testi

#### 4.2.2 Spearman Korelasyon Testi Sonuçları:

Gebelik haftası ile dört parametre arasındaki ilişkinin pozitif ve negatif yönde hangi düzeylerde olduğu "r" ile, ve istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı ise "p" ile gösterilmiştir:

	r*	p
Gebelik haftası- Hücre sayısı/ml süspansiyon	0.711	< 0.001
Gebelik haftası- Viable hücre sayısı/ml süsp.	0.624	< 0.001
Gebelik haftası- Viable hücre oranı	-0.531	< 0.001
Gebelik haftası- Hücre sayısı/ml amniyon	0.679	< 0.001

\*Spearman Korelasyon Testi

### 4.3 DNA İzolasyonu:

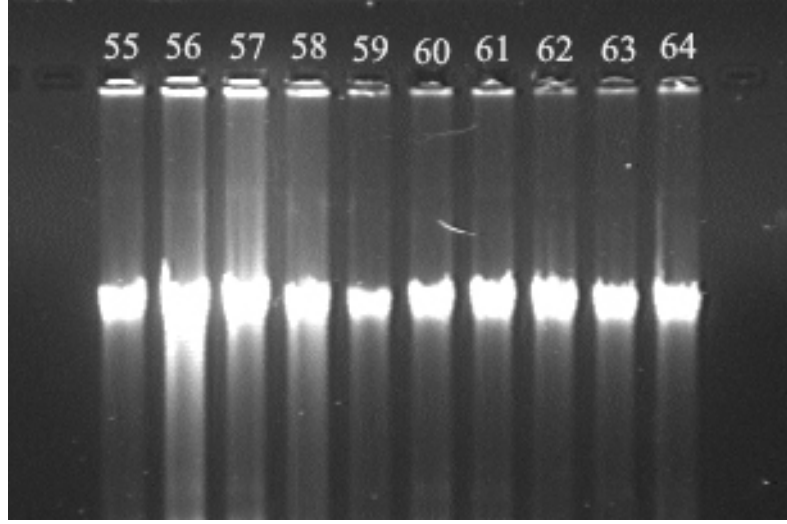
Toplam 130 hastaya ait 25 cm<sup>2</sup> tek tabaka (monolayer) amniyon hücre kültüründen, bir CVS kültüründen ve dört Down sendromlu çocuğun kanından izole edilen DNA'lardan daha önce bahsedildiği şekilde spektrofotometrik ölçümleri yapıldı ve bu ölçüm sonuçlarına göre saflık ve konsantrasyon değerleri hesaplandı. Çalışmaya, saflığı 1,6–2,0, konsantrasyonları 20–120 ng/μl arasında olan DNA örnekleri dâhil edildi.

İstatistiksel olarak anlamlı olabilecek veri sayısına ulaşıncaya hücre sayımına son verilmiş, ancak trizomi 21 tanısı konan amniyon hücre kültürlerinden DNA izolasyonuna devam edilmiştir. Bu nedenle 130 amniyosit DNA örneği içinde trizomi 21'li vaka sayısı 6, toplamda ise CVS ve kan örnekleriyle beraber 11'dir.

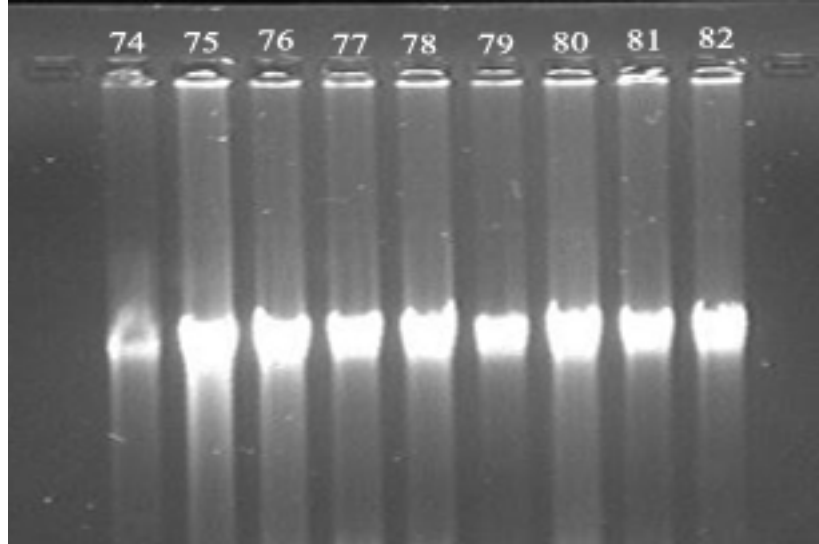
Amniyon hücre kültürlerinden bir kısmında amniyon mayinde seri dilüsyonlar yapılmış olup, elde edilen hücre sayısına uygun DNA ekstraksiyon protokolü uygulanmıştır. Minimum kaç hücreden elde edilen DNA ile QF-PCR analizi gerçekleştirilebileceğini anlamak amacıyla daha fazla katsayıda dilüsyonların yapılması hedeflenmiş, ancak elde edilen hücre sayıları DNA izolasyon kitinin protokolüne uygun olmadığı için hedeflenen bu dilüsyonlar uygulanmamıştır. Bunun yerine 20 no'lu DNA örneğinden 2, 5, 10, 20 ve 50 kat, 51 no'lu DNA örneğinden ise 10, 20, 50 ve 100 kat dilüsyonlar elde edilmiş ve bunlarla PCR kurulmuştur (Resim-6).

#### 4.3.1 DNA İzolasyon Kontrolleri:

Hücre kültürlerinden ve kandan izole edilen DNA'ların intakt olup olmadığının anlaşılması için %1'lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. Her bir kuyuya 9 µl DNA örneği + 1,5 µl yükleme boyası konuldu ve yaklaşık 1,5 saat yürütüldü. Agaroz jel elektroforez sonuçları Resim-1 ve Resim-2'de verilmiştir:



**Resim 1:** Kuyularda sırası ile 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 no'lu DNA örnekleri bulunmaktadır.



**Resim 2:** Kuyularda sırası ile 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 no'lu DNA örnekleri bulunmaktadır.

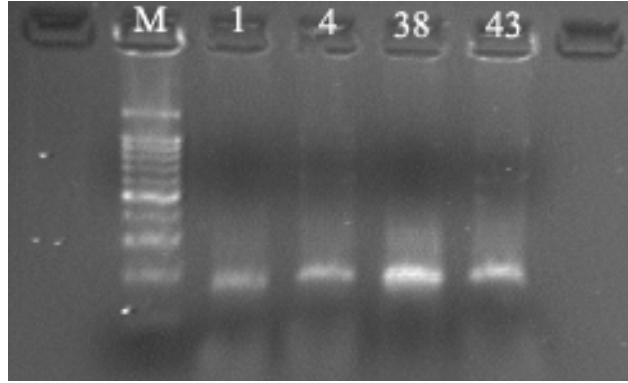


#### 4.4 PCR Sonuçları:

##### 4.4.1 D21S1270 ile PCR Sonuçları:

PCR sonunda D21S1270 lokusuna ait 187 bp amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir.

Amplifikasyon sonrasında ürün kontrolleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Kuyulara 5 µl PCR ürünü + 1 µl yükleme boyası konuldu ve ortalama 25 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları Resim-3'de verilmiştir.



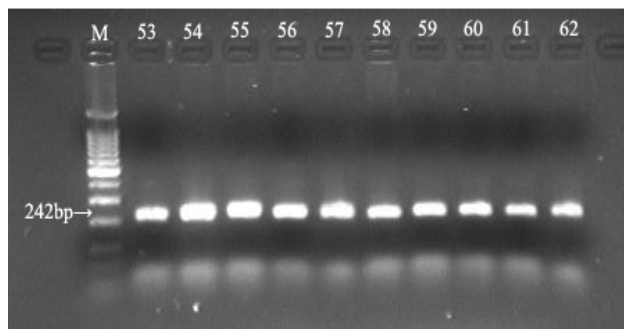
**Resim 3:** Kuyularda sırasıyla 1, 4/10x, 38/2x, 43 no'lu DNA örneklerine ait PCR ürünleri bulunmaktadır.

M: 100 bp

##### 4.4.2 D21S11 ile PCR Sonuçları:

PCR sonunda D21S11 lokusuna ait 242 bp amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir.

Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde gözlenmiştir. Kuyulara 5 µl PCR ürünü + 1 µl yükleme boyası konuldu ve ortalama 25 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları Resim-4'te verilmiştir. Tüm örneklerde amplifikasyon gerçekleşmiştir.



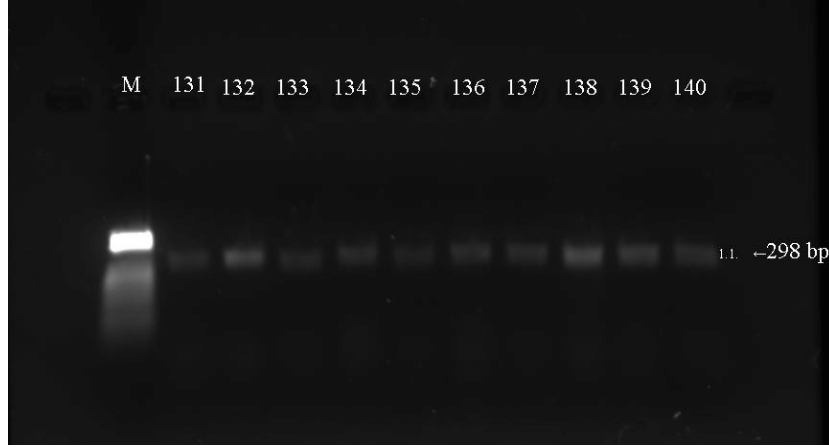
**Resim 4:** Kuyularda sırasıyla 53/4x, 54, 55/2x, 56/3x, 57/3x, 58, 59/2x, 60/2x, 61/2x, 62 no'lu DNA örneklerine ait PCR ürünleri bulunmaktadır.

M: 100 bp (Bkz: 3-11)

#### 4.4.3 D21S1411 ile PCR Sonuçları:

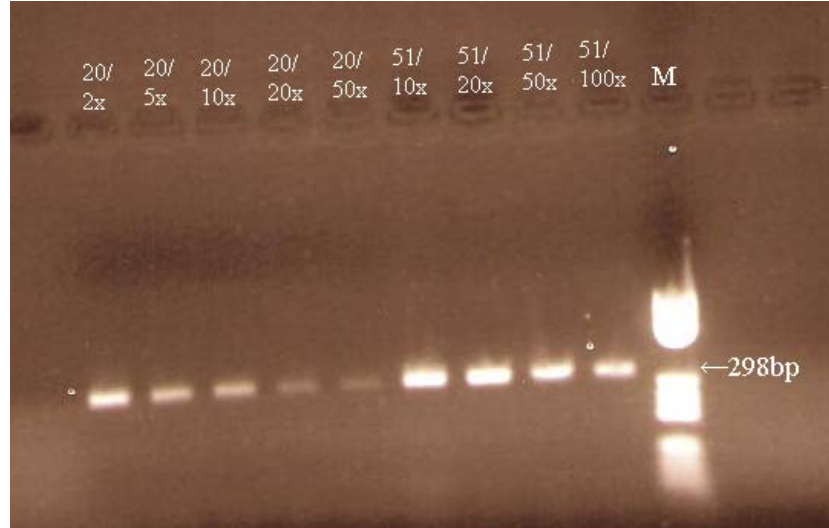
PCR sonunda D21S1411 lokusuna ait 298 bp amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir.

Amplifikasyon ürünlerinin kontrolleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yapıldı. Kuyulara 5 µl PCR ürünü + 1 µl yükleme boyası konuldu ve ortalama 25 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları Resim-5 ve Resim-6'da görülmektedir.



**Resim 5:** Kuyularda sırasıyla 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140 no'lu DNA örneklerine ait PCR ürünleri bulunmaktadır.

M: 8–587 bp (Bkz: 3–11)



**Resim 6:** Kuyularda 20 ve 51 no'lu DNA'ların farklı oranlarda dilüsyonuyla kurulmuş PCR ürünleri bulunmaktadır.

M: 8–587 bp (Bkz: 3–11)

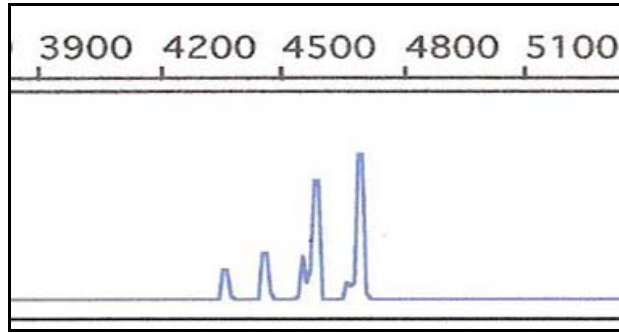
#### 4.5 Genescan Analizi Sonuçları:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nda ABI Prism 310 Genetik Analizör'de her üç belirleyiciye ait PCR ürünlerinin fragment analizi yapıldı. Analizi yapılan DNA örnekleri, kullanılan belirleyici ve analiz sonuçları Tablo 19'da verilmiştir:

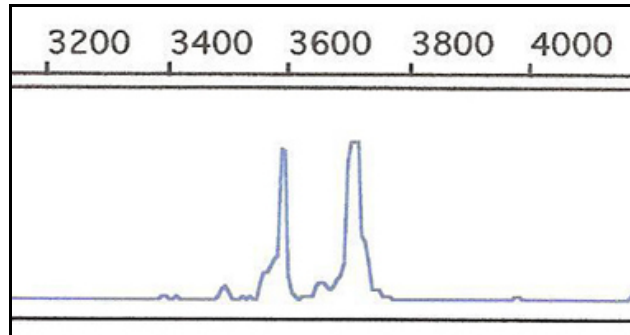
**Tablo 19:** ABI 310'da yapılan analiz sonuçları

Belirleyici	DNA örneği	Tepecik "size" 1/2	Tepecik alanı	Tepecik boyu	Veri noktası	Tepecik oranı
D21S11	5/3x*	123.45/ 139.00	14228/ 36811	1480/ 1548	3592/ 3715	2,58:1
D21S11	6	220.37/ 224.26	1369/ 1140	147/ 143	4712/ 4745	1,2:1
D21S11	8	224.22/ 230.07	1047/ 884	123/ 110	4643/ 4691	1,18:1
D21S11	2	224.42/ 238.14	16484/ 18113	1181/ 1443	4586/ 4696	1,1:1
D21S1270	2	164.55/ 187.41	108296/ 215783	7054/ 6432	4076/ 4265	1,1:1
D21S1411	38/2x	285.33/ 297.70	53835/ 62605	6320/ 7104	5031/ 5123	1,16:1

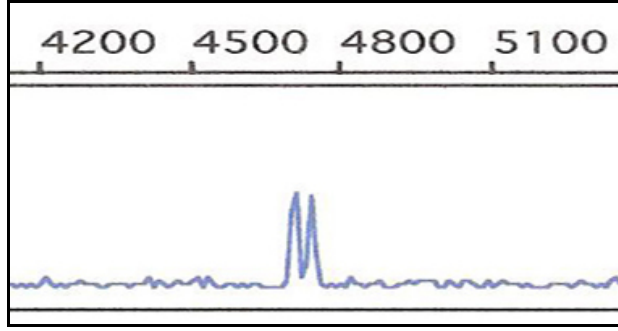
\*Trizomi 21



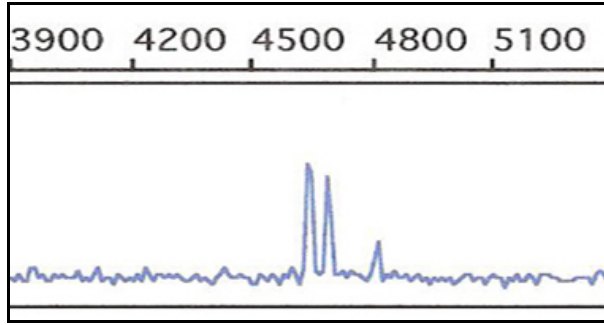
**Şekil 11:** 2 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu



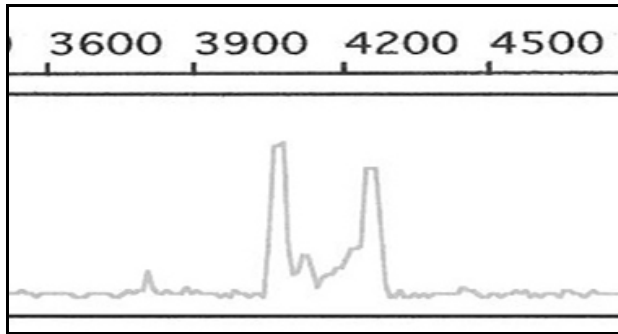
**Şekil 12:** 5 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu



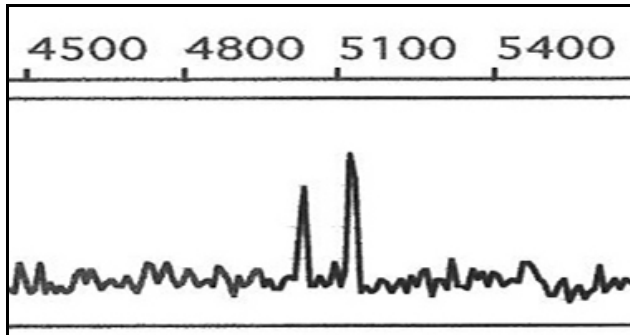
**Şekil 13:** 6 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu



**Şekil 14:** 8 no'lu DNA örneğinin D21S11 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu



**Şekil 15:** 2 no'lu DNA örneğinin D21S1270 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu



**Şekil 16:** 38 no'lu DNA örneğinin D21S1411 Belirleyici ile yapılan analiz sonucu

Bu verilere göre; analiz sonuçları sitogenetik karyotip sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

ABI Prism 310 Genetik Analizör'de yapılan analizlere dayanarak yöntem optimize edildikten sonra, D21S1411 belirleyiciyi ile kurulan tüm PCR ürünlerinin fragment analizi ABI Prism 3730 Genetik Analizör'de yapıldı. Sonuçlar Ek-3'de verilmiştir.

**Tablo 20:** D21S1411 heterozigozite frekansının karşılaştırılması

Belirleyici	Heterozigozite Frekansı			
	Referans (Mann et al, 2001)	Referans (Andonova et al, 2004)	Referans (Lee et al, 2004)	Mevcut çalışma (Türk toplumu)
D21S1411	0.933	0.860	0.832	0.832

Bu analizler sonucunda 135 örnekten 10'unda sonuç elde edilemedi (%7,4). Analiz sonucu elde edilen 125 örnekten 21'inde tek pik elde edildiği için bilgi verici olmadığı ("uninformative") kabul edildi. Kalan 104 örnek (%83,2) bilgi verici ("informative") idi. D21S1411 belirleyicisinin toplumumuz için bulunan bu heterozigozite oranı, literatürdeki verilerle kıyaslanmıştır (Tablo-20). Yedi örnekte pik yüksekliği ve pik alanı oranları 0,65–0,8 veya 1,4–1,8 arasında olduğu için yetersiz olarak değerlendirildi. Sitogenetik olarak bu örneklerden altısının normal olduğu görülürken, birinin trizomik olduğu gözlenmiştir. Kalan 88 örnekten normal dizomik sonuç elde edilmiştir. Diallelik tüm örneklerin ortalama pik oranları ve standart sapmaları Tablo-21'de verilmiştir:

**Tablo 21:** Diallelik Örneklerdeki Pik Oranları

Belirleyici:	Diallelik Örneklerdeki "Peak Area" Oranları					
	Trizomik Diallelik		Dizomik Diallelik		Yetersiz	
D21S1411	Ortalama	SD*	Ortalama	SD*	Ortalama	SD*
PAR*	2,0	0.29	1.1	0.15	1.54	0.11
PHR*	2,0	0,28	1,16	0.11	1,50	0,08

\*PAR: "Peak Area Ratio" \*PHR: "Peak Height Ratio" \*SD: "Standard Deviation"

Onbir Trizomi 21 vakasının dokuzunda QF-PCR analiz sonuçlarının sitogenetik karyotip analiziyle uyumlu olduğu görülmüş, birinden sonuç elde edilememiş ve biri ise yetersiz bulunmuştur. Bu durumda yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç gözlenmemiştir. Bu dokuz trizomi örneğinden yedisinin trizomik diallelik, ikisinin trizomik triallelik olduğu görüldü.

**Tablo 22:** Genescan analiz sonucu elde edilemeyen DNA örnekleri

<b>DNA-40</b>	<b>DNA-95</b>
<b>DNA-50</b>	<b>DNA-106</b>
<b>DNA-59</b>	<b>DNA-133</b>
<b>DNA-71</b>	<b>DNA-137</b>
<b>DNA-76</b>	<b>DNA-143</b>

**Tablo 23:** Genescan analiz sonucu yetersiz olan DNA örnekleri

<b>DNA-68</b>	<b>DNA-107</b>
<b>DNA-75</b>	<b>DNA-123*</b>
<b>DNA-86</b>	<b>DNA-126</b>
<b>DNA-92</b>	

\*Karyotip analiz sonucu Trizomi 21

**Tablo 24:** Genescan analiz sonucu uninformatif olan DNA örnekleri

<b>DNA-4</b>	<b>DNA-52</b>	<b>DNA-91</b>
<b>DNA-22</b>	<b>DNA-57</b>	<b>DNA-93</b>
<b>DNA-26</b>	<b>DNA-60</b>	<b>DNA-109</b>
<b>DNA-28</b>	<b>DNA-61</b>	<b>DNA-112</b>
<b>DNA-36</b>	<b>DNA-67</b>	<b>DNA-115</b>
<b>DNA-43</b>	<b>DNA-80</b>	<b>DNA-141</b>
<b>DNA-51</b>	<b>DNA-88</b>	<b>DNA-148</b>

#### 4.6 Genescan Analizinin İstatistik Değerlendirmesi:

ABI 3730'da yapılan genescan analizinin sonuçlarına göre, QF-PCR metodunun duyarlılık, seçicilik ve pozitif/negatif öngörü değerleri hesaplanmıştır (Tablo–25).

**Tablo 25:** QF-PCR testinin öngörü değerleri

	QF-PCR: + (Trizomi 21)	QF-PCR: - (Normal)	QF-PCR: (Yetersiz)	Toplam
Gold Standart*: + (Trizomi 21)	Gerçek Pozitif 9	Yalancı Negatif 0	1	10
Gold Standart*: - (Normal)	Yalancı Pozitif 0	Gerçek Negatif 88	6	94
Toplam	9	88	7	104

\*Sitogenetik karyotip analizi

Mevcut veriler ışığında elde edilen prediktif değerler aşağıdaki gibidir:

Duyarlılık-sensitivite: % 90

Seçicilik-spesifite: % 93,6

Pozitif prediktif değer: % 100

Negatif prediktif değer: % 100

Bu çalışmada dizomik diallelik örneklerle, diallelik trizomi 21 örneklerin pikleri arasında belirgin bir fark olduğu gösterilmiştir. Yetersiz sonuçların pik oranları ise bu iki değer arasında bulunmuştur (Tablo–21).

51 no'lu DNA'nın 10, 20, 50 ve 100 kat dilüsyonlarıyla hazırlanan PCR ürünlerinin elektroforegramlarında ampikon miktarının giderek azaldığı görülmektedir (Ek–3). Ancak uninformatif olduğundan, fragment analizi ile minimum kaç hücreden tanı konulabilir bir patern elde edileceği konusunda bilgi verici değildir. Bu veri, 20 no'lu DNA örneğiyle elde edilmiştir. 20 no'lu örnek trizomik bir vakaya ait olup, ana stoktan ve 2, 5, 10, 20, 50 kat dilüsyonlarından PCR kurulmuştur. Bu ürünlerin elektroforegramlarında 2, 5, 10 kat seyreltik örnekte yetersiz, ana stok ile 50 kat seyreltik formlarda normal patern elde edilirken, 20 kat seyreltik örnekte trizomi tanısı konulabilmektedir (Ek–3).

20 no'lu DNA örneği 270 000 hücreden elde edildi. En az 20 kat seyreltik örnekten pozitif sonuç elde edilebildiğinden, QF-PCR analizi ile

trizomi 21 tanısı konulabilecek en az hücre sayının 13 500 olduğu söylenebilir. Böylece gebelik haftalarına göre, analiz yapılabilecek ortalama amniyon sıvı hacmi belirlendi (Tablo–26).

**Tablo 26:** QF-PCR analizi için gerekli amniyon sıvı hacminin gebelik haftasına göre dağılımı

	Ortalama hücre sayısı /ml amniyon	Amniyon sıvı volümü
15. hf≥	7121.43	~1.9 ml
16. hf	14524.62	~0.9 ml
17. hf	20631.34	~0.7 ml
18. hf	31552.27	~0.4 ml
19. hf	51476.19	~0.3 ml
20. hf≤	112076.92	~0.1 ml



## 5. TARTIŞMA:

QF-PCR, her bir STR'ye özgül oligonükleotid primerler vasıtasıyla, floresan boyaların PCR amplifikasyon ürünleriyle birleşmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonun, PCR amplifikasyonunun erken ekponensiyal fazında olduğu varsayılırsa, oluşan ampikonun miktarı başlangıçtaki hedef sekans miktarıyla orantılı olacaktır (*Lee et al, 2004; Ferre et al, 1992; Zheng et al. 2006*). DNA amplifikasyonunun etkinliğini çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler etkileyebilir. PCR'ın düşük denaturasyon sıcaklığından, kalıp DNA miktarının azlığından, DNA saflığından etkilendiği bilinmektedir. Bu etkilerin ekponensiyal fazda olması; reaksiyon kinetiğini etkileyecek ve allellerin amplifikasyon oranlarında farklılıklara sebep olacaktır. Trizomik olan 20 no'lu DNA örneğimizin yalnızca 20 kat dilüsyonunda trizomik patern elde etmiş olmamız (Ek-3), reaksiyon koşullarındaki bu farklılıklarla açıklanabilir. Ayrıca, ana stokta olması muhtemel PCR inhibitörlerinin de beraber seyreltilmesi bu sonuçta etkili olabilir. Bu durum doğru bir analiz sonucu elde etmede dilüsyonun önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. DNA örneklerinden daha fazla sayıda, daha farklı oranlarda dilüsyonlar hazırlamakla, daha hassas bir sonuca ulaşılabilir.

Kanlı ya da rengi bozulmuş bir amniyon sıvısından elde edilen DNA'nın da PCR inhibitörlerini içerebileceği bildirilmiştir (*Elles et al, 2004*). Nitekim temiz amniyon sıvı örneklerinin %100'ünde doğru tanı konan bir çalışmada, totalde testin etkinliği %93,2 hesaplanmıştır (*Cirigliano et al, 2004*). Bu çalışmada sonuç elde edemediğimiz tek trizomi vakası olmuştur (EK-3). 76 no'lu bu DNA örneğinin amniyon sıvısının da kanlı olduğu bilinmektedir.

Zimmermann (*Zimmermann et al, 2002*), Real-Time Quantitative PCR ile trizomi 21 tanısının konulabilirliğine dair yaptıkları çalışmada, yöntemin belli bir DNA konsantrasyon değerinin üzerinde uygulanabileceğiyle ilgilendikleri için, DNA örneklerinin birkaç dilüsyonunu çalışmaya dahil

etmişler. Bu seri deneylerde, trizomi 21'in karyotipik olarak normal dokudan ayırt edebildiği lokus oranları, farklı eşik değerlerde gösterilmiştir. Böylece karyotipik olarak normal ve trizomik örneklerin net bir ayrımını yapmanın mümkün olduğu ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada 10 kat seyreltik DNA örnekleri kullanılıncaya ve DNA konsantrasyonu 10 µg/ml'ye düşünceye kadar optimal sonuçlar elde edilmiştir. Bu veriler, bizim çalışmamızdaki 20 kat seyreltik örnekte DNA konsantrasyonunun 10,2 µg/ml olması ile son derece uyumludur. Ayrıca, bir trizomi 21 vakasında eşik değerinin sıra dışı bir değer gösterip, bu ekstraksiyonun iki dilüsyonunda trizomi 21 için beklenen eşik değerler elde edilmiş olması da çalışmamız ile uyum arz etmektedir.

Ya pik alanları ya da pik yükseklikleri Genetik Analizörde yürütülen fragmanın miktarını verebilir. Ancak Zheng (*Zheng et al, 2006*) farklı allellerden PCR ürünlerinin nisbi miktarlarını tayin etmede "peak height" oranlarının "peak area" oranlarına kıyasla daha iyi olduğunu bulmuştur (*Pont-Kingdon et al, 2003*). Her iki ölçümün birlikte yapılabileceğini bildiren kaynaklar da mevcuttur (*Elles et al, 2004*). Biz de çalışmamızda pik oranlarını her iki şekilde hesapladık ve bu iki ölçüm sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdik. Analiz sonuçlarımız iki ölçümün birlikte değerlendirilmesi ile elde edilmiştir. Böyle bir ölçümün sitogenetik karyotip analiz sonuçlarıyla yüksek derecede uyumu sebebiyle daha güvenilir olduğu kanaatine varılmıştır. Literatürde normal pik oranları trizomi örneklerinde yaklaşık 2:1 ya da 1:1:1, normal örneklerde 1:1 olarak belirtilmiş olup (*Elles et al, 2004; Mann et al, 2005; Pertl et al, 1994; Lee et al, 2004; Adinolfi et al, 1997; Yoon et al, 2002*), verilerimiz bu değerlerle uyumlu bulunmuştur (Tablo-21).

Cirigliano (*Cirigliano et al, 2002*), X kromozom dozajının QF-PCR'la ölçümünde, D21S1411 otozomal belirleyiciyi internal kontrol olarak kullanmışlardır. Bu yaklaşımı kullanmanın esas avantajı iki vakada gösterilmiştir: Biri, X'e bağlı kullanılan tüm STR'ler için homozigot olan nadir bir vakada, X'e bağlı HPRT ve D21S1411 arasındaki oranın analizi, X kromozomunun normal iki eşlemi olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde kromozom 21'in kopya sayısını değerlendirmek için, D21S1411'in miktarını

tain etmek için HPRT ürünü de internal kontrol olarak kullanılabilir. Kromozom 21'e ait beş STR için homozigot olan bir fetustan alınan nadir bir örnekte bu gösterilmiştir.

Prenatal örneklerin test edilmesi, sınırlı örnek miktarı, değişken örnek kalitesi, mozaiklik ve maternal hücre kontaminasyonu sebebiyle güçtür (*Mann et al, 2005*): Sekizinci ve daha sonraki gebelik haftalarında amniyon sıvısından yeterli DNA ekstrakte edilebildiği ve PCR'ı kullanarak prenatal tanı için bu örneklerin uygun olduğu gösterilmiştir (*Rebello et al, 1991*). Özellikle 14 haftadan daha erken gebeliklerde tek santrifüjden sonra elde edilen hücre sayısı DNA ekstrakte etmek için düşük bulunduğundan, amniyon sıvı hücrelerini konsantre etmek için ardışık santrifüjasyon metodu kullanılmıştır (*Rebello et al, 1991*). Ancak hücre sayısının gebelik haftalarıyla ilişkisi hakkında literatürde mevcut bir bilgi bulunamamıştır. Biz ise çalışmamızda QF-PCR analizinin yapılabileceği en az hücre sayısının gebelik haftasıyla ilişkisini gösterdik. Literatürde QF-PCR analizi için 0,5–4 ml ya da örneğin 1/10'u kadar amniyon sıvısı alınması tavsiye edilir (*Mann et al, 2005; Lee et al, 2004; Cirigliano et al, 1999; Yang et al, 2005; Zimmermann et al, 2002*). Verilerimiz, gebelik haftası arttıkça analiz için gerekli amniyon sıvı hacminin azaldığını ve bu miktarın ortalama 0,1–1,9 ml arasında değiştiğini göstermektedir. Bu miktarı bilmek; karyotip analizine devam edilmesi gerekli olacak hastalarda, analizi riske atmamak açısından önemli olmuştur.

Prenatal örneklerdeki mozaik karyotip problemleri özellikle CVS'te iyi belgelenmiştir. QF-PCR'la ilgili olarak iki problem vardır; mozaiklik seviyesinin tespit edilebilirliği ve direk test sonuçlarıyla fetal genotip arasındaki uyumun derecesi (*Elles et al, 2004*). Birkaç çalışma trizomi mozaikliğinin QF-PCR'la tespit edilebildiğini bildirmişken (*Mann et al, 2001; Pertl et al, 1997*), diğer bir kısmı bunu aksini savunmuştur (*Lee et al, 2004; Schmidt et al, 2000; Levett et al, 2001*). Genomik mozaikliğin moleküler olarak tespit edilmesinde QF-PCR'ın sensitivitesi, anöploidili hücre serisinin yüzde oranına bağlıdır. Bu konuda ilk çalışma kan örneklerinde yapılmış (*Cirigliano et al, 1999*) ve 46,XX (%90)/45,X (%10) mozaikliği QF-PCR analizi ile tespit edilememiştir. Bu bulgu prenatal örneklerde de teyit edilmiştir

(Schmidt et al, 2000; Yoon et al, 2002). Cirigliano (Cirigliano et al, 2001) %12 mozaiklik oranına sahip bir vakanın QF-PCR analizi ile belirlenemediğini göstermiştir. Başka bir çalışmada ise %30 trizomi mozaiklik seviyesinin QF-PCR'la tespit edilebildiği gösterilmiştir (Pertl et al, 1999). QF-PCR testinin mozaik vakalara tanı koymadaki duyarlılık seviyesini ölçmek için yeterli sayıda vakanın araştırılması gerekmektedir.

Genellikle bir mozaik genotip patern ile iki genotipi gösteren patern arasındaki ayrımı yapmak mümkündür (Mann et al, 2005). İki genotipi gösteren bir patern, genellikle maternal hücre kontaminasyonunun göstergesidir. Bu testin yüksek sensitivitesi, çok az sayıda olsalar bile, kontamine maternal hücrelerin tespitine olanak verir. Kontaminasyon özellikle kanlı amniyon sıvı örneklerinde olmasına rağmen, kan yoğunluğu maternal hücre kontaminasyonu göstergesi olarak kullanılmamalıdır. Sonuçlar değerlendirilirken; kanın fetal ya da maternal kaynaklı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır; iki genotipin varlığı maternal hücre kontaminasyonu ile uyumludur. Fetal genotip yüksek seviyelerdeyse, ve sürekli normal ya da anormal belirleyici sonuçları gösteriyorsa, o halde sonuç görüldüğü gibi yorumlanabilir. Ancak, allel oranları yetersiz ve/veya maternal genotip yüksek seviyelerde ise fetal genotipin değerlendirilmemesi gerekir. Maternal kan hücreleriyle kontamine olduğu düşünülen örneklerde, yüksek derecede polimorfik STR'lerin QF-PCR amplifikasyonu ile, tüm kromozomlar için extra alleller gösteren veya allel pikleri arasında çarpık oranların olduğu bir QF-PCR paterni oluşması beklenir. Bu patern genellikle normal ya da trizomik bir örnekle uyumlu olmadığı gibi, triploidi ya da mozaiklikle karıştırılmayacak kadar da karakteristiktir. Bu sebeple yanlış tanı riski yoktur (Cirigliano et al, 2001; 2004). Cirigliano (Cirigliano et al, 2001), görünüşte temiz olan, ancak santrüjden sonra az bir kontaminasyonun görüldüğü, özellikle dişi fetuslarda FISH analizini engelleyebilecek örneklerin tamamını başarıyla amplifiye etmiş ve tanı koymuştur. Çünkü kontaminasyonun çok düşük seviyelerde olduğu bu durumlarda; maternal hücrelerin sebep olacağı extra pikler çok küçük floresan aktivite göstereceklerinden, fetal STR piklerinin oranları arasında anlamlı bir değişikliğe sebep olmayacaklardır (Cirigliano et al, 2001).

Kontaminasyon düşünölen vakalarda, özellikle fetus kız ise, örnekteki hücrelerin fetal kaynağını belirlemek için, anne kanının eş zamanlı ve aynı belirleyiciler kullanılarak analiz edilmesi gerekir. Fetal ve ilgili maternal örneğin STR profillerinin analizi muhtemel kontaminasyon hakkında net ve kesin bir değerlendirme sağlar. Çünkü fetal örnekteki extra floresan pikleri annedekilerle aynı ölçülere sahiptir. (*Elles et al, 2004; Pertl et al, 1999; Mann et al, 2005*).

Bu konudaki ilk deneyler, konvensiyonel sitogenetik analizle daha önce tanı konmuş örneklerde yapıldı (*Cirigliano et al, 2001*). Sitogenetik analiz sonuçlarını riske atmamak amacıyla biz de çalışmamızda bu yolu izledik. Bu durumda maternal hücre kontaminasyonu riski söz konusu değildir; çünkü kontamine bir örneğin kültürü kurulup, genotip analizi yapılıncaya normalde tek bir genotip gösterir. Bunun sebebi kültür işlemi sırasında maternal hücrelerin kaybı ve fetal hücrelerin seçilip, artmasıdır. Bu sebeple amniyon sıvısında maternal hücrelerin tespiti karyotip analizine olan güveni sarsmaz (*Elles et al, 2004*).

QF-PCR analizinde uninformatif sonuç yüzdesini en aza indirmek için uygun belirleyici seçimi önemlidir (*Andonova et al, 2004*). Birkaç tane yüksek derecede polimorfik, özgül belirleyicinin kullanımı, homozigozite olasılığını azaltır, özgüllüğü artırır, yalancı negatif ya da şüpheli sonuçlardan kaçınmayı sağlar (*Zheng et al, 2006*).

Çalışmamızda yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç görülmemekle beraber, informatif sonuçlardan yedisi yetersiz bulunmuştur. Bunlardan biri trizomik bir vakaya aitti. Yetersiz pik oranı gösteren örneklerin daha fazla sayıda farklı belirleyici ile analiz edilmesi önerilmektedir (*Andonova et al, 2004; Machatkova et al, 2005; Cirigliano et al, 2004; 2001; Mann et al, 2005*). Nitekim üç-altı belirleyiciyle yapılan pek çok çalışmada yalancı pozitif sonuç elde edilmemiştir (*Cirigliano et al, 2004; Lee et al, 2004*). Dört belirleyiciyle yapılan başka bir çalışmada yalancı negatif sonuç gözlenmemiştir (*Andonova et al, 2004*). Yine, 18000 vakada yapılan geniş ölçekli bir çalışmada, kromozom 21, 18, 13 trizomilerinde ve X, Y'yi içeren non-mozaik anöloidilerde yalancı negatif sonuç elde edilmemiştir (*Cirigliano et al, 2004*).

662 vaka ile yapılan bir çalışmada, QF-PCR ile 47,XXY tanısı konan bir örneğin kromozom analizinde cinsiyet kromozom mozaikliği (47,XXY/46,XX) ortaya çıkarılmıştır. Aynı çalışmada yalancı negatif sonuç yalnızca X kromozom mozaikliği olan (45,X/46,XX) bir vakada saptanmış, yalancı pozitif sonuç ise elde edilmemiştir (*Schmidt et al, 2000*). Kromozom 21'e özgül D21S1411'den farklı iki belirleyiciyle yapılan başka bir çalışmada üç (3/78) örnekten yalancı pozitif sonuç alınmıştır. Bunun en muhtemel sebebi olarak, heparinize kandan ve arşiv preparatlarından elde edilen az miktarda DNA kullanılması açıklaması yapılmıştır. Aynı çalışmada bir trizomi 21 vakasında yalancı negatif sonuç elde edilmiş, bunun da karyotip analizinde düşük seviyede mozaik (10/130) olduğu görülmüştür (*Yoon et al, 2002*). Bu çalışmalarda; QF-PCR analizi ile elde edilen yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların daha çok mozaik vakalarda olduğu göze çarpmaktadır.

Maternal kandan fetal hücre elde edilmesi, preimplantasyon genetik tanı çalışmaları gibi az hücre ile yapılan çalışmalarda kalıp DNA miktarı az olacağından, bir allel ayrıcalıklı olarak amplifiye olurken allellerden birinin amplifikasyonunda yetersizlik olabilir. "Allelik drop out" adı verilen bu etki pik oranlarının sapmasına sebep olacağından kantitatif analiz güvenilir olmayabilir (*Sherlock et al, 1998; Samura et al, 2001; Yoon et al, 2002; Elles et al, 2004*). Primer bağlanma bölgesi polimorfizmleri de allelik drop-out ile sonuçlanıp yanlış tanıya sebep olabileceği gibi, yine bu bölgelerdeki mutasyonlarda aynı etki ile uninformatif sonuçlar elde edilebilir (*Heinrich et al, 2004*). Mikrosatellit tekrar büyüklüğü somatik mozaikliği de, analiz için tek belirleyici kullanıldığı zaman yanlış tanıyla sonuçlanabilir (*Elles et al, 2004*). Bazı yazarlar bu ihtimalleri göz önüne alarak, sonuçlar hakkında doğru yorum yapabilmek için en az iki informatif belirleyiciyle çalışılmasının gerekli olduğunu savunurlar (*Machatkova et al, 2005; Cirigliano et al, 2001; 2004; Mann et al, 2001; 2003*). Ancak her kromozom için bir informatif belirleyicinin yeterli olduğunu kabul edenler de vardır (*Pertl et al, 1996; 1997; 1999a; 1999b; Bili et al, 2002*). Beklendiği gibi, herhangi ekstra bir belirleyicinin eklenmesi sonuçların informatif değerini artıracaktır (*Andonova et al, 2004*).

3–6 belirleyici kullanılarak farklı toplumlarda yapılan QF-PCR analiz sonuçlarında, homozigot (uninformatif) sonuçların ortalama %0–0,8 arasında değiştiği görülmektedir. Bu örneklerin karyotip analiz sonucunun normal dizomik olduğu teşhis edilmiştir (*Lee et al, 2004; Cirigliano et al, 2001; 2004; Andonova et al, 2004*). Bu çalışmada tek belirleyici ile elde edilen analiz sonuçları değerlendirildi. Ancak kullanılan D21S1411, 30 alleli olan ve şimdiye kadar kromozom 21 için kullanılanlar arasında heterozigozite oranı en yüksek olan belirleyicidir (*Hulten et al, 2003; GDB*). Uninformatif sonuçlarımız 125 olgunun 21'inde (%16,8) görüldü. Bu sonuçlar içinde trizomi 21'li olgu görülmedi. Burada gösterildiği gibi normal bir dizomiğin yüksek derecede polimorfik çok sayıda STR için homozigot olması nadir bir durumdur. Matematiksel olarak; trizomik bir genomun uninformatif patern gösterme ihtimali dizomik bir genoma kıyasla çok daha düşük olacaktır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, QF-PCR analizinde uninformatif patern gösterdiği halde karyotip analizi ile trizomi teşhisi konmuş tek vaka bildirilmiştir (*Yoon et al, 2002*). Bu verilere dayanarak uninformatif sonuçların çok büyük bir ihtimalle trizomi olmadığı kanısına varılabilir (*Lee et al, 2004*).

STR belirleyicilerinin allel sıklığı ve heterozigozitesi farklı etnik gruplar arasında değişmektedir (*Sacchetti et al, 1999; Andonova et al, 2004*). Bu çalışmada kullanılan D21S1411 belirleyicinin Türk toplumundaki heterojenitesi, aynı belirleyicinin yayınlanmış diğer verileriyle kıyaslandığında Kore toplumuyla aynı oranlara sahip olduğumuz (*Lee et al, 2004*) ancak diğer toplumlara kıyasla (*Mann et al, 2001; Andonova et al, 2004*) daha homojen bir yapı gösterdiğimiz anlaşılmaktadır. Bu durum etnik gruplar arasında genetik çeşitlilikte farklılıkların olabileceğini desteklemektedir.

Tablo-5'de deneyleri gösterilen yazarlar prenatal tanıda QF-PCR'ın rolünün ne olabileceği hakkında farklı görüşlere sahiptirler. Buna rağmen hepsi, OF-PCR'ın ekonomik, hızlı ve çok güvenilir bir teknik olduğu konusunda fikir birliği içerisinde oldukları (*Nicolini et al, 2004; Cirigliano et al, 2004*).

Ogilvie (*Ogilvie et al, 2003*) and Leung (*Leung et al, 2004*) artmış Down sendromu riski sebebiyle prenatal tanı için başvuran kadınlarda, QF-PCR'ın

karyotip analizine alternatif bir test olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Bu tekniğin avantajlarının dezavantajlarından daha fazla olduğunu öne sürmüşlerdir. Andonova (*Andonova et al, 2004*) kısmi otozomal anöploidi şüphesi olan vakalarda da prenatal ve postnatal tanıda QF-PCR analizinin uygulanabilir bir alternatif olduğunu savunur. QF-PCR'ın kullanımı, daha hızlı bir cevaba, daha düşük maliyete ve konvensiyonel sitogenetikten daha az işgücüne yol açar ve Down sendromuna tanı koyma ya da ekarte etmede çok doğru bir teknik olması, klinisyenin ve hastanın beklentilerine esas cevabı sağlar (*Ogilvie et al, 2003*). QF-PCR'ın tek başına bir test olarak kullanımına karşı gelen itirazlardan biri seçilmiş kromozomun polimorfizmlerini kullanarak gözden kaçan durumların sayısıdır. Bu durumda yaklaşık 150 anormal karyotipten birinde ya da yaş dağılımına bağlı olarak 10–30000 örnekten birinde, en yaygın ve yalnızca anne yaşıyla sıklığı artan kromozom anomalilerine tanı koyamama riski vardır. Bu hata oranı kabul edilebilir görünmekle beraber, en çok yapısal kromozom anomalileri gözden kaçacaktır Leung'un verilerine göre, bu anomalilerin çoğu (robertsonyan translokasyonlar, mozaiklik, kromozom belirleyicileri) ya klinik olarak önemsiz ya da gidişatı öngörülemez ve hatta gereksiz gebelik sonlandırmalarını içeren yoğun genetik danışmanlık gerektirecektir (*Leung et al, 2004; Nicolini et al, 2004*).

Bazı yazarlar QF-PCR'ın karyotipe alternatif değil, yardımcı bir test olduğunu savunurlar (*Schmidt et al, 2000; Yoon et al, 2002; Chen et al, 2000; Pertl et al, 1996; Levett et al, 2001; Bili et al, 2002*). Ya da eğer anne kanından izole edilen fetal hücrelerde kromozom analiziyle prenatal tanı uygulanabilir bir seçenek olacaksa gelecekte seçilecek bir metot olabileceğini önerir (*Verma et al, 1998*). Hızlı, geçici bir cevabın sağlanmasının avantajı, tam karyotip için beklerken annenin endişesini hafifletmesidir (*Leung et al, 2002*).

Mann (*Mann et al, 2001*) tarafından prenatal tanıda QF-PCR kullanımıyla ilgili bir ayrım öne sürülmüştür: Anormal ultrasonografi bulguları ya da ebeveynin kromozomal yeniden düzenlenmeleri olan kadınlar tam karyotip analizi gerektirir. Oysa İMY ya da pozitif anne serum taraması ve



endişe sebebiyle prenatal tanı gereken kadınlara tek başına QF-PCR önerilebilir (*Mann et al, 2001; Brun et al, 2004*). Ki; literatürde en yaygın prenatal tanı endikasyonu artmış fetal Down sendromu riski (*Hu et al, 2004*) olarak bildirilirken, bizde İMY ve pozitif anne serum taramasının da en az bu kadar yaygın bir endikasyon olduğunu görmekteyiz (EK-1). Normal ultrasonografi bulguları olan kadınlar düşük riskli kabul edilirler. Böylece bazı yazarlar, yalnızca QF-PCR testinin uygulanması gerektiğini öne sürerler. Fetal yapısal anomalileri olan kadınlar da, en yaygın anöploidileri teşhis etmeyi sağlayan QF-PCR'ın hızlı cevap vermesinden fayda görürler. Ancak genel konsensus, onların konvensiyonel sitogenetikle test edilmelerinin daha uygun olduğu yönündedir. Böylece, tüm kadınlar QF-PCR'ın avantajlarından faydalanabildiği halde, bir kısmında tam karyotip de sürdürülmelidir. Böyle bir plan doğru bir ultrasonografi muayenesini gerektirmekle beraber, özellikle erken gebelikte, CVS ya da amniyosentezden önce normal fetal anatomiye sahip vakalarda, QF-PCR'ın tek başına kullanımıyla Down sendromundan başka gözden kaçabilecek anöploidi olup olamayacağı bilinmez. Tersine, ultrasonografide tespit edilen fetal anatomik defektleri takiben, QF-PCR'la tanı konması olanaksız anöploidilerin riskinde ne derece bir artış olduğu tanımlanmamıştır (*Nicolini et al, 2004*).

Örneğin, artmış ense kalınlığı ilk trimester görüntülemeye belirlenebilen en yaygın anatomik bulgudur. Bu bulgu, kromozom anomalileri, bir çeşit genetik sendrom ve gebelik ilerledikçe belirgin olacak bazı malformasyonlar için artmış riski olan kadınları hiç bir şüphe olmaksızın seçmenin güvenilir bir yöntemidir (*Jenderny et al, 2001*). Ancak, genetik sendrom ve yapısal bozukluklara QF-PCR'la ya da konvensiyonel sitogenetikle tanı konamayabilir. Yayınlarda özellikle bu durumdan bahsedilmediği halde, İngiltere çok merkezli projesi; anne yaşıyla ve fetal ense kalınlığıyla trizomi 21 riskinin değerlendirilmesinde, QF-PCR'ın tanısal bir test olarak kullanılmasıyla tüm kromozomal anöploidilerin %12'sinin gözden kaçacağını göstermiştir (*Snijders et al, 1998*).

Benzer şekilde, Comas Gabriel (*Comas Gabriel et al, 2002*) 12-17. haftalarda taranan 330 yüksek riskli gebede 48 konjenital kalp anomalisinin

prenatal tanısını bildirmiştir. Bunların 31'inde kalp dışı anomali bulunmuştur: 27 fetusun karyotipi anormal ve bu 27 fetusun 23'ünde anormal karyotipin ya trizomi 21, 18, 13 ya da monozomi X olduğu QF-PCR'la teşhis edilebilmiştir. Yalnızca bir yapısal yeniden düzenlenme, bir 22q delesyonu ve iki nadir trizomi (7 ve 15) QF-PCR'la teşhis edilemedi.

Howe, (*Howe et al, 1996*) konjenital diyafragmatik herni tanısı alan 38 fetusda karyotip analiz sonuçlarını bildirmiştir. Oniki fetusun karyotipi anormaldi: ikisinde trizomi 18, birinde trizomi 14 ve geriye kalanlarda yapısal anomaliler (delesyonlar, translokasyonlar ya da belirleyici kromozomlar) vardı. Bu yüzden, diyafragmatik hernili fetuslarda QF-PCR anöploidilerin çoğunu teşhis etmede başarısız olmuştur.

Bu örnekler, klasik olmayan kromozomal anomalilerinin beklenen oranlarına dayalı farklı araştırma stratejilerini uygulamaya olan ihtiyacı gösterir. Eğer tanısal amaçlı, özellikle tek başına bir test olarak kullanılacaksa, QF-PCR tekniğini istatistiksel olarak geçerli kılmak önemlidir (*Elles et al, 2004*). Artmış ense kalınlığı ya da erken kalp anomalisi olan vakalarda, QF-PCR'la teşhis edilemeyen anomalilerin düşük oranda olduğu göz önüne alınırsa, tam karyotip yapılmasına gerek yoktur, QF-PCR önerilmelidir. Oysa diyafragmatik hernili vakalarda ya da ileri gebelikte tanı konan bazı kalp kusurlarında QF-PCR önerilemez.

Bahsi geçen tüm avantajları sebebiyle, QF-PCR'ın hızlı anöploidi taraması için geçerli bir yöntem olduğu söylenebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER:

Trizomi 21 tüm Down sendromu vakalarının yaklaşık %95'inden sorumludur ve prenatal tanının en yaygın endikasyonu da fetusda trizomi 21 riskinin artmış olmasıdır. Bu çalışmada trizomi 21'in hızlı prenatal tanısında QF-PCR'ı kullanmanın klinik önemini göstermeyi amaçladık. Bu tekniğin en az 13500 hücrede trizomi 21'i güvenilir biçimde saptayabildiği tespit edildi. Amniyon sıvısındaki total ve canlı hücre sayılarının ve canlı hücre oranlarının gebelik haftalarına göre ortalama değerleri elde edildi. Bu iki verinin beraber değerlendirilmesiyle, 14–22. gebelik haftaları arasında 0,1–1,9 ml amniyon sıvısının QF-PCR ile tanı koymak için yeterli olduğu, gebelik haftası azaldıkça gerekli sıvı hacminin arttığı gösterildi. Canlı hücre oranının da gebelik haftasıyla ters orantılı olduğu belirlendi. Böylece daha erken gebelik haftalarında da prenatal tanının mümkün olabileceği ve QF-PCR tekniğinin etkinliğinin gebelik haftasından etkilenmediği gösterildi. Kromozom 21'in test edilmesinde yüksek derecede polimorfik D21S1411 kullanıldı. Bu belirleyicinin Türk toplumundaki heterozigozitesi 0,8320 olarak tespit edildi. Bu oranın, şimdiye kadarki çalışmalarda ve GDB'de aynı belirleyici için verilen heterozigozite değerlerine kıyasla hafif düşük olduğu gösterilmiştir. Bu, Türk toplumunun diğer bazı etnik gruplara göre daha homojen bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. QF-PCR analizi sonucunda; normal dizomik örneklerin pik oranı ortalama 1,1, trizomik diallelik örneklerin pik oranları ise 2,0 olarak hesaplandı. Yetersiz olarak değerlendirilen 7 vakanın ortalama pik oranı ise 1,54 olarak belirlendi. Bu verileri esas alarak; QF-PCR testinin trizomi 21'i teşhis etmede duyarlılığının %90, seçiciliğinin %93,6, pozitif ve negatif öngörü değerlerinin ise %100 olduğu hesaplanmıştır. Totalde ise testin etkinliği %93,3 bulunmuştur.

Araştırmamızın sonuçları; kullandığımız D21S1411 belirleyicinin Türk toplumunda yüksek derecede informatif olduğunu ve trizomi 21'in prenatal

tanısı için güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. QF-PCR tekniğinin, konvensiyonel sitogenetiğe alternatif ve ya yardımcı bir test olarak kullanılabilmesi kanaatine varılmıştır. Çünkü bu teknik ile, trizomi 21'e bir günde kesin tanı konulabileceği gösterilmiştir, ki bu standart sitogenetik metotlarla mümkün değildir. QF-PCR'ın alternatif metotlardan daha yüksek verimde olduğu görülmüştür.

Uninformatif ve yetersiz sonuçların, heterozigozite oranı yüksek olan daha fazla sayıda belirleyici ile tekrarlanması, ya da karyotip analizi ve ya FISH gibi başka bir metotla teyit edilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Bu çalışma trizomi 21'in hızlı prenatal tanısında QF-PCR yönteminin etkinliği ile ilişkili Türkiye'de yapılan ilk çalışmadır. Daha fazla sayıda örnek ile planlanacak çalışmaların, D21S1411 belirleyicinin Türk toplumundaki heterozigozite oranı hakkında daha net bir bilgi vereceği kanaatindeyiz. Aynı şekilde daha fazla sayıda belirleyici kullanımının ise, testin etkinliğini artıracaklarını öngörmekteyiz.

## 7. ÖZET:

### **DOWN SENDROMUNUN HIZLI PRENATAL TANISINDA KANTİTATİF FLORESAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QF-PCR) TEKNİĞİNİN KULLANILMASI**

**Dr. Hatice KOÇAK**

Prenatal tanı için en sık endikasyon, fetusda artmış trizomi 21 riskidir. Bu çalışmada, trizomi 21'in hızlı prenatal tanısında QF-PCR tekniğinin klinik uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlandı. Ayrıca, bu teknikle trizomi tanısı koyabilmek için gerekli en az hücre sayısı ve bu değerin gebelik haftalarıyla ilişkisi değerlendirildi. 224 gebeye ait amniyon sıvısında hücre sayımı yapıldı ve gebelik haftalarına göre sınıflandırıldı. Amniyon sıvısında bulunan total ve canlı hücre sayısı ile canlı hücre oranının gebelik haftasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu ( $p<0.001$ ) gösterildi. 135 olgudan DNA izolasyonu yapıldı. DNA örnekleri D21S1411 belirleyici ile QF-PCR kullanılarak amplifiye edildi. Normal örneklerin pik oranı ortalama 1,1 ve trizomik diallelik örneklerin pik oranları 2,0 olarak hesaplandı.

14–22. gebelik haftaları arasında 0,1–1,9 ml amniyon sıvısından elde edilen amniyosit sayısının QF-PCR ile tanı koymak için yeterli olduğu gösterilmiştir. QF-PCR testinin trizomi 21'i teşhis etmede duyarlılığının %90, seçiciliğinin %93,6, pozitif ve negatif öngörü değerlerinin ise %100 olduğu hesaplanmıştır. D21S1411 belirleyicinin heterozigozite oranının ise 0,8320 olduğu gösterilmiştir. Bu verileri esas alarak, D21S1411 belirleyicinin Türk toplumunda trizomi 21 tanısı için güvenle kullanılacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Trizomi 21, QF-PCR, prenatal tanı, amniyosit.

## 8. SUMMARY:

### APPLICATION OF QUANTITATIVE FLUORESCENT-POLYMERASE CHAIN REACTION (QF-PCR) TECHNIQUE IN THE RAPID PRENATAL DIAGNOSIS OF DOWN SYNDROME

**Dr. Hatice KOÇAK**

The most frequent indication for prenatal diagnosis is the risk of increased trisomy 21 in fetus. In this study, it is targeted to show that the clinical practicability of QF-PCR technique in the rapid diagnosis of trisomy 21. Also, with this technique, the minimum required number of cells in order to diagnose trisomy and the number of amniocytes in relation to the gestational week were interpreted. In 224 pregnant women's amniotic fluid cell counts were carried out and the findings were classified according to gestational week. It was proved that there is a statistically significant ( $p < 0.001$ ) relation between the total and viable cell number and viable cell ratio in amniotic fluid with the gestational week. The DNA isolation was made from 135 case. The DNA samples were amplified by using the D21S1411 locus on chromosome 21. It was calculated that the average peak ratio of normal samples is 1,1 and the peak ratio of trisomic diallelic samples is 2,0.

It is demonstrated that the amniocyte number which is obtained from 0,1–1,9 ml amniotic fluid between the range of 14–22 gestation weeks is sufficient to diagnose by QF-PCR within an acceptable certainty range. It is calculated that the sensitivity of QF-PCR test is %90, specificity is %93,6, positive and negative predictive values are %100 in diagnosing trisomy 21. It is indicated that the heterozygosity ratio of D21S1411 marker is 0,8320. Based on these data, it is concluded that D21S1411 marker can safely be applied in Turkish population for diagnosis of trisomy 21.

**Key Words:** Trisomy 21, QF-PCR, prenatal diagnosis, amniocyte.

## 9. EKLER:

### 9.1 EK-1: Gebelik Haftası-Hücre Sayıları

Hasta No	Dosya No	Geliş Tarihi	Gebelik Haftası	Endikasyon	Hücre Sayısı/ ml süsp.	Canlı Hücre Sayısı/ml süsp.	Canlı Hücre Oranı	Hücre Sayısı/ ml amnion
1	5040*	14.03.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	60.000	24.000	40%	18.000
2	5041	14.03.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	140.000	64.000	45,70%	43.000
3	5042	15.03.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	100.000	32.000	32%	30.000
4	5043	15.03.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	230.000	40.000	17%	69.000
5	5044	15.03.2006	16	2'li testte artmış risk	76.000	24.000	31%	23.000
6	5045	16.03.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	110.000	36.000	33%	33.000
7	5046*	16.03.2006	19	3'lü testte artmış risk	150.000	28.000	18,60%	45.000
8	5047	16.03.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	220.000	28.000	12,70%	67.000
9	5048	16.03.2006	17	İMY	100.000	32.000	30%	32.000
10	5049	16.03.2006	18	3'lü testte artmış risk	100.000	36.000	33%	32.000
11	5050	20.03.2006	17	3'lü testte artmış risk	130.000	52.000	40%	32.000

12	5051*	21.03.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	56.000	24.000	42,80%	14.000
13	5052	21.03.2006	17	İMY	96.000	32.000	33%	24.000
14	5053	22.03.2006	18	3'lü testte artmış risk	130.000	52.000	40%	32.000
15	5054	23.03.2006	20	Artmış Trizomi 21 riski	240.000	88.000	37%	60.000
16	5055*	23.03.2006	15	Turner Sendromu	30.000	18.000	60%	7.500
17	5062	27.03.2006	16	İMY	36.000	10.000	28%	10.000
18	5063	27.03.2006	17	İMY	43.000	13.000	33%	13.000
19	5064	28.03.2006	16	İMY	24.000	10.000	41,60%	7.200
20	5066	28.03.2006	19	İMY	140.000	52.000	36%	42.000
21	5067*	28.03.2006	18	Sol üst İMY	48.000	24.000	50%	14.000
22	5068*	28.03.2006	18	Sağ alt İMY	100.000	50.000	50%	30.000
23	5069	28.03.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	150.000	60.000	40,50%	45.000
24	5070	29.03.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	120.000	36.000	30%	36.000
25	5071	29.03.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	46.000	20.000	43,50%	14.000
26	5072	29.03.2006	16	İMY	22.000	10.000	44%	6.600
27	5073	30.03.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	90.000	28.000	31%	27.000
28	5074*	30.03.2006	16	İMY	28.000	15.000	53%	8.400
29	5075	30.03.2006	16	İMY	7.000	5.000	72%	2.100
30	5076*	30.03.2006	18	İMY	46.000	27.000	58,60%	14.000
31	5077	03.04.2006	18	İMY + Artmış Trizomi 21 riski	40.000	18.000	45%	4.500



32	5078*	03.04.2006	18	2'li testte artmış risk	77.000	37.000	48,40%	19.000
33	5079	03.04.2006	20	İMY	190.000	87.000	46,20%	47.000
34	5080	03.04.2006	20	İMY	220.000	64.000	29%	55.000
35	5081*	04.04.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	140.000	49.000	35,50%	35.000
36	5082	04.04.2006	15	İMY	26.000	12.000	46%	6.500
37	5083	04.04.2006	17	İMY	130.000	48.000	36,40%	33.000
38	5084*	04.04.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	72.000	36.000	50%	18.000
39	5085*	05.04.2006	17	Kız kardeşte Down Sendromu	120.000	49.000	39,30%	30.000
40	5086*	05.04.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	43.000	26.000	60,80%	10.000
41	5087	05.04.2006	18	İMY	150.000	27.000	38,50%	37.000
42	5088	06.04.2006	15	3'lü testte artmış risk	40.000	10.000	25%	10.000
43	5089	06.04.2006	16	3'lü testte artmış risk	47.000	20.000	43,20%	12.000
44	5090*	06.04.2006	17	2'li testte artmış risk	59.000	30.000	51,70%	15.000
45	5091	10.04.2006	20	İMY	240.000	69.000	28,80%	72.000
46	5092	10.04.2006	19	3'lü testte artmış risk	310.000	120.000	37,90%	93.000
47	5093	10.04.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	55.000	26.000	48,20%	16.000
48	5094	10.04.2006	16	İMY	68.000	36.000	53,20%	20.000
49	5095	11.04.2006	17	3'lü testte artmış risk	35.000	12.000	33,30%	10.000
50	5096	11.04.2006	17	İMY	30.000	15.000	50%	9.000
51	5097*	11.04.2006	17	İMY	35.000	21.000	60,80%	10.000

52	5098*	11.04.2006	17	İMY	46.000	20.000	44%	14.000
53	5099*	12.04.2006	17	İMY	76.000	37.000	48%	23.000
54	5100	13.04.2006	15	İMY	17.000	7.500	44%	5.100
55	5101	13.04.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	130.000	34.000	27,40%	38.000
56	5102*	13.04.2006	16	2'li testte artmış risk	31.000	16.000	51,60%	9.300
57	5103	13.04.2006	15	2'li testte artmış risk	28.000	17.000	61,80%	8.300
58	5104*	13.04.2006	18	İMY	35.000	13.000	36,20%	100.000
59	5105	13.04.2006	18	İMY	120.000	46.000	38,60%	36.000
60	5106	17.04.2006	17	İMY	25.000	16.000	63%	6.200
61	5107	17.04.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	160.000	44.000	28,40%	39.000
62	5108	17.04.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	72.000	38.000	52,20%	18.000
63	5109	18.04.2006	16	3'lü testte artmış risk	45.000	19.000	42,50%	11.000
64	5110	18.04.2006	16	İMY	25.000	13.000	51,50%	6.400
65	5111*	19.04.2006	18	2'li testte artmış risk	87.000	35.000	40%	22.000
66	5112*	19.04.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski, akraba evliliği	8.800	6.400	72,70%	1.800
67	5113*	20.04.2006	18	İMY	120.000	39.000	31,80%	30.000
68	5114*	20.04.2006	21	3'lü testte artmış risk	400.000	170.000	43,50%	10.000
69	5115	20.04.2006	14	2'li testte artmış risk	7.000	4.500	64,30%	1.800
70	5116	20.04.2006	18	3'lü testte artmış risk	170.000	48.000	28,60%	42.000
71	5117	20.04.2006	17	İMY	85.000	38.000	44,40%	21.000

72	5118	20.04.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	95.000	50.000	52,90%	24.000
73	5119	25.04.2006	17	İMY	58.000	25.000	44%	17.000
74	5120	26.04..2006	18	İMY	170.000	75.000	43,60%	5.100
75	5121*	26.04..2006	20	3'lü testte artmış risk	180.000	50.000	28,30%	540.000
76	5122	27.04..2006	15	Artmış Trizomi 21 riski	56.000	26.000	47,50%	17.000
77	5123	01.05.2006	22	Down Sendromu	710.000	200.000	28,30%	180.000
78	5124	01.05.2006	18	İMY	160.000	56.000	34,30%	40.000
79	5125	01.05.2006	16	İMY	80.000	32.000	40%	20.000
80	5127	01.05.2006	16	İMY	110.000	45.000	41%	28.000
81	5128	02.05.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	94.000	36.000	37,70%	24.000
82	5129	02.05.2006	16	İMY	49.000	34.000	69,90%	12.000
83	5130	02.05.2006	16	2'li testte artmış risk	88.000	50.000	56,60%	22.000
84	5131	03.05.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	76.000	38.000	50%	19.000
85	5132	03.05.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	540.000	120.000	22,10%	140.000
86	5133	03.05.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	150.000	59.000	38,40%	39.000
87	5134*	04.05.2006	16	2'li testte artmış risk	28.000	13.000	47,30%	6.900
88	5135	04.05.2006	17	2'li testte artmış risk	140.000	42.000	30%	35.000
89	5136	04.05.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	48.000	26.000	53,30%	9.700
90	5137	04.05.2006	18	2'li testte artmış risk	170.000	88.000	51%	43.000
91	5138*	08.05.2006	16	2'li testte artmış risk	24.000	14.000	58,30%	6.000
92	5139	08.05.2006	17	İMY+Maternal Anksiyete	180.000	70.000	39,40%	45.000

93	5140	08.05.2006	17	İMY	170.000	73.000	42,10%	43.000
94	5141*	08.05.2006	17	İMY	38.000	16.000	42,10%	9.500
95	5142	08.05.2006	16	Maternal Anksiyete	55.000	28.000	51%	14.000
96	5143	09.05.2006	16	İMY	40.000	15.000	38,40%	9.900
97	5144	09.05.2006	16	İMY	30.000	13.000	44%	7.500
98	5145*	09.05.2006	17	İMY	66.000	32.000	48,50%	17.000
99	5146	10.05.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	100.000	44.000	43,90%	25.000
100	5147	11.05.2006	19	Fetal malformasyon	220.000	76.000	34,20%	56.000
101	5148	11.05.2006	17	İMY	60.000	27.000	45,30%	15.000
102	5149*	11.05.2006	18	İMY	44.000	30.000	71%	10.000
103	5150*	11.05.2006	21	2'li testte artmış risk	240.000	74.000	31,30%	59.000
104	5151	11.05.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	49.000	28.000	58,20%	12.000
105	5152	15.05.2006	17	İMY	52.000	19.000	35,90%	13.000
106	5153	16.05.2006	19	İMY	160.000	42.000	27,30%	39.000
107	5154*	16.05.2006	18	2'li testte artmış risk	290.000	120.000	39,70%	73.000
108	5155	16.05.2006	16	İMY	54.000	22.000	40,50%	13.000
109	5156	16.05.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	160.000	62.000	39,60%	39.000
110	5157	16.05.2006	16	2'li testte artmış risk	82.000	48.000	58,30%	20.000
111	5158*	22.05.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	68.000	30.000	43,30%	17.000
112	5159	22.05.2006	17	İMY	56.000	28.000	49,60%	14.000
113	5160	22.05.2006	19	İMY	150.000	60.000	40,20%	38.000

114	5161	23.05.2006	18	İMY	160.000	70.000	43,20%	40.000
115	5162	23.05.2006	17	İMY	40.000	12.000	30,30%	10.000
116	5163	23.05.2006	17	İMY	77.000	37.000	48,60%	38.000
117	5164	24.05.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	33.000	18.000	53,60%	8.200
118	5165	24.05.2006	17	İMY	37.000	24.000	64,70%	9.200
119	5166*	25.05.2006	17	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	92.000	60.000	66%	23.000
120	5167*	25.05.2006	18	İMY	130.000	60.000	45,70%	15.000
121	5168	29.05.2006	17	İMY	110.000	54.000	49,60%	27.000
122	5169	29.05.2006	17	İMY	210.000	100.000	48,10%	52.000
123	5170*	29.05.2006	17	İMY	55.000	32.000	59,10%	14.000
124	5171	30.05.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	230.000	94.000	41,10%	57.000
125	5172	30.05.2006	20	İMY	300.000	94.000	31,50%	75.000
126	5173	30.05.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	100.000	47.000	46%	26.000
127	5174	31.05.2006	18	İMY + 2'li testte artmış risk	120.000	57.000	48,60%	29.000
128	5175	31.05.2006	17	İMY	65.000	36.000	56,20%	16.000
129	5176	31.05.2006	16	2'li testte artmış risk	57.000	22.000	39,10%	14.000
130	5177	31.05.2006	17	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	76.000	43.000	56,30%	19.000
131	5178	01.06.2006	18	İMY	37.000	25.000	66,70%	9.300
132	5179	01.06.2006	18	3'lü testte artmış risk	81.000	37.000	46%	20.000

133	5180	01.06.2006	18	İMY	92.000	52.000	56,10%	23.000
134	5181*	01.06.2006	18	Kardiyak iki taraflı ekojenik odak	68.000	22.000	32,40%	17.000
135	5182	05.06.2006	16	2'li testte artmış risk	91.000	46.000	51,10%	23.000
136	5183	05.06.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	170.000	58.000	34,40%	42.000
137	5184*	05.06.2006	17	3'lü testte artmış risk	75.000	42.000	56%	19.000
138	5185*	05.06.2006	17	İMY	71.000	46.000	64%	18.000
139	5186	06.06.2006	19	İMY	320.000	140.000	43,40%	81.000
140	5187	07.06.2006	16	İMY	52.000	28.000	53,10%	13.000
141	5188	07.06.2006	16	İMY	50.000	32.000	64,30%	13.000
142	5189*	07.06.2006	22	Anhidramnios	540.000	250.000	46%	140.000
143	5190	08.06.2006	20	Sol AC'de adenomatoid malformasyon	210.000	77.000	36,70%	52.000
144	5191*	08.06.2006	18	3'lü testte artmış risk	150.000	78.000	52,30%	45.000
145	5192	08.06.2006	16	İMY	66.000	26.000	39,40%	20.000
146	5193	08.06.2006	19	3'lü testte artmış risk 1/10*	140.000	61.000	43,90%	35.000
147	5194*	12.06.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	130.000	66.000	51,40%	32.000
148	5195	13.06.2006	18	İMY	160.000	74.000	47%	40.000
149	5196	13.06.2006	18	İMY	140.000	61.000	42,70%	36.000
150	5197	13.06.2006	16	İMY	36.000	16.000	44%	9.000
151	5198	15.06.2006	16	İMY	50.000	24.000	48%	13.000

152	5199	15.06.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	39.000	24.000	61,20%	9.800
153	5200	15.06.2006	18	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	240.000	110.000	46,70%	61.000
154	5201	19.06.2006	17	Anomalili gebelik öyküsü	48.000	24.000	49,60%	12.000
155	5202	19.06.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	48.000	26.000	54,70%	12.000
156	5203	19.06.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	12.000	7.200	58,10%	3.100
157	5204	19.06.2006	17	İMY	42.000	25.000	59%	10.000
158	5205	19.06.2006	16	İMY+İlk bebek hemofili-A (ex)	30.000	18.000	60%	7.500
159	5206	19.06.2006	17	2'li testte artmış risk	49.000	26.000	53,80%	12.000
160	5207	20.06.2006	16	2'li testte artmış risk	47.000	23.000	50%	12.000
161	5208	21.06.2006	16	2'li testte artmış risk	20.000	15.000	76%	3.800
162	5209	21.06.2006	16	İMY	41.000	27.000	67%	6.800
163	5210	22.06.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	180.000	68.000	38,30%	45.000
164	5211	22.06.2006	16	İMY+İVF gebelik	30.000	18.000	61%	7.400
165	5212	22.06.2006	17	İMY+akrabada down sendromu öyküsü	73.000	40.000	55,20%	18.000
166	5213	27.06.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	25.000	14.000	56,50%	6.200
167	5214	29.06.2006	16	2'li testte artmış risk	120.000	58.000	48,00%	30.000
168	5215	29.06.2006	16	2'li testte artmış risk	59.000	31.000	52,70%	15.000
169	5216	03.07.2006	16	İMY	100.000	49.000	48,10%	25.000

170	5217	03.07.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	11.000	8.300	76%	2.700
171	5218	04.07.2006	16	3'lü testte artmış risk	93.000	43.000	46,40%	23.000
172	5219	04.07.2006	17	İMY	110.000	41.000	36,70%	28.000
173	5220	04.07.2006	17	İMY	60.000	20.000	33,60%	15.000
174	5221	04.07.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	19.000	7.600	40,40%	4.700
175	5222	05.07.2006	16	İMY	69.000	38.000	54,30%	17.000
176	5223	05.07.2006	18	İMY	40.000	26.000	63,40%	6.400
177	5224	06.07.2006	15	Artmış Trizomi 21 riski	24.000	14.000	56,70%	6.000
178	5225*	06.07.2006	18	3'lü testte artmış risk	160.000	74.000	46,60%	40.000
179	5226*	06.07.2006	17	2'li testte artmış risk	29.000	16.000	55,60%	7.200
180	5227	06.07.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	68.000	38.000	55,00%	17.000
181	5228	06.07.2006	17	3'lü testte artmış trizomi 18 riski	54.000	28.000	51,10%	14.000
182	5229	06.07.2006	16	İMY	33.000	22.000	65,10%	8.300
183	5230*	06.07.2006	16	2'li testte artmış risk	41.000	24.000	59,40%	10.000
184	5231	10.07.2006	16	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	44.000	24.000	54,50%	11.000
185	5232*	10.07.2006	17	3'lü testte artmış risk	120.000	55.000	45,60%	30.000
186	5233	11.07.2006	22	Artmış Trizomi 21 riski	460.000	100.000	21,90%	120.000
187	5234	11.07.2006	16	İMY+2'li testte artmış risk	22.000	12.000	54,50%	5.500
188	5235*	11.07.2006	17	İMY+Koroid plexus kistleri	34.000	18.000	52,30%	8.600



189	5236	12.07.2006	16	İMY	32.000	21.000	65,80%	7.900
190	5237	12.07.2006	16	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	61.000	40.000	66,40%	15.000
191	5238	13.07.2006	15	Artmış Trizomi 21 riski	56.000	26.000	46,00%	14.000
192	5239*	13.07.2006	20	Artmış Trizomi 21 riski	190.000	68.000	36,50%	47.000
193	5240	17.07.2006	19	Artmış Trizomi 21 riski	160.000	55.000	34,40%	40.000
194	5241	18.07.2006	16	2'li testte artmış risk	68.000	34.000	49,70%	17.000
195	5242*	18.07.2006	16	İMY+3'lü testte artmış risk	88.000	45.000	51,10%	22.000
196	5243	18.07.2006	17	İMY	50.000	23.000	46,00%	13.000
197	5244	19.07.2006	16	Fetal anomali	280.000	160.000	56,80%	70.000
198	5245*	19.07.2006	17	İMY+2'li testte artmış risk	86.000	41.000	47,20%	21.000
199	5246	19.07.2006	17	2'li testte artmış risk	82.000	45.000	54,40%	21.000
200	5247	19.07.2006	17	2'li testte artmış risk	120.000	57.000	47,30%	30.000
201	5248	19.07.2006	17	İMY	40.000	21.000	52,50%	9.900
202	5249	19.07.2006	17	İMY	64.000	28.000	44,60%	16.000
203	5250*	20.07.2006	18	3'lü testte artmış risk	88.000	33.000	37,40%	22.000
204	5251*	20.07.2006	17	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	130.000	77.000	59,60%	32.000
205	5252	20.07.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	49.000	26.000	52,00%	12.000
206	5253	20.07.2006	17	İMY	140.000	63.000	45,00%	35.000
207	5254	24.07.2006	18	İMY	130.000	41.000	32,30%	32.000

208	5255	24.07.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	170.000	98.000	58,10%	42.000
209	5256	25.07.2006	16	İMY	9.200	4.300	52,20%	23.000
210	5257	25.07.2006	19	3'lü testte artmış risk	150.000	49.000	32,90%	37.000
211	5258	25.07.2006	14	İMY	9.000	6.000	66,70%	2.200
212	5259	25.07.2006	16	İMY	80.000	46.000	58,30%	20.000
213	5260	26.07.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	200.000	90.000	45,90%	49.000
214	5261	26.07.2006	17	Artmış Trizomi 21 riski	120.000	60.000	49,20%	31.000
215	5262	26.07.2006	16	2'li testte artmış risk	48.000	25.000	51,20%	12.000
216	5263*	26.07.2006	16	Artmış Trizomi 21 riski	28.000	18.000	62,00%	7.100
217	5267	01.08.2006	18	İskelet Displazisi	200.000	88.000	43,40%	51.000
218	5273	03.08.2006	18	İMY	150.000	72.000	49,70%	36.000
219	5274	07.08.2006	15	İMY+Artmış Trizomi 21 riski	23.000	14.000	59,60%	5.700
220	5275	07.08.2006	15	Artmış Trizomi 21 riski	40.000	22.000	54,50%	9.900
221	5276	07.08.2006	15	İMY	13.000	8.400	65,60%	3.200
222	5281	09.08.2006	18	İMY	86.000	42.000	49,10%	22.000
223	5283	09.08.2006	18	Artmış Trizomi 21 riski	100.000	54.000	52,90%	26.000
224	5290*	10.08.2006	15	2'li testte artmış risk	10.000	5.000	50,00%	2.500

Dosya No\*: Gebelik Haftası=14-15⇒15/ 15-16⇒16/ 16-17⇒17 vb.

## 9.2 EK-2: DNA'ların Saflık ve Konsantrasyonları:

DNA No	Dosya No	Hücre Sayısı	DNA Saflığı	DNA Konsantrasyonu µg/ml
1	AS-06-4974	~2 000 000	1,85	49,4
2	AS-06-4985	~2 400 000	1,93	20,5
3	AS-06-5010	~1 600 000	1,38	66,4
3/2x			1,74	63
4	AS-06-5014	~7 500 000	2,01	323,2
4/10x			1,63	48
5	CVS-06-01	~2 500 000	1,87	120
5/3x			1,73	50,5
6	AS-06-5038	~88 000	1,65	25,7
7	AS-06-5039	100 000	1,62	24,7
8	AS-06-5040	~1 750 000	1,71	22,3
10	AS-06-5043	~700 000	1,69	22,8
11	AS-06-5044	~750 000	1,69	25
12	AS-06-5046	~700 0000	1,63	27,8
17	AS-06-5059	~110 000	1,68	48,9
18	AS-06-5063	~110 000	1,73	36,8
19	AS-06-5066	~100 000	1,88	29,5
20	AS-06-5055	~270 000	1,42	41,7
20/2x			1,72	12,7
20/5x			1,70	9,9
20/10x			2,85	6,8
20/20x			1,62	10,2
20/50x			1,58	7,6
21	AS-06-5068	~220 000	2,01	25,5
22	AS-06-5069	~500 000	1,60	20,6
23	AS-06-5070	Ø	1,63	27,6
24	AS-06-5071	Ø	1,61	24,4
25	AS-06-5073	Ø	2,00	20,8
26	AS-06-5074	Ø	1,95	30,2
28	AS-06-5079	Ø	1,89	20,4
29	AS-06-5077	Ø	1,7	40,7
30	AS-06-5078	Ø	1,82	28,2

31	AS-06-5080	Ø	1,61	49,5
32	AS-06-5081	Ø	1,67	46,9
33	AS-06-5082	2 000 000	1,98	21,2
34	AS-06-5083	Ø	1,93	23,5
35	AS-06-5085	Ø	1,99	17,4
36	AS-06-5086	Ø	1,96	24,4
37	AS-06-5064	~110 000	1,92	64
37/2x			1,61	66,5
38	AS-06-5087	~450 000	1,79	68,3
38/2x			1,63	55,75
39	AS-06-5088	Ø	1,56	52,3
39/2x			1,63	41,75
40	AS-06-5090	Ø	1,44	73,7
40/2x			1,64	83,5
41	AS-06-5091	Ø	1,61	31,8
42	AS-06-5093	Ø	1,82	30,2
43	AS-06-5094	Ø	1,84	47,5
44	AS-06-4981	Ø	1,13	24,4
45	AS-06-4996	Ø	1,63	58,8
45/2x			1,72	31,1
50	AS-06-5095	~250 000	1,67	103,8
50/3x			1,72	33,8
51	AS-06-5096	~300 000	1,13	113,8
51/10x			1,62	19,6
51/20x			1,75	12,8
51/50x			1,52	8
51/100x			1,55	6,5
52	AS-06-5097	~300 000	1,54	70,5
52/2x			1,65	55
53	AS-06-5098	~350 000	1,47	115,7
53/4x			1,62	38,5
54	AS-06-5092	~400 000	1,95	43,6
55	AS-06-5102	Ø	1,84	58,2
55(d)			1,76	52
56	AS-06-5099	~550 000	1,94	114,5
56/2x			1,79	64,25

57	AS-06-5103	Ø	2,11	103,2
57/3x			1,82	62,5
58	AS-06-5101	Ø	1,65	24,4
59	AS-06-5105	Ø	1,95	57,6
59/2x			1,80	69,75
60	AS-06-5110	~1 000 000	1,91	78,1
60/2x			1,94	63
61	AS-06-5111	Ø	1,67	89
61/2x			1,83	66,25
62	AS-06-5106	~1 000 000	1,86	84,3
63	AS-06-5107	~1 000 000	1,92	56,6
64	AS-06-5108	~1 000 000	1,94	76,4
65	AS-06-5109	~1 000 000	1,59	64,4
66	AS-06-5112	Ø	1,96	62,3
67	AS-06-5115	Ø	1,92	49,6
68	AS-06-5116	~1 000 000	1,92	110,9
69	AS-06-5117	~1 000 000	1,93	103,8
70	AS-06-5119	~400 000	1,96	56,7
71	AS-06-5121	~750 000	1,92	91,9
72	AS-06-5122	~6 50 000	1,89	57,5
73	AS-06-5134	~800 000	1,91	74
74	AS-06-5118	~6 50 000	1,81	65,2
75	AS-06-5120	~1 000 000	1,91	88,7
76	AS-06-5136	Ø	1,82	115,2
77	AS-06-5126	Ø	1,93	107,4
78	AS-06-5128	Ø	1,94	97,9
79	AS-06-5129	Ø	1,81	78,6
80	AS-06-5132	Ø	1,99	116,9
81	AS-06-5130	Ø	1,9	68,3
82	AS-06-5131	Ø	1,83	63
83	AS-06-5142	Ø	1,97	65,6
84	AS-06-5143	Ø	1,63	67,3
85	AS-06-5146	Ø	1,61	70,5
86	AS-06-5148	Ø	1,71	57
87	AS-06-5144	Ø	1,78	30,3
88	AS-06-5145	Ø	1,70	32,3

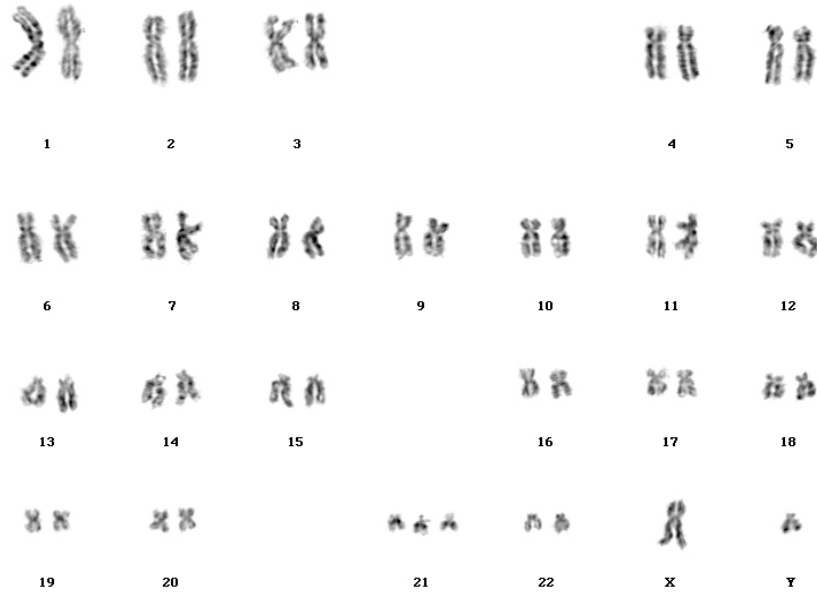
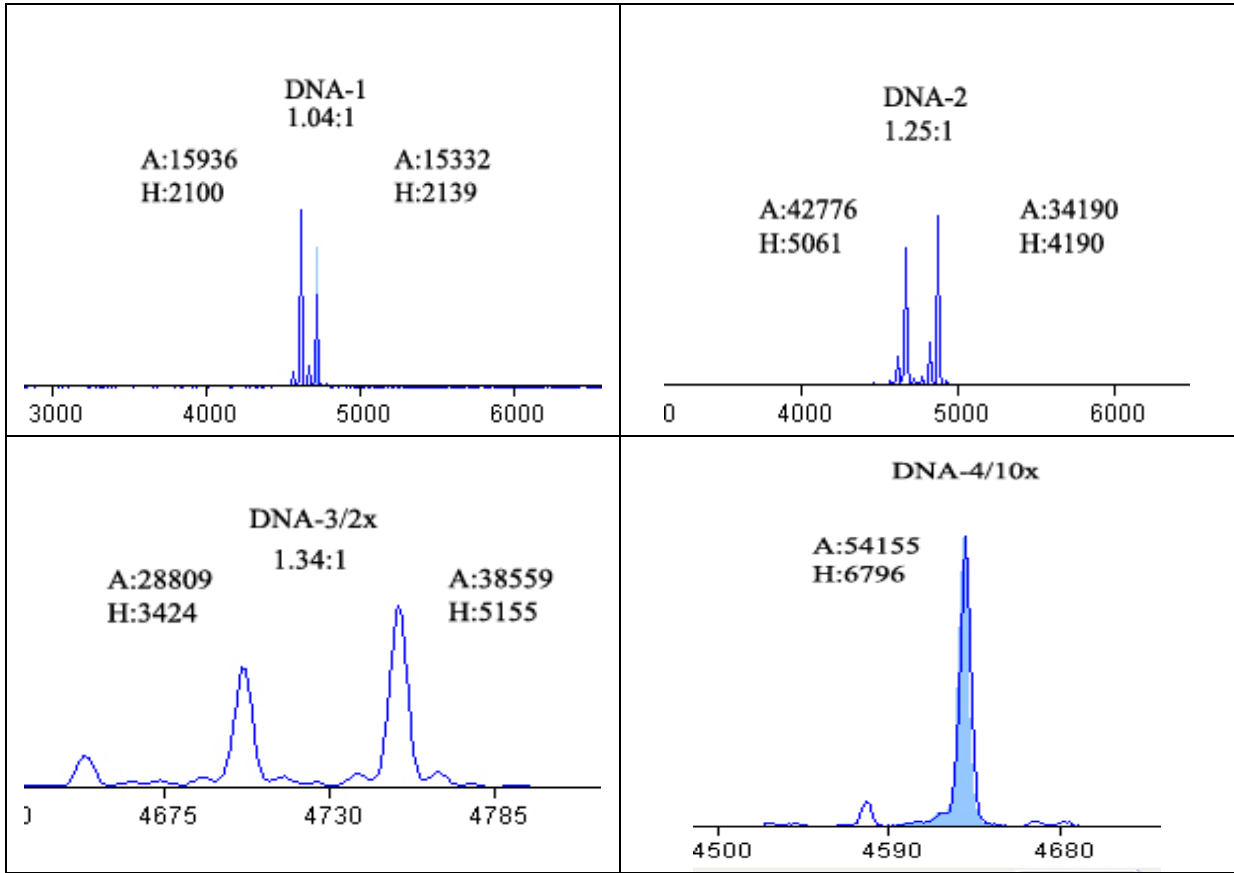
89	AS-06-5147	Ø	1,64	40,1
90	AS-06-5152	Ø	1,76	34
91	AS-06-5157	Ø	1,77	33,7
92	AS-06-5158	Ø	1,73	33,7
93	AS-06-5159	Ø	1,83	41,5
94	AS-06-5160	Ø	1,81	36,1
95	AS-06-5154	Ø	1,74	42
96	AS-06-5156	Ø	1,69	58,4
97	AS-06-5164	Ø	1,87	44,8
98	AS-06-5166	Ø	1,87	72,4
99	AS-06-5169	Ø	1,78	61,2
100	AS-06-5171	Ø	1,70	53,8
101	AS-06-5173	Ø	1,81	52,5
102	AS-06-5174	Ø	1,61	49,5
104	AS-06-5176	Ø	1,62	48
105	AS-06-5177	Ø	1,64	64
106	AS-06-5178	Ø	1,67	49,8
107	AS-06-5181	Ø	1,72	41,6
108	AS-06-5197	Ø	1,71	46,6
109	AS-06-5204	Ø	1,61	74,8
110	AS-06-5182	Ø	1,66	54
112	AS-06-5203	Ø	1,67	56,3
113	AS-06-5215	Ø	1,80	22,5
114	AS-06-5216	Ø	1,83	20,2
115	AS-06-5225	Ø	1,88	26,9
116	Kan-1	Ø	1,82	20,5
117	AS-06-5242	Ø	1,61	116,3
118	Kan-2	Ø	1,73	26,7
119	Kan-3	Ø	1,66	20,3
120	Kan-4	Ø	1,83	25
123	AS-06-5277	Ø	1,66	44,2
124	AS-06-5288	Ø	1,62	30
125	AS-06-5294	Ø	1,69	32,5
126	AS-06-5295	Ø	1,96	30
127	AS-06-5296	Ø	1,71	34,7
128	AS-06-5292	Ø	1,79	22

129	AS-06-5299	Ø	1,88	34,1
130	AS-06-5301	Ø	1,71	36,6
131	AS-06-5309	Ø	1,93	32
132	AS-06-5312	Ø	1,85	38,8
133	AS-06-5314	Ø	1,98	33,3
134	AS-06-5307	Ø	2,00	29,6
135	AS-06-5308	Ø	1,74	30,9
136	AS-06-5311	Ø	1,81	92,6
137	AS-06-5315	Ø	1,86	41,2
138	AS-06-5316	Ø	1,73	132,7
139	AS-06-5317	Ø	1,74	53,4
140	AS-06-5318	Ø	1,69	75,9
141	AS-06-5319	Ø	1,85	83,8
142	AS-06-5320	Ø	1,80	81,1
143	AS-06-5321	Ø	1,82	82,5
144	AS-06-5322	Ø	1,68	119,2
145	AS-06-5324	Ø	1,73	107,6
146	AS-06-5326	Ø	1,96	34,6
147	AS-06-5329	Ø	1,96	41,1
148	AS-06-5333	Ø	1,97	38,5

---

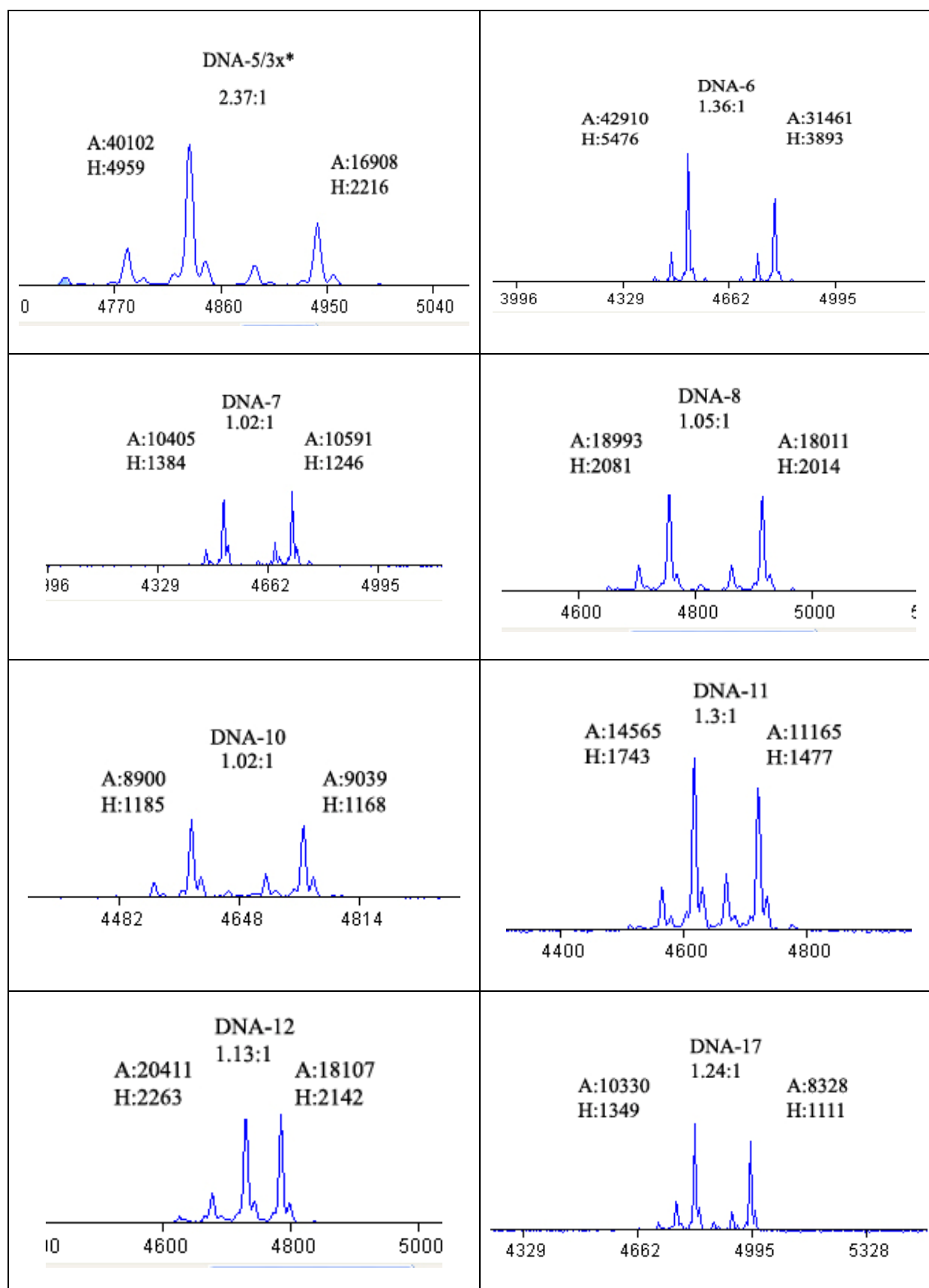
Ø: Hücre sayımı yapılmayıp, pellet miktarına göre izolasyon protokolü belirlenen örnekler.

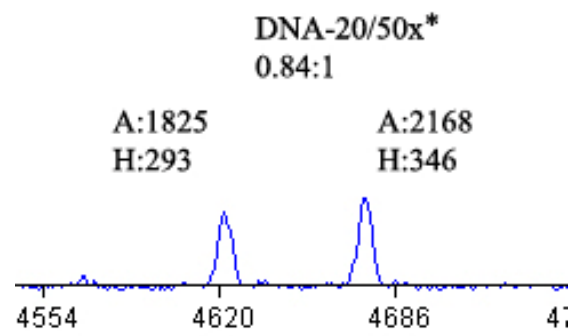
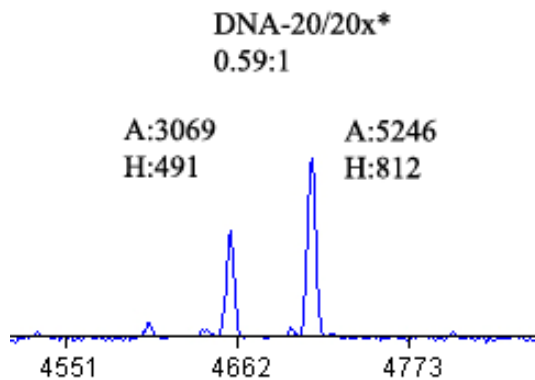
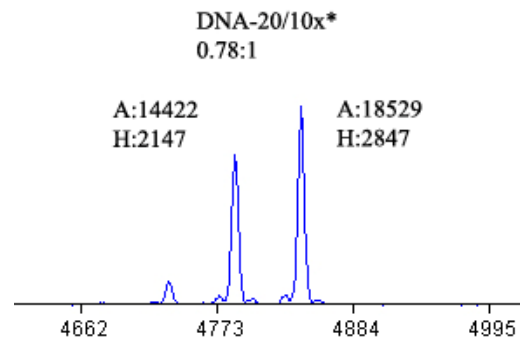
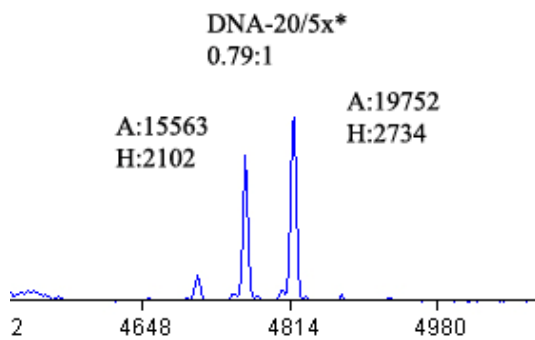
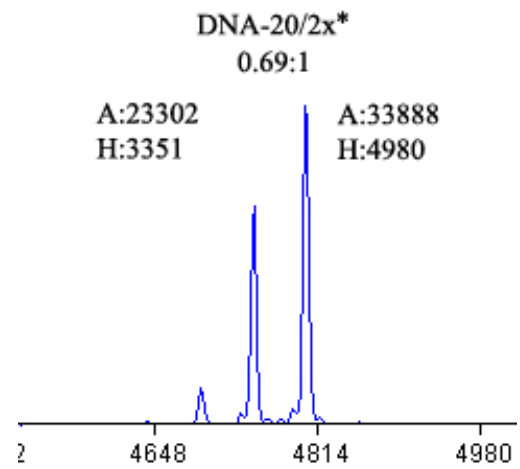
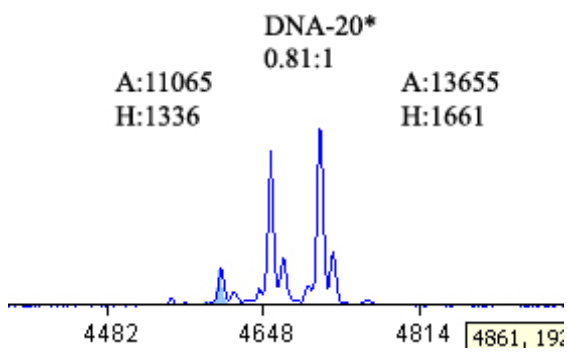
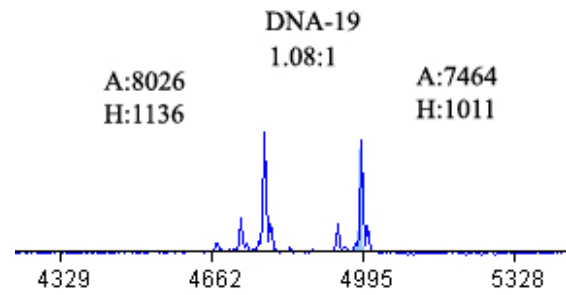
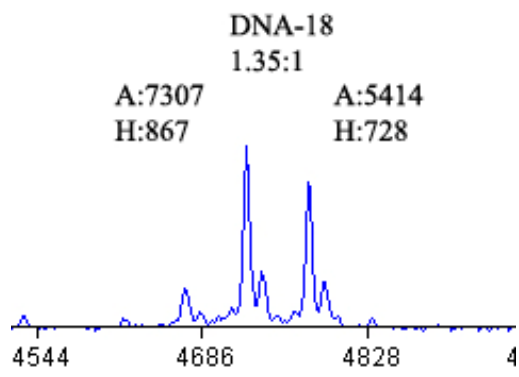
### 9.3 EK-3: QF-PCR Ürünlerinin Elektroforetogramları

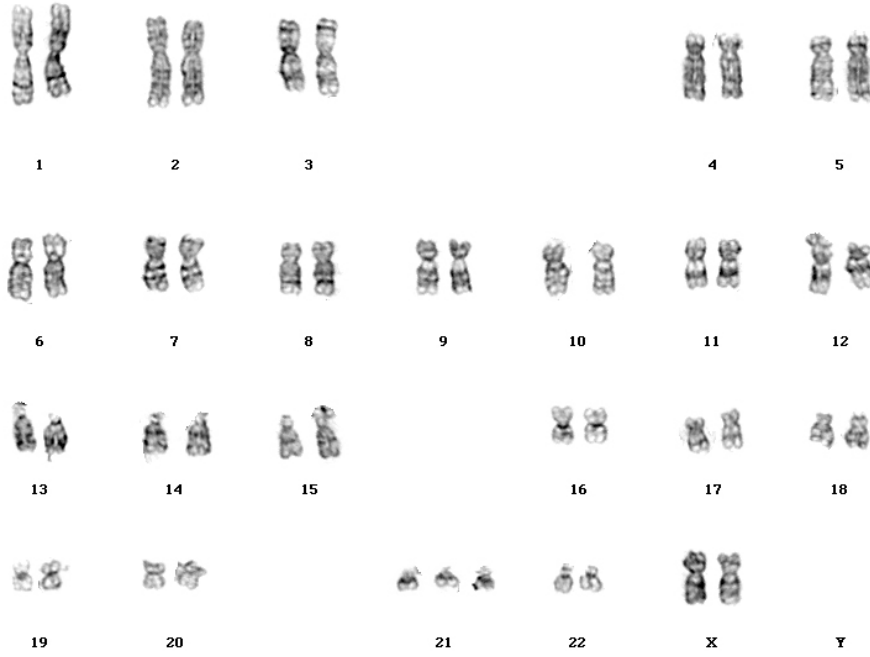


5 No'lu DNA örneğine ait karyotip analizi

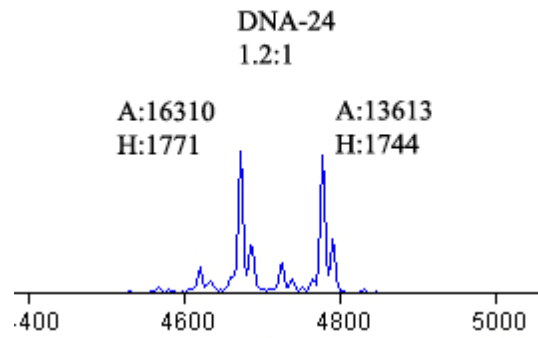
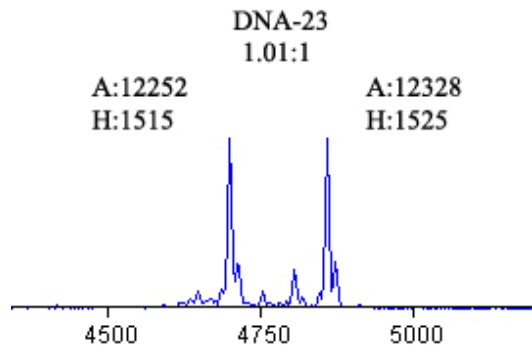
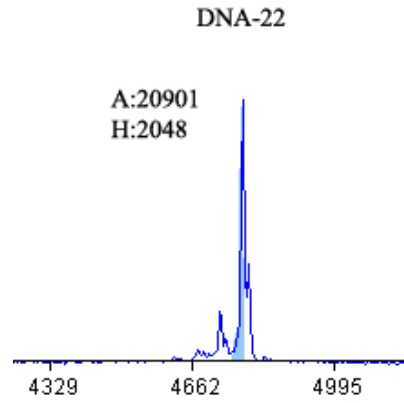
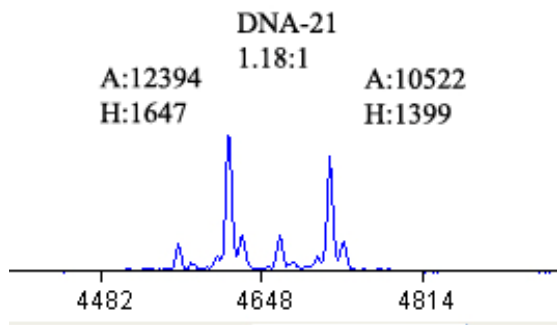


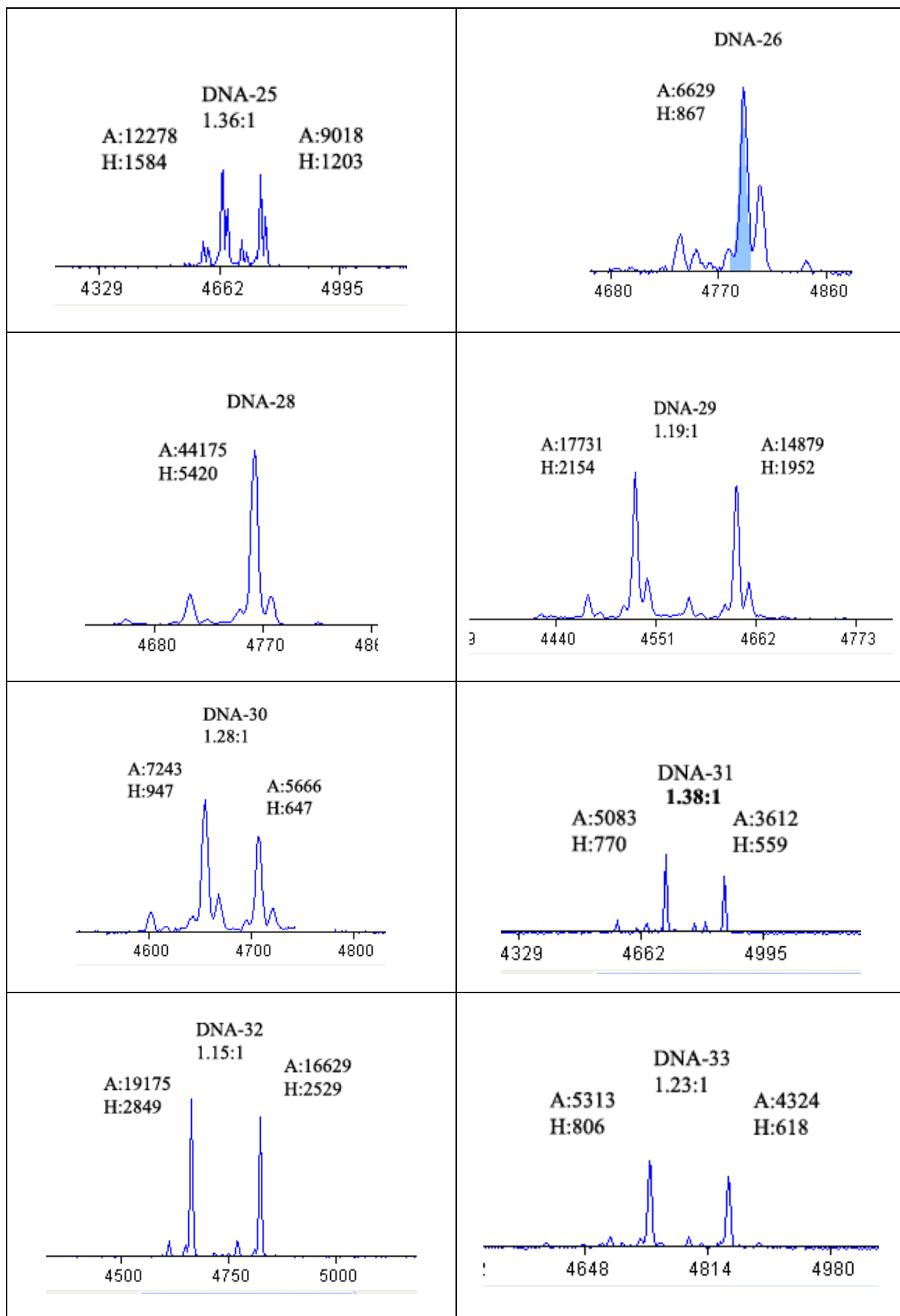


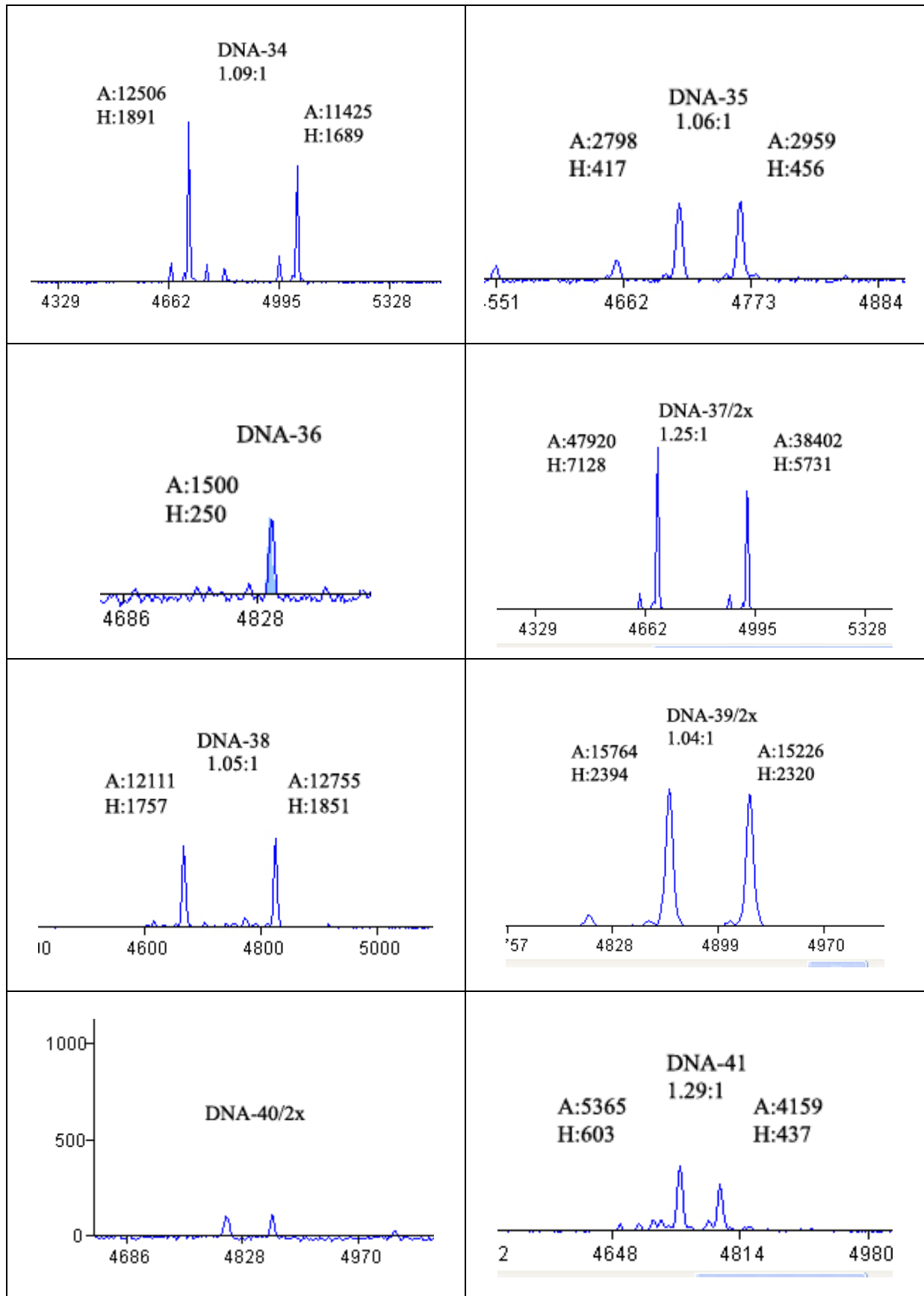


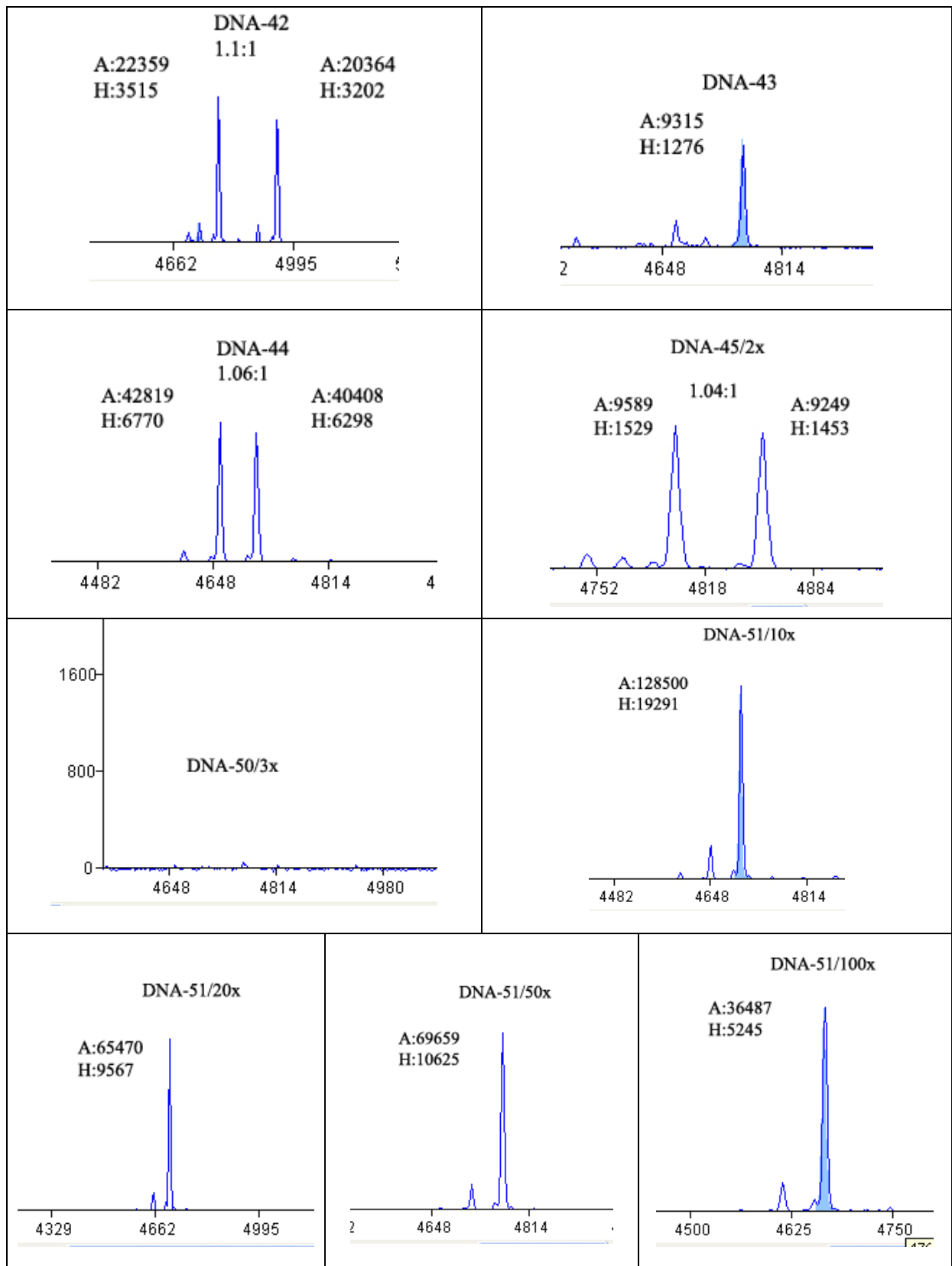


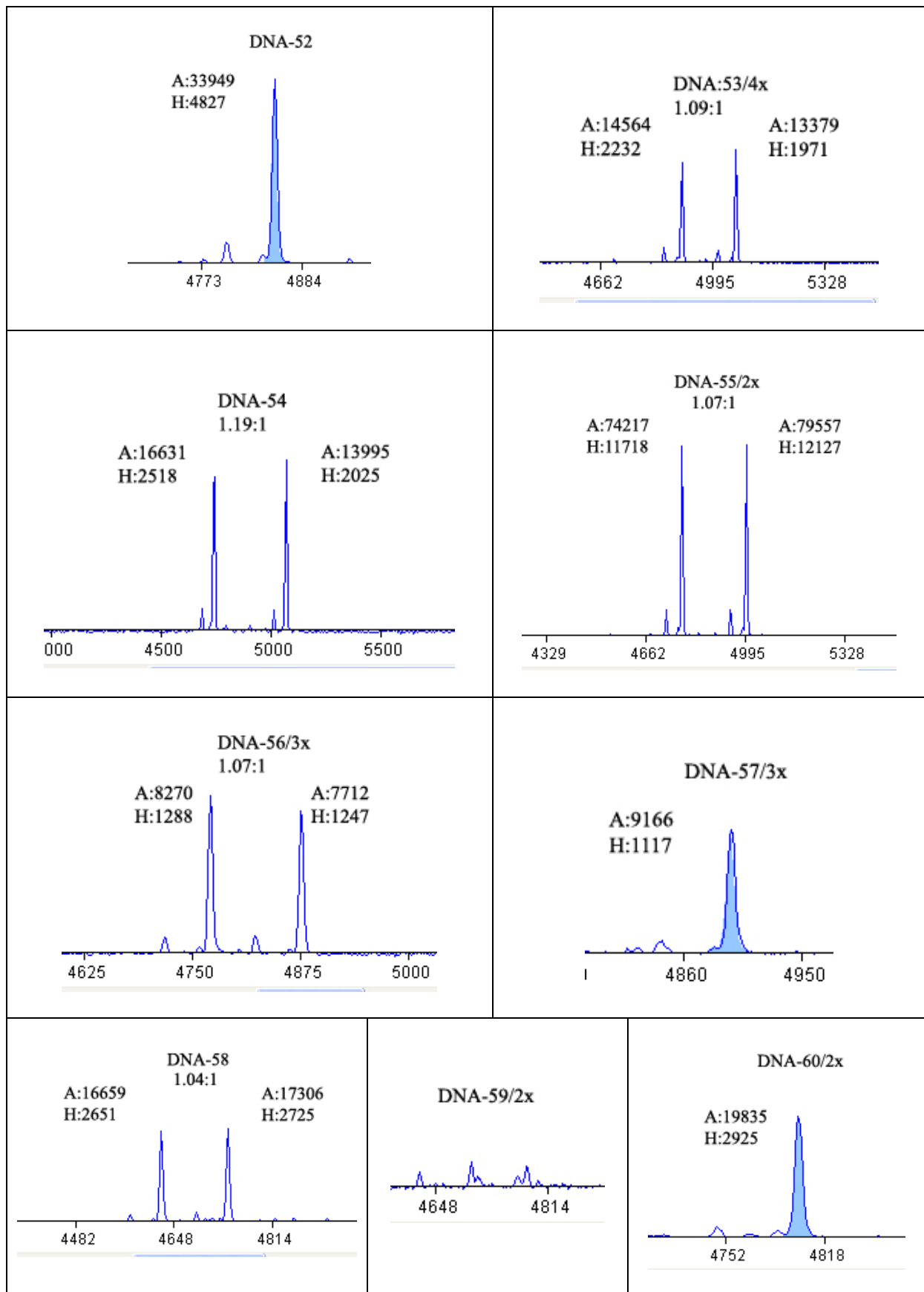
20 No'lu DNA örneğine ait karyotip analizi

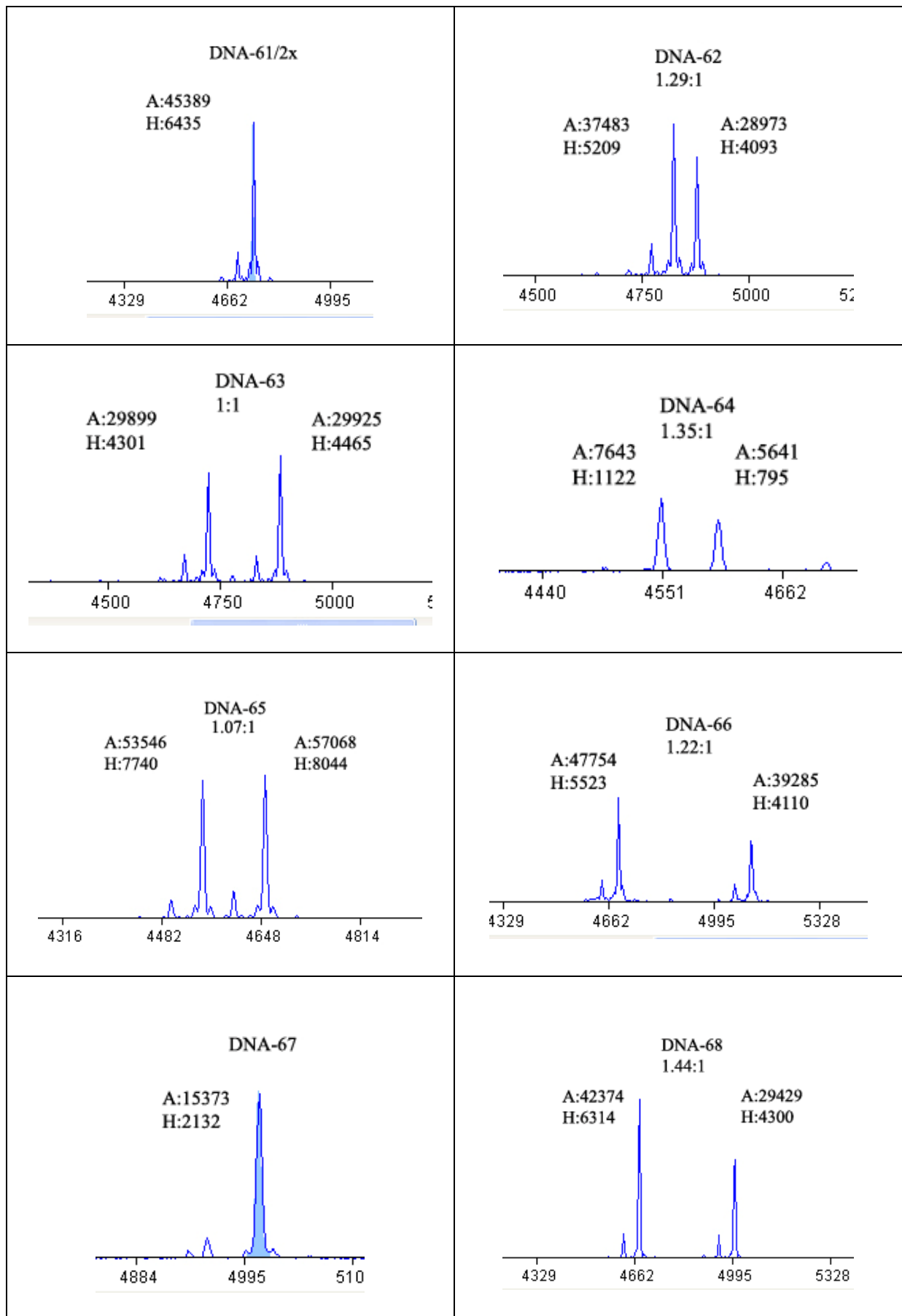




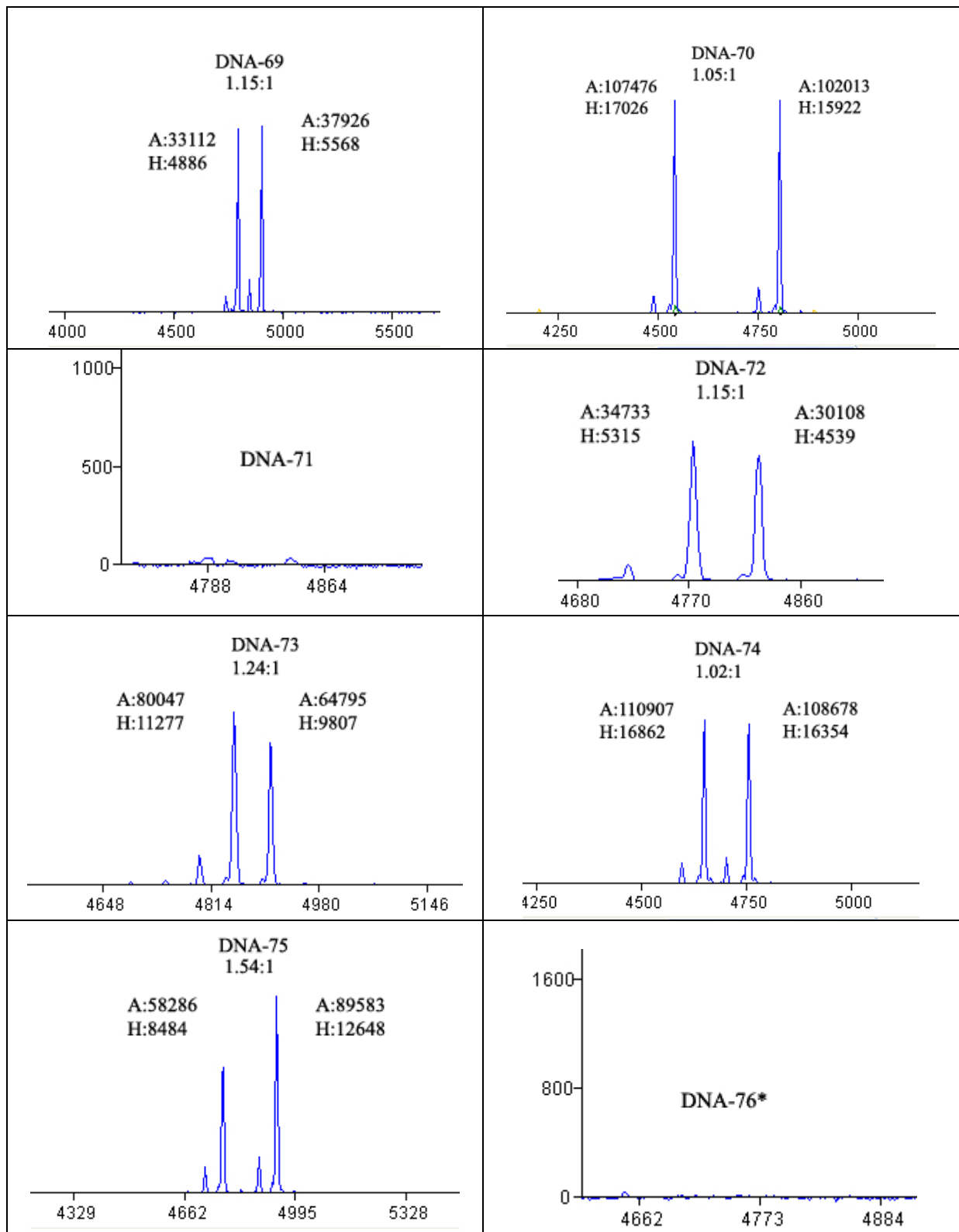






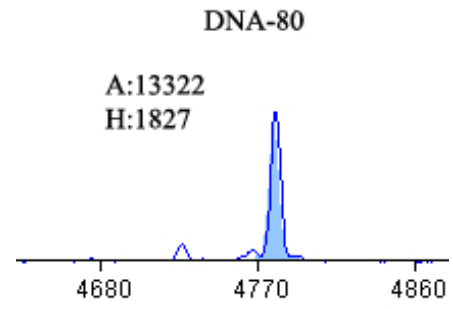
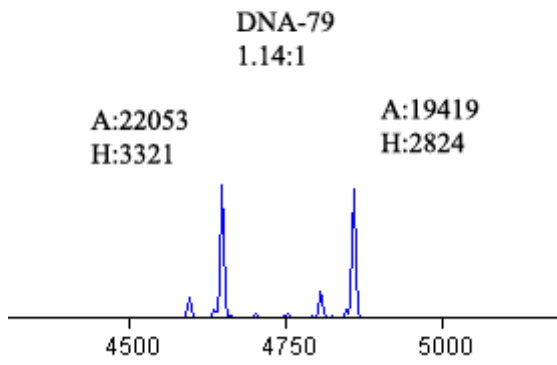
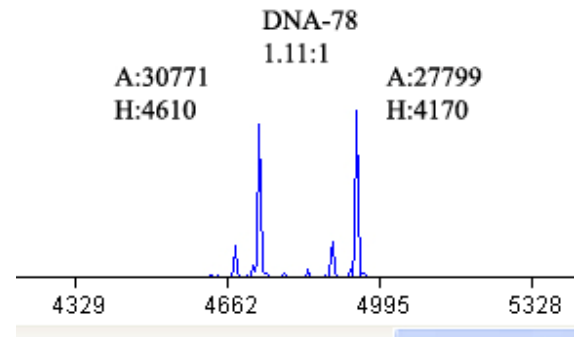
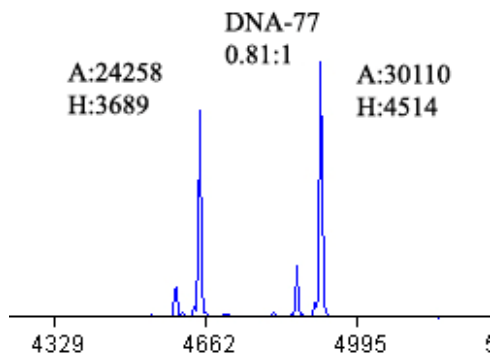


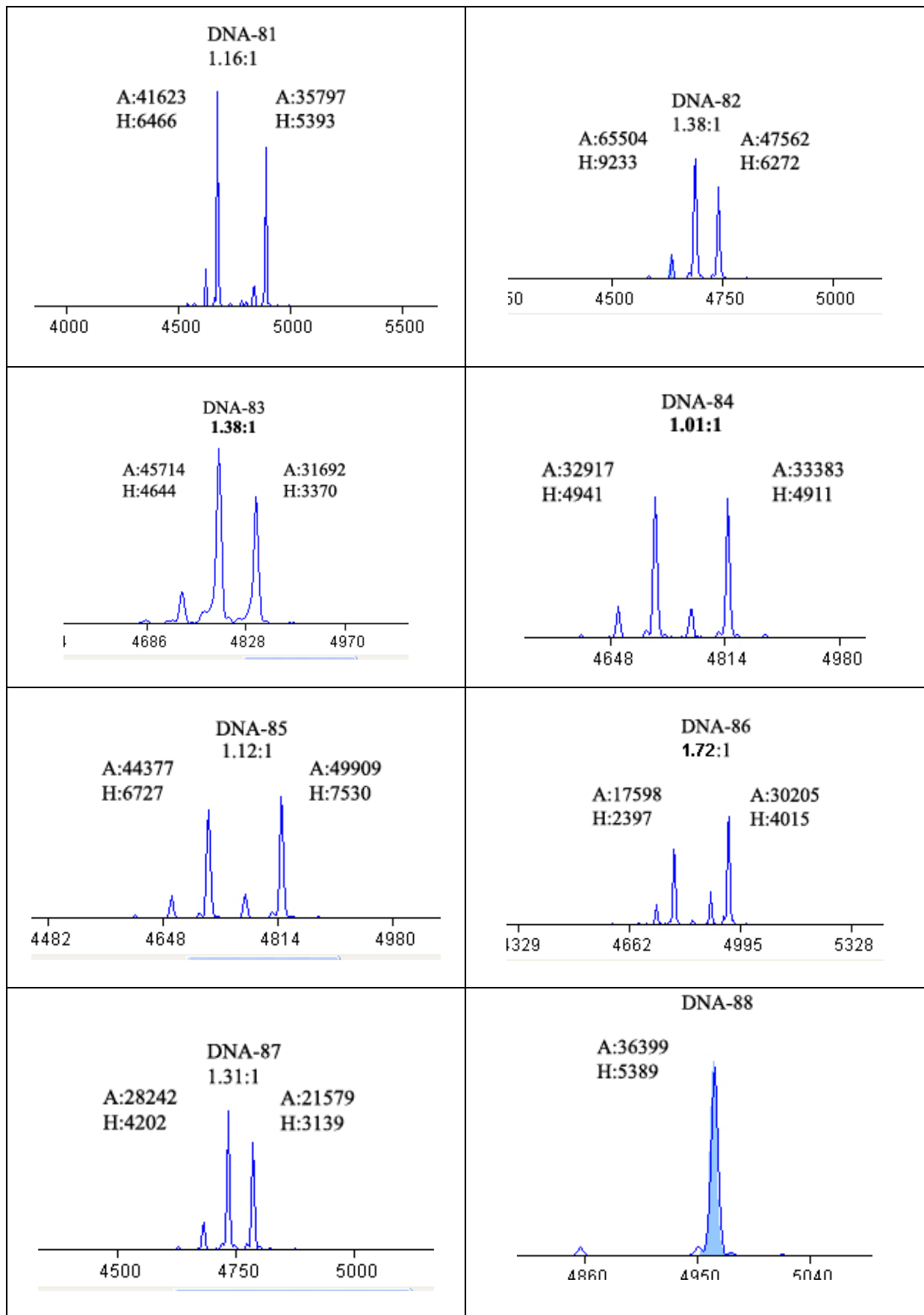


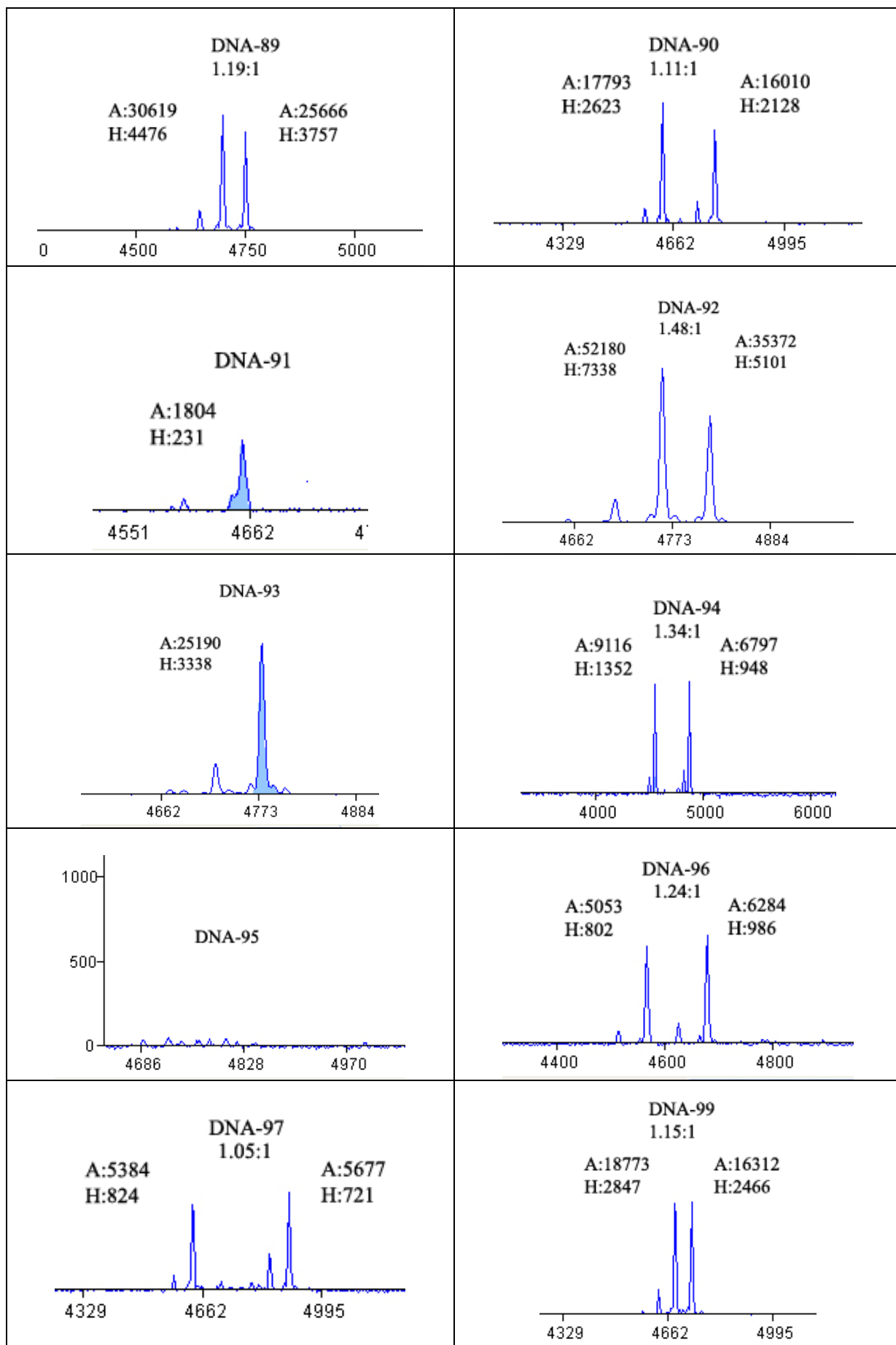


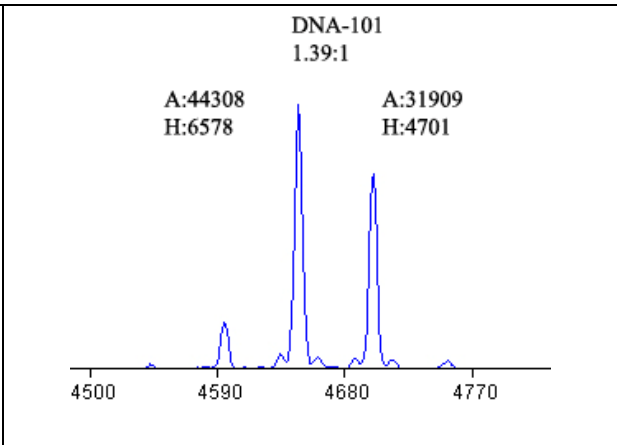
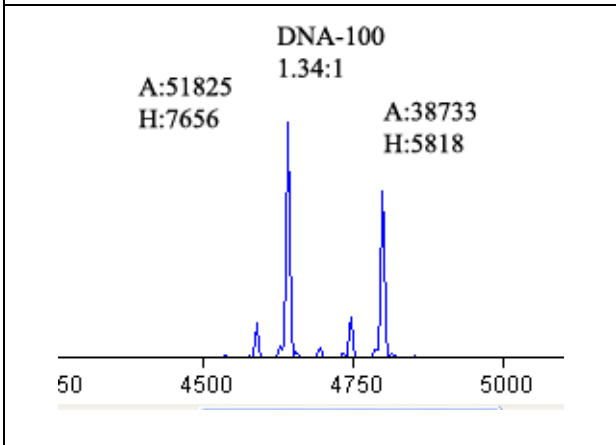
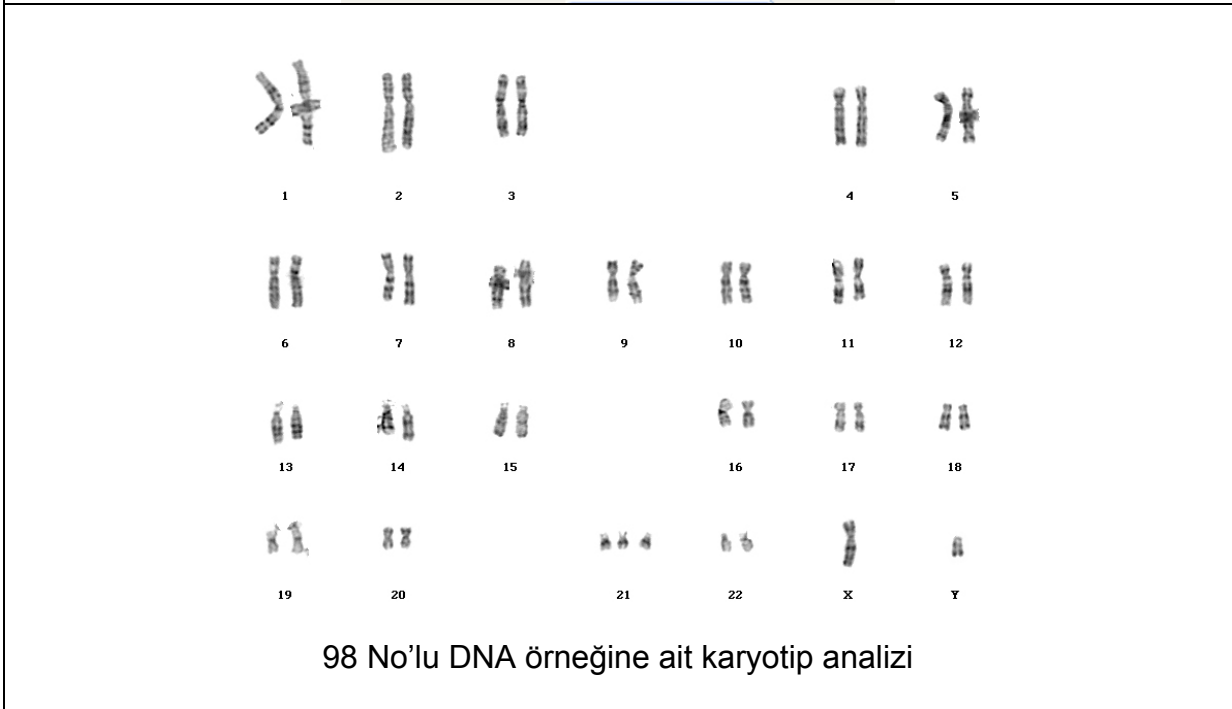
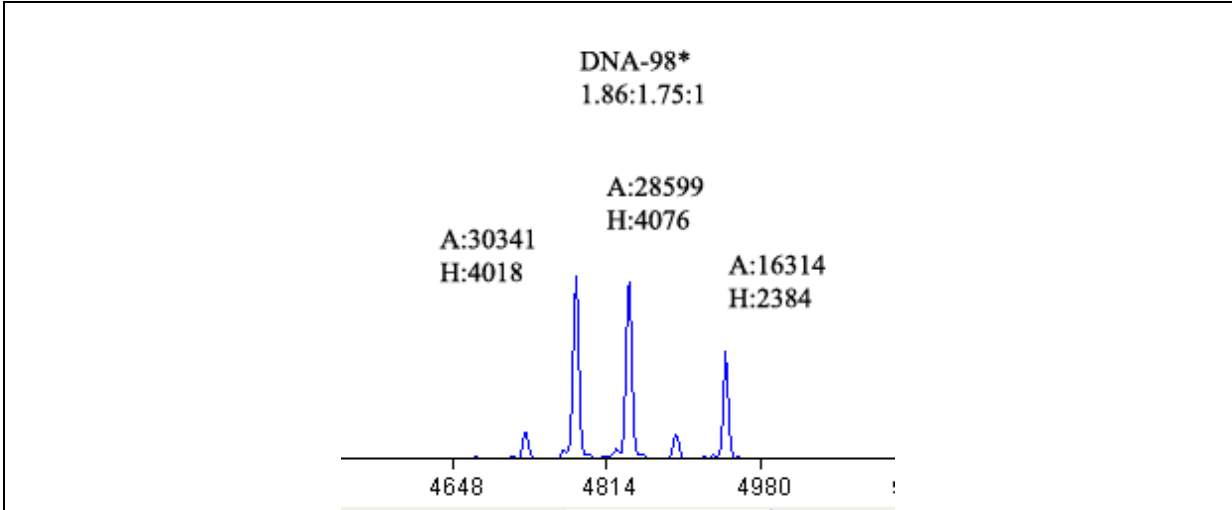


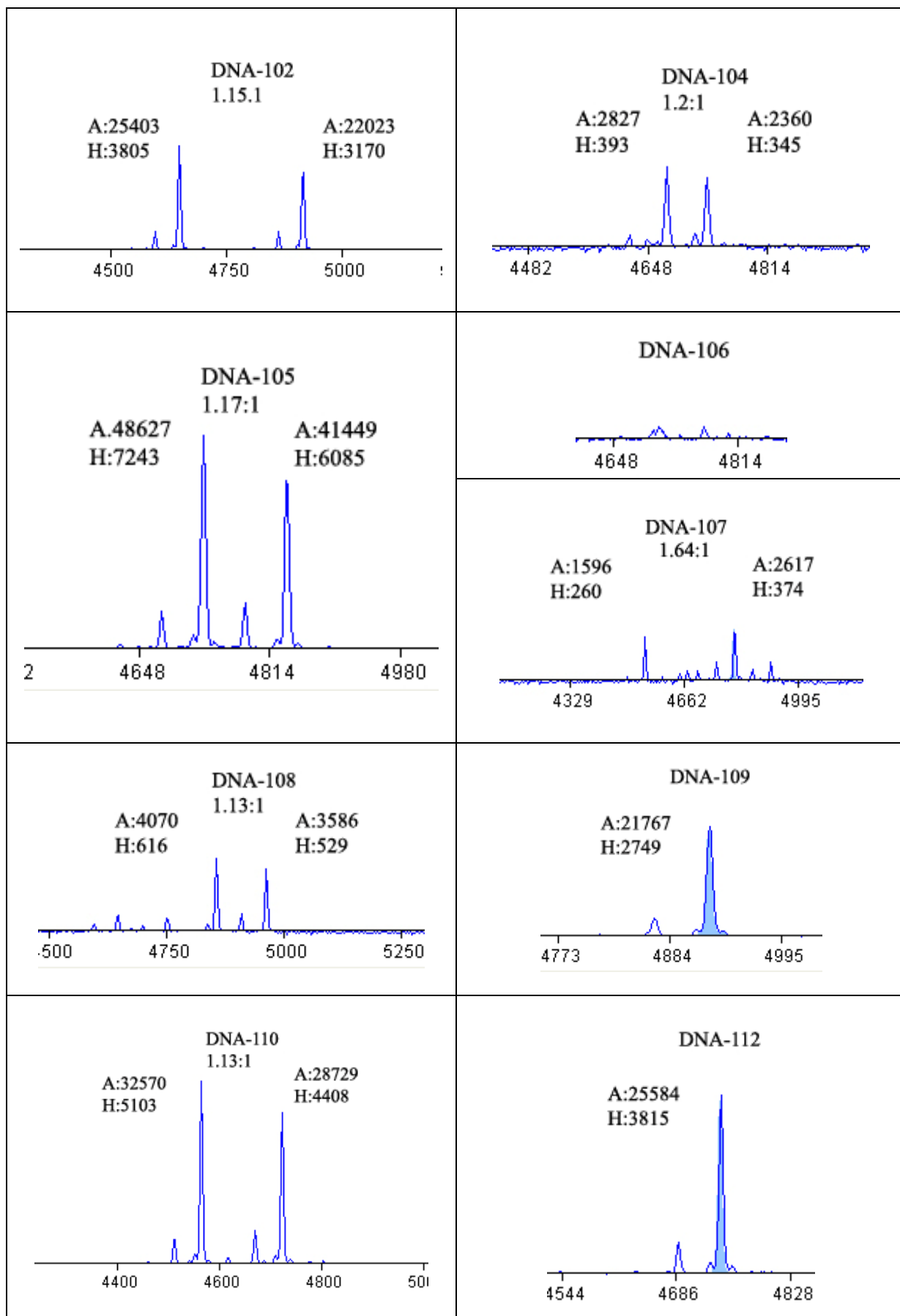
76 No'lu DNA örneğine ait karyotip analizi

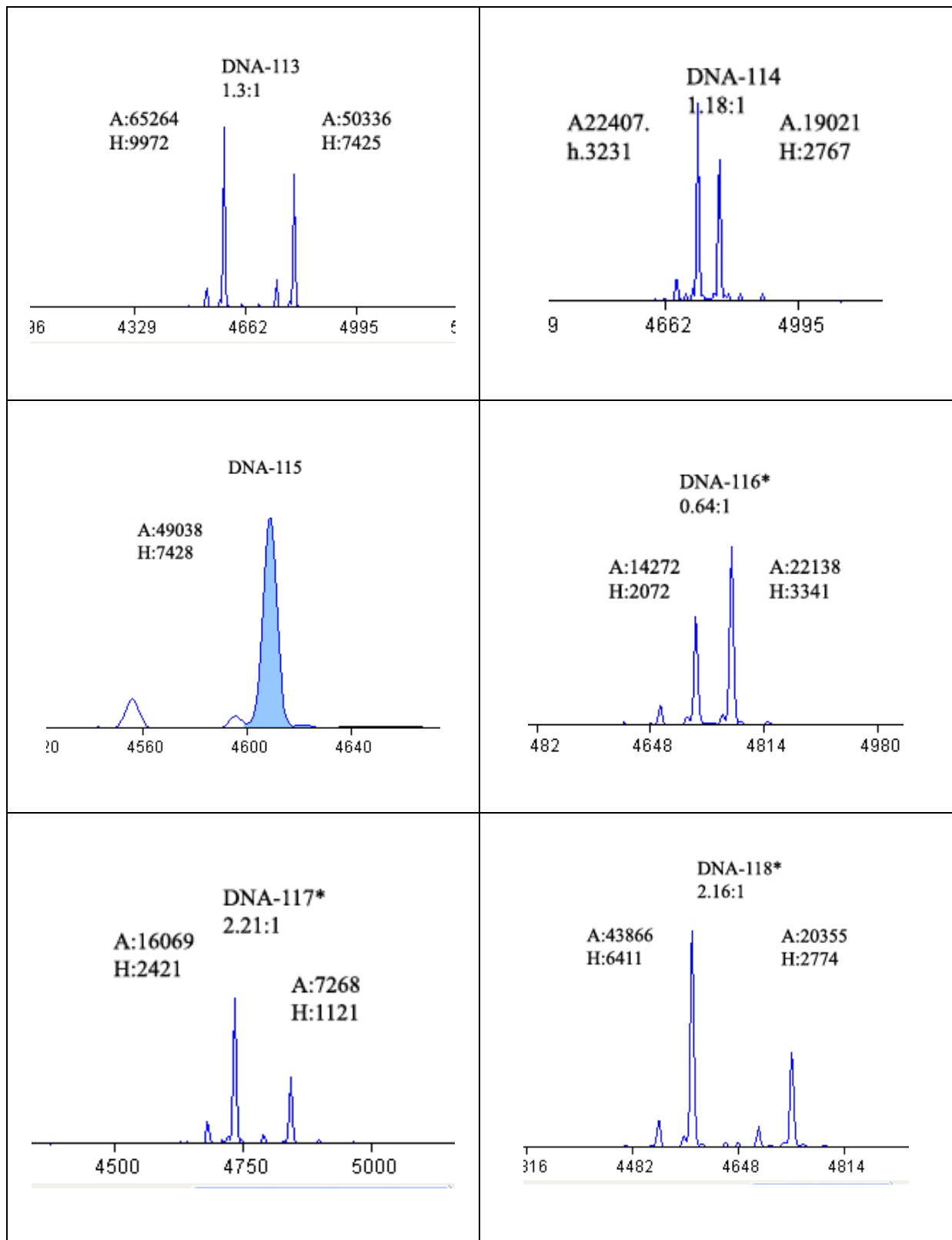






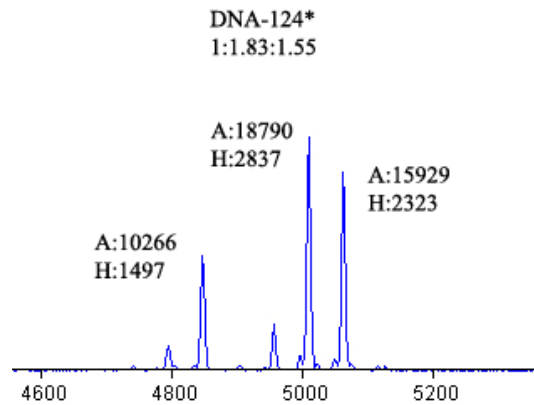
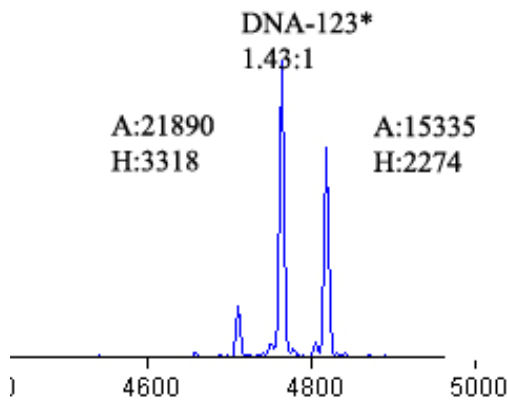
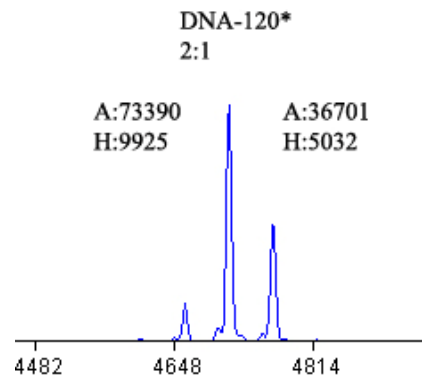
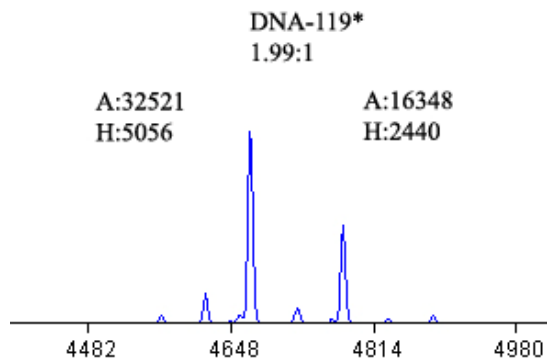




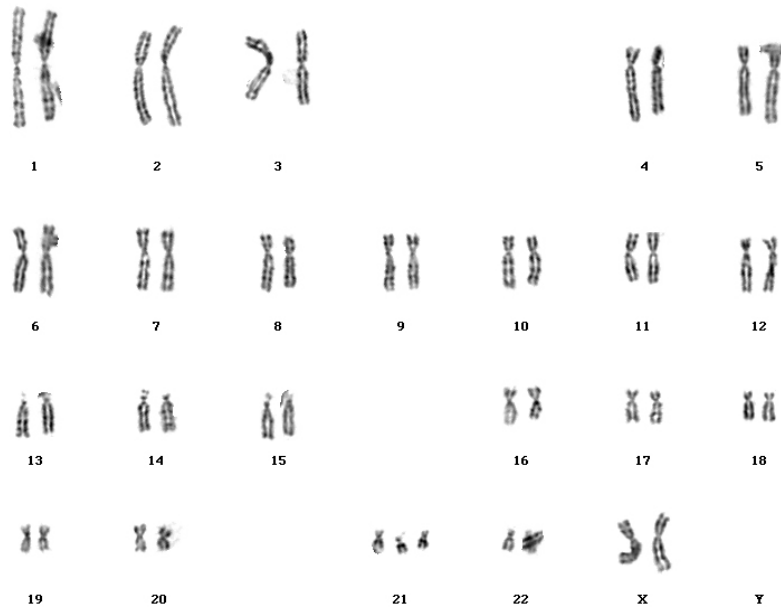




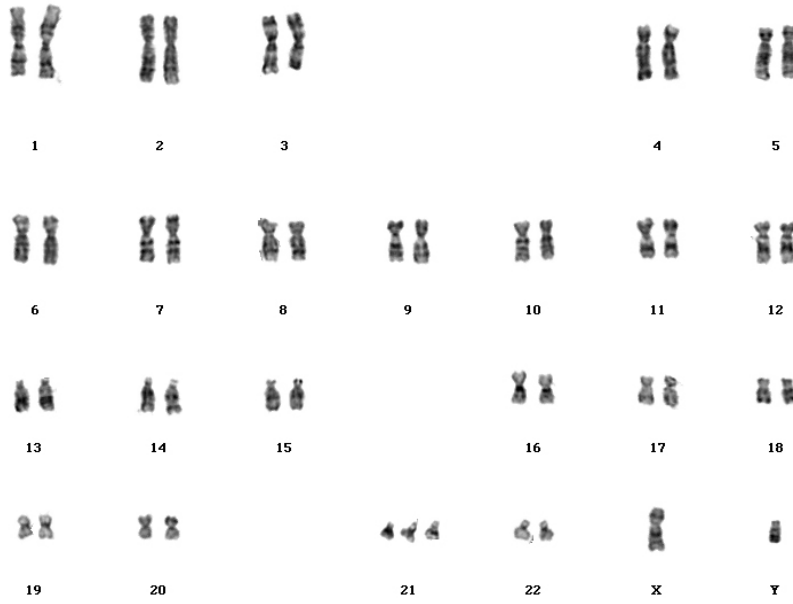
117 No'lu DNA örneğine ait karyotip analizi



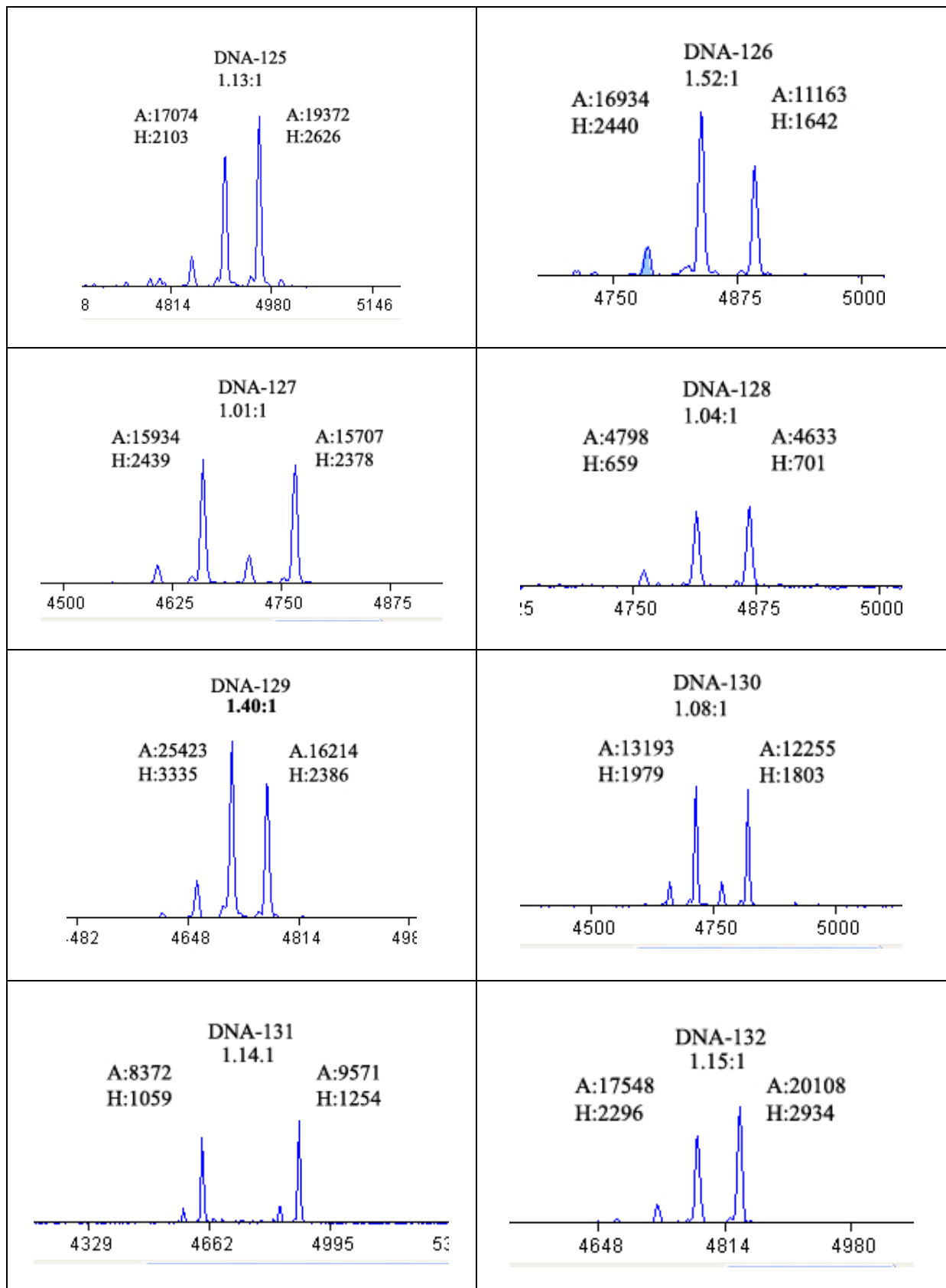


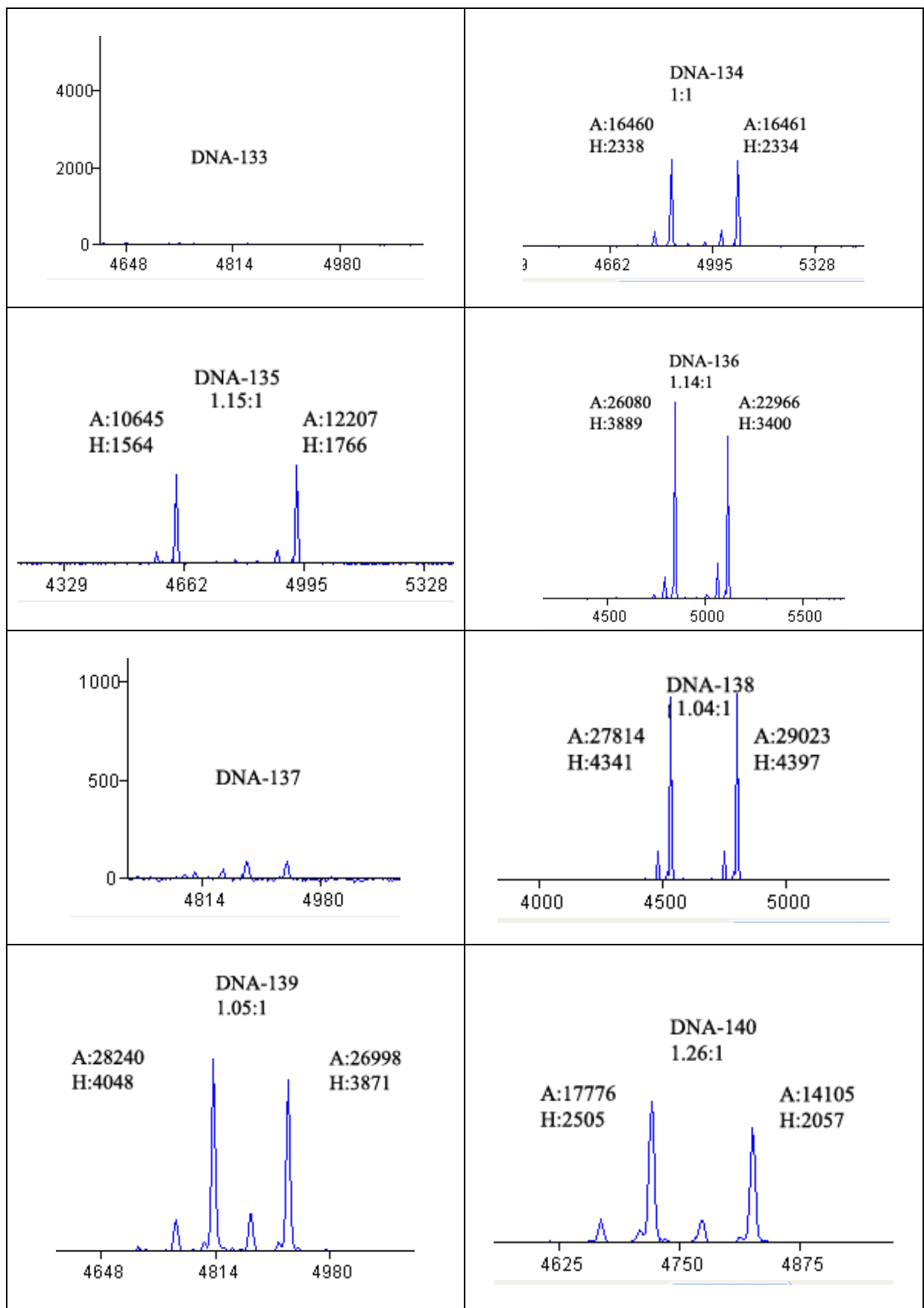


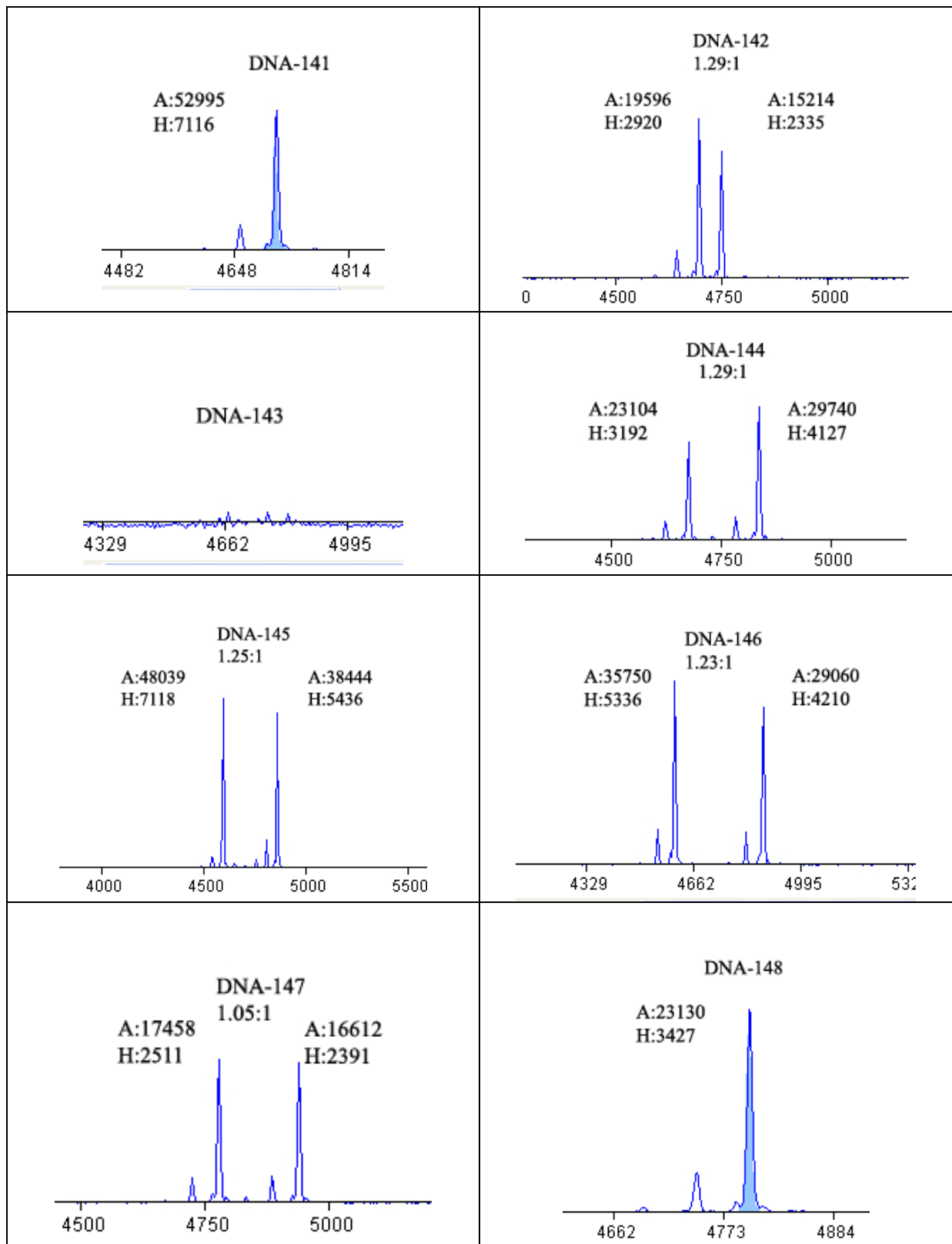
123 No'lu DNA örneğine ait karyotip analizi



124 No'lu DNA örneğine ait karyotip analizi







## 10. KAYNAKLAR:

- Abramsky L, Chapple J. 47,XXY (Klinefelter syndrome) and 47,XYY: estimated rates of an indication for postnatal diagnosis with implications for prenatal counselling. *Prenat Diagn.* 1997;17:363–368.
- ACOG Practice Bulletin. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol.* 2001;97(5 Pt 1):suppl 1-12.
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J, et al. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenatal Diagnosis* 1997;17:1299 – 1311.
- Aksakoğlu G. Sağlıkta Araştırma ve özmlleme. İzmir: D.E.. Rektrlk Basımevi, 2006:294-95.
- Andonova S, Vazharova R, Dimitrova V, et al. Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria, estimation of applicability of 6 STR belirleyicis on chromosomes 21 and 18. *Prenat Diagn.* 2004;24:202–208.
- Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, et al. Fetal blood sampling–indication-related losses. *Prenat. Diagn.* 1998;18:934–940.
- Başaran N (ed): Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon. 1996. 57-66. Eskişehir
- Beers MH, Berkow R. The Merck Manual. In: Gynecology and obstetrics, 17th ed. Philadelphia: National Publishing Company, 1999;2005–2013.
- Benacerraf BR. The second-trimester fetus with Down syndrome: detection using sonographic features. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 1996;7:147-155.
- Bili C, Divane A, Apessos A, et al. Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn.* 2002;22:360–365.
- Blake D, Tan SL, Ao A. Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. *Mol. Hum. Reprod.* 1999;5:1166–1175.

- Brambati B, Simoni G. Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet* 1983;1:586.
- Brambati B, Tului L, Cislighi C, et al. First 10 000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat Diagn.* 1998;18:255-266.
- Brun JL, Gangbo F, Wen ZQ, et al. Prenatal diagnosis and management of sex chromosome aneuploidy: a report on 98 cases. *Prenat Diagn.* 2004;24:213–218.
- Bryndorf T, Christensen B, Vad M, et al. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat. Diagn.* 1997;17:333–341.
- Celi FS, Cohen MM, Antonarakis SE, et al. Determination of gene dosage by a quantitative adaptation of the polymerase chain reaction (qd-PCR): rapid detection of deletions and duplications of gene sequences. *Genomics* 1994;21:304-310.
- Chard T, Macintosh MCM. Screening for Down's syndrome. *J. Perinat. Med.* 1995;23:421-436.
- Chard T, Macintosh MCM. Screening for Down's syndrome. *J. Perinat. Med.* 1995;23:421-436.
- Chen CP, Chern SR, Wang W. Rapid determination of zygosity and common aneuploidies from amniotic fluid cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction following genetic amniocentesis in multiple pregnancies. *Hum. Reprod.* 2000;15:929–934.
- Chiu RW, Lo YM. Application of fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002;2:32-40.
- Christian SM, Koehn D, Pillay R, et al. Parental decision following prenatal diagnosis of sex chromosomes aneuploidies. *J Obstet Gynecol.* 2000;10:5–7.
- Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:1001–1006.

- Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, et al. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:1042–1045.
- Cirigliano V, Lewin P, Szpiro-Tapies S, et al. Assessment of new belirleyicis for the rapid prenatal detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann. Hum. Genet.* 2001b;65:421–427.
- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, et al. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat. Diagn.* 1999;19:1099–1103.
- Cirigliano V, Voglino G, Cañadas M.P, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18 000 consecutive clinical samples. *Molecular Human Reproduction* 2004;10:839-846.
- Copel JA, Bahado-Singh RO. Prenatal screening for Down Syndrome-A search for teh family's values. *N Engl J Med.* 1999;341:521-522.
- Comas Gabriel C, Galindo A, Martinez JM, et al. Early prenatal diagnosis of major cardiac anomalies in a high risk population. *Prenat Diagn.* 2002;22:586–593.
- Cuckle H. Biochemical screening for Down syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92:97–101.
- D'Alton ME, Malone FD, Chelmow D, et al. Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997;176:769–776.
- Divane A, Carter NP, Spathas DH, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells sing five-colour fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn.* 1994;14:1061–1069.
- Donague C, Angharad R, Mann K, et al. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. *Prenat Diagn.* 2003;23:201–210.
- Dudarewicz L, Holzgreve W, Jeziorowska A, et al. Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet.* 2005;46:207-15.
- Eiben B, Trawicki W, Hammans W, et al. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat. Diagn.* 1998;18:901–906.

- Eiben B, Trawicki W, Hammans W, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of >3000 cases. *Fetal Diagn Ther.* 1999;14:193-7.
- Elles R, Mountford R. Molecular Diagnosis of Genetic Diseases. In: Mann K. *Prenatal Detection of Chromosome Aneuploidy by Quantitative Fluorescence-PCR*, 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004:141–56.
- Evans MI, Ebrahim SAD, Berry SM, et al. Fluorescent in situ hybridization utilization for high risk prenatal diagnosis: a trade-off among speed, expense, and inherent limitations of chromosomes specific probes. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1055–1057.
- Ferguson-Smith MA, Yates JRW. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a European collaborative study on 52,965 amniocentesis. *Prenat Diagn.* 1984;4:5–44.
- Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl* 1992;2:1-9.
- Filly RA. Obstetrical sonography: The best way to terrify a pregnant woman. *J Ultrasound Med* 19:1-5, 2000.
- Findlay I, Toth T, Matthews P, et al. Rapid trisomy diagnosis (21, 18 and 13) using fluorescent PCR and short tandem repeats: applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1998;15:266–275.
- Gersen SL, Keagle MB. *The Principles of Cytogenetics*, Humana Press, New Jersey, 2005.
- Grimshaw GM, Szczepura A, Hulte'n M, et al. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess.* 2003;7:1–77.
- Haddow JE, et al. Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *NEJM* 1998;338:955-961.
- Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, et al. Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin A. *J Med Screen* 1998;5:115-9.
- Hall B. Mongolism in newborn infants. *Clin Pediatr.* 1966;5:4.
- Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis today. *Hum Reprod.* 1996;11:139-151.



- Harris RA, Washington AE, Nease RF, et al. Cost utility of prenatal diagnosis and the risk-based threshold. *Lancet* 2004;363: 276–782.
- Hearne CM, Ghosh S, Todd JA. Microsatellites for Linkage Analysis of Genetic Traits. *Trends in Genetics*. 1992;8:288-294.
- Heinrich M, Müller M, Rand S. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *International Journal of Legal Medicine* 2004;118:361-363.
- Holzgreve W. Genetic testing in pregnancy. *Ther Umsch* 2003;60:455-61.
- Howe DT, Kilby MD, Sirry H, et al. Structural chromosome anomalies in congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn*. 1996;16:1003–1009.
- <http://www.biotechnology.uwc.ac.za>
- <http://www.ds-health.com/prenatal.htm>
- Hu Y, Zheng M, Xu Z, et al. Quantitative real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. *Prenatal Diagnosis* 2004;24:704-7.
- Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction*. 2003;126:279-297.
- Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. *PCR Protocols 3–12* (Editor: White T.J.) Academic Pres, 1990.
- Jacobs PA. Correlation between euploid structural chromosome rearrangements and mental subnormality in humans. *Lancet* 1974;249:164–167.
- Jalal SM, Law ME, Carlson RO, et al. Prenatal detection of aneuploidy by directly labeled multicolored probes and interphase fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc*. 1998;73:132-7.
- Jenderny J, Schmidt W, Hecher K, et al. Increased nuchal translucency. Hydrops fetalis and Hygroma colli. A new strategy for early fetal aneuploidy detection. *Fetal Diagn Ther*. 2001;16:211–214.
- Jones KL. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations*, 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006:7–9.
- Kidd KK, Ruano G. Optimizing PCR. *PCR 2. A Practical Approach*. 1-22, (Editors: McPherson M.J., Hames B.D., Taylor G.R) Oxford University Pres, 1994
- Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet*. 1992;51:55–65.

- Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, et al. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18 or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet.* 1991;49:112–119.
- Lee HH, Chang JG, Lin SP, et al. Rapid detection of trisomy 21 by homologous gene quantitative PCR (HGQ-PCR). *Hum Genet.* 1997;99:364-7.
- Lee MH, Ryu HM, Kim DJ, et al. Rapid prenatal diagnosis of down syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. *J Korean Med Sci,* 2004;19:341-344.
- Leung WC, Chitayat D, Seaward G, et al. Role of amniotic fluid interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in patient management. *Prenat Diagn.* 2001;21:327–332.
- Leung WC, Lau ET, Lao TT, et al. Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome? *Obstet Gynecol.* 2003;101:856–861.
- Leung WC, Lau ET, Lao TT. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4:333–337.
- Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;17:115-8.
- Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, et al. Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27427 prenatal diagnoses. *Prenatal Diagn.* 2000;20:1-6.
- Lippman A, Tomkins DJ, Shime J, et al. Canadian multicentre randomized clinical trial on chorionic villus sampling and amniocentesis. Final report. *Prenat Diagn.* 1992;12:385–408.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62:768–775.
- Lubin MB, Elashoff JD, Wang SJ, et al. Precise gene dosage determination by polymerase chain reaction: theory, methodology, and statistical approach. *Molecular and Cellular Probes* 1991;5:307-317.
- Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M, et al. QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in central and eastern Europe. *J Histochem Cytochem* 2005;53:371-373.

- Mann K, Donaghue C, Fox SP, et al. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *European Journal of Human Genetics* 2004;12:907–915.
- Mann K, et al. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy ACC Best Practice Guidelines. 2005.
- Mann K, Ogilvie CM. Prenatal detection of chromosome disorders. *Lancet* 2001;358:1646.
- Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 1993;2:43-50
- Marteau TM, Dormandy E. Facilitating informed choice in prenatal testing: how well are we doing? *Am J Med Genet.* 2001;10:185–190.
- Marteau TM. Prenatal testing: towards realistic expectations of patients, providers and policy makers. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;19:5–6.
- Miny P, Heinimann K, Tercanli S, et al. Genetic testing in pregnancy. *Ther Umsch* 2003;60:455–61.
- Mostulsky V, Luo HY. Human genetics. Beijing: People's Health Publishing House. 1997:52-63.
- Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, et al. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Human Reproduction Update* 2004;10: 541-8.
- Nielsen J, Wohlert M, Faaborg-Andersen J. Incidence of chromosome abnormalities in newborn children: comparison between incidence in 1969-1973 and 1980-1982 in the same area. *Hum Genet.* 1982;61:98–104.
- Norton ME. Biochemical and ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Sem. Perinatol.* 1994;18:256–265.
- Nowacka J, Helszer Z, Walter Z, et al. Adaptation of PCR technique for quantitative estimation of genetic material from different regions of chromosome 21 in cases of trisomy 21. *Acta Biochimica Polonica* 2004;51:995-1001.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Tıbbi Genetik*. Doç. Dr. Boduroğlu K, ed; Prenatal Tanı (içinde). İstanbul: Güneş Kitabevi, 2005:359–74.
- Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, et al. Rapid Prenatal Diagnosis of Aneuploidy Using Quantitative Fluorescence-PCR (QF-PCR). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005;53:285-288.

- Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Path Biol.* 2003;51:156–160.
- Outcome of cases of de novo structural rearrangements diagnosed at amniocentesis. *Prenat Diagn.* 1984;4: 69–75.
- Passarge E. Renkli genetik atlası. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 343-345.
- Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, et al. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2000;20:215-20.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, et al. Quantitative fluorescent PCR for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997;177:899–906.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J. Med. Genet.* 1999;36:300–303.
- Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod.* 1999b;5:1176–1179.
- Pertl B, Weitgasser U, Fopp S, et al. Rapid detection of trisomies 21 and 18 and sexing by quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Genet.* 1996;98:55–59.
- Pertl B, Yau SC, Sherlock J, et al. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet*, 1994;343:1197–1198.
- Petrou S and Mugford M. Should prenatal diagnostic testing be offered to all pregnant women on economic grounds? *Lancet* 2004;363:258–259.
- Petticrew MP, Sowden AJ, Lister-Sharp D, et al. False-negative results in screening programmes: systematic review of impact and implications. *Health Technol Assess.* 2000;4:1–120.
- Pont-Kingdon G, Lyon E. Rapid detection of aneuploidy (trisomy 21) by allele quantification combined with melting curves analysis of single-nucleotide polymorphism loci. *Clin Chem.* 2003;49:1087-1094.
- Powell KJ, Grudzinskas JG. Screening for Down syndrome in the first trimester. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995;7:1413-1417.
- Quaife R, Wong LF, Tan SY, et al. QF-PCR based prenatal detection of aneuploidy in a southeast Asian population. *Prenat Diagn.* 2004;24:407–413.

- Rebello MT, Hackett G, Smith J, et al. Extraction of DNA from amniotic fluid cells for the early prenatal diagnosis of genetic disease. *Prenatal Diagnosis* 1991;11:41-6.
- Roberts E, Ely A, Hulten M, et al. The impact of FISH/PCR technology on routine prenatal diagnosis for chromosome abnormality. *Cytogenet Cell Genet.* 1999;85:57-58.
- Rotmensch S, et al. Prenatal sonograph findings in 187 fetuses with Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 1997;17:1001-1009.
- Sacchetti L, Calcagno G, Coto I, et al. Efficiency of two different nine-loci short tandem repeat systems for DNA typing purposes. *Clin Chem.* 1999;45:178-183.
- Salk D, Disteché C, Stenchever MR. Routine use of Chang medium for prenatal diagnosis improved growth and increased chromosomal breakage. *Am J Hum Genet.* 1983;35:151A.
- Saller DN, Canick JA. Maternal serum screening for fetal Down syndrome: clinical aspects. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1996;39:783-792.
- Samura O, Sohda S, Jhonson KL, et al. Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences. *Clinical Chemistry* 2001;47:1622-26.
- Schmidt W, Jenderny J, Hecher K. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reproduction* 2000;6:855-860.
- 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.
- Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M. et al. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann. Hum. Genet.* 1998;62:9-23.
- Simoni G, Brambati B, Danesino C, et al. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet.* 1983;63:349-356.
- Slater HR, Bruno DL, Ren H, et al. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet.* 2003;40:907-912
- Smith-Bindman, et al. Second-trimester ultrasound to detect fetuses with Down syndrome. *JAMA* 2001;285:1044-1055.

- Snijders RJ, Nobel P, Sebire N, et al. Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet* 1998;352:343-6.
- Snijders RJM, Nicolaides KH. *Ultrasound Markers for Fetal Chromosomal Defects*. Parthenon Publishing Group, New York. 1996.
- Snijders RJM, Noble P, Sebire N, et al. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Lancet* 1998;352:343–346.
- Snustad DP, Simmons MJ, *Principles of Genetics*, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2003.
- Spencer JW, Cox DN. A comparison of chorionic villi sampling and amniocentesis: acceptability of procedure and maternal attachment to pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1988;72:714–719.
- Spencer K, de Kok JB, Swinkels DW. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. *Prenat Diagn.* 2003;23:580-3.
- Stewart TI, Malone FD. First trimester screening for aneuploidy: nuchal translucency sonography. *Semin Perinatol.* 1999;23:36-381.
- Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. First Ed. Bios Scientific Pub. Ltd. 1996.
- Temizkan G, Arda N, ed. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2004:101-110.
- Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridisation (FISH): two year multicentre retrospective study and review of literature. *Prenat Diagn.* 2001;21:293–301.
- The Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. *Periodic Health Examination, 1996 update: 1. Prenatal screening for and diagnosis of Down syndrome.* *Can Med Assoc J.* 1996;154:465-79.
- The Utah Marker Development Group. A Collection of Ordered Tetranucleotide-Repeat Belirleyicis from the Human Genome. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;57:619-628.

- Toth T, Findlay I, Papp C, et al. Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J. Med. Genet.* 1998;35:126–129.
- Tran N, Bharaj BS, Diamandis EP, et al. Short Tandem Repeat Polymorphism and Cancer Risk: Influence of Laboratory Analysis on Epidemiologic Findings. *Cancer Epidemiology Biobehavioral & Prevention* 2004;13:2133-2140.
- Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet.* 1991;7:149–154.
- Valero R, Marfany G, Gil-Benso R, et al. Molecular characterization of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J Med Genet.* 1999;36:604-9.
- Verma L, Macdonald F, Leedham P, et al. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet*, 1998;352:9–12.
- Vogel F, Motulsky A. *Human Genetic Problems and Approaches*. Third Ed. Springer-Verlag, 1997.
- Voglino A, Marongiu MM, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies. *The Lancet* 2002;359:442.
- Von Eggeling F, Freytag M, Fahsold R, et al. Rapid detection of trisomy 21 by quantitative PCR. *Hum Genet.* 1993;91:567–570.
- Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med.* 1999;341:461-7.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991;49:995–1013.
- Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet.* 1993;52:854–865.
- Wenstrom KD. Aneuploidy screening: the changing scene. *Obstet Gynecol.* 2003;101:840–841.
- Whiteman DAH, Klinger K. Efficiency of rapid in situ hybridization methods for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities causing birth defects. *Am J Hum Genet.* 1991;49:A1279.
- Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, et al. Instability of Short Tandem Repeats (Microsatellites) in Human Cancers. *Nature Genet*, 6:152-156, 1994}

- Yang YH, Nam MS, Yang ES. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21. *Yonsei Med J.* 2005;46:193-197.
- Yang YH, Nam MS, Yang ES. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21. *Yonsei Med J.* 2005;46:193-197.
- Yoon HR, Park YS, Kim YK. Rapid prenatal detection of Down and Edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeat belirleyicis. *Yonsei Med J.* 2002;43:557-566.
- Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W. Prenatal identification of fetal genetic traits. *Lancet.* 2001;357:310-1.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Obstet Gynaecol.* 2000;107:766-9.
- Zimmermann B, Deutschland A. *Molecular Diagnosis in Prenatal Medicine.* Basel,2004:25-42.
- Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, et al. Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21. *Clin Chem.* 2002;48:362–363.