

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman: Prof. Dr. A. Coşkun YORULMAZ
2. Danışman: Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU

MATERNAL SİRKÜLASYONDAKİ SERBEST FETAL DNA
İLE
PRENATAL DÖNEMDE BABALIK TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu AYHAN
Biyolog

İstanbul – 2014

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman: Prof. Dr. A. Coşkun YORULMAZ
2. Danışman: Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU

MATERNAL SİRKÜLASYONDAKİ SERBEST FETAL DNA
İLE
PRENATAL DÖNEMDE BABALIK TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu AYHAN

Biyolog

İstanbul – 2014

İstanbul, 17 Haziran 2014

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Duygu AYHAN'ın,

“Maternal Sirkülasyodaki Serbest Fetal DNA ile Prenatal Dönemde Babalık Tayini”

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. Salih CENGİZ
Jüri Başkanı

Prof. Dr. A. Coşkun YORULMAZ
Danışmanı

Doç. Dr. Gökhan ERSOY
Üye

Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU
Üye

Yard. Doç. Dr. Y. Tunç DEMİRCAN
Üye

**Bu tez çalışması 13745 proje numarasıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.*

Prof.Dr. A. Coşkun YORULMAZ, Doç.Dr.E.Hülya YÜKSELOĞLU başta olmak üzere emeği geçen tüm hocalarıma,

İlgisini ve güler yüzünü esirgemeyen ve bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için fırsat tanıyan Uzm.Dr.Ömer MÜSLÜMANOĞLU'na,

Tükenmeyen sabrı ve fedakarlıkları için Bio.Fatih AKYÜZ'e ,

Gece gündüz yanımda olan canım arkadaşım Bio. Gülçin ŞENYİĞİT'e,

Kardeşim ALİ İSMAİL'e

ve..

Onurlu bir yaşam sürebilmenin, elde edilebilecek en yüksek mevkii ve başarılarından daha kıymetli olduğunu öğreten ve hayatıma anlam veren

ANNEM... Emel SEVİNÇ'e...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iii
TABLO DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BABALIK TAYİNİ	3
2.2. PRENATAL TANI	10
2.2.1. Babalık Tayininde Prenatal Tanı Yöntemleri	11
2.2.1.1. Amniyosentez	12
2.2.1.2. Koriyonik Villus Örneklemesi (CVS)	13
2.2.1.3. Kordosentez	15
2.2.1.4. Çölosentez	16
2.3. SİRKÜLER KANDA SERBEST NÜKLEİK ASİTLER	17
2.4. MATERNAL KANDA FETAL HÜCRELER	18
2.4.1. Maternal Kanda Fetal Hücrelerin Sıklığı	19
2.4.2. Maternal Kanda Fetal Hücre Tipleri	20
2.4.2.1. Trofoblastlar	20
2.4.2.2. Eritroblastlar	21
2.4.2.3. Lökositler	21
2.5. MATERNAL KANDA SERBEST FETAL DNA'LAR	22
2.5.1. Maternal Kandaki Serbest Fetal DNA'ların Klinik Uygulamaları	23
2.6. SERBEST FETAL DNA'LAR İLE BABALIK TAYİNİ VE Y-STR TEKNİĞİ	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. ÖRNEK TOPLANMASI	28
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	29
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Ticari Kitler	29

3.2. KAN ÖRNEKLERİNDEN PLAZMA AYRIŞTIRILMASI	30
3.3. KAN VE TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDEN DNA EKSTRAKSİYONU	30
3.3.1. Plazma Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	30
3.3.2. Tükürük Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	31
3.4. PLAZMA ÖRNEKLERİNE DNA ULTRAFİLTRASYONU	32
3.5. REAL-TİME PCR YÖNTEMİ İLE KANTİTASYON	32
3.5.1. Real-Time PCR Döngü Parametreleri ve Veri Girişi	33
3.5.2. Kantitasyon Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Analizi	35
3.6. MULTİPLEKS PCR	36
3.6.1. İzolatların PCR için Hazırlanması	36
3.6.2. PCR Karışımının Hazırlanması	36
3.6.3. PCR Döngü Parametreleri	37
3.7. PCR ÜRÜNLERİNİN KAPİLLER ELEKTROFOREZİ	38
3.7.1. Örneklerin Yükleme ve Yürütme İçin Hazırlanması	38
3.7.2. Örneklerin Yüklenmesi, Yürütülmesi ve Analizi	38
3.8. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	39
4. BULGULAR	40
4.1. OLGULAR	40
4.2. KANTİTASYON SONUÇLARI	41
4.3. MATERNAL PLAZMADAN İZOLE EDİLEN FETAL DNA'NIN Y KROMOZOM PROFİLLERİ	43
4.4. AĞIZ İÇİ SVAP ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN PATERNAL DNA'NIN Y KROMOZOM PROFİLLERİ	50
4.5. BEBEKLERİN AĞIZ İÇİ SVAP ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN DNA'NIN Y KROMOZOM PROFİLLERİ	56
4.6. DNA PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI	58
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	67
7. KAYNAKLAR	69
<i>Özet</i>	80
<i>Summary</i>	81
<i>EKLER</i>	82
<i>ÖZGEÇMİŞ</i>	86

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1** : *Congressus*'da yapılan bir cinsel iktidar muayenesi
- Şekil 2** : Souhtern Blot tekniği ile DNA analizi
- Şekil 3** : PCR Tekniği
- Şekil 4** : 'The Times' ın 23 Ocak 1988 tarihli sayısından
- Şekil 5** : Fetus, uterus ve plasentanın gösterimi
- Şekil 6** : Amniyosentez işlemi
- Şekil 7** : Transservikal CVS
- Şekil 8** : Transabdominal CVS
- Şekil 9** : Kordosentez İşlemi
- Şekil 10** : Çölosentez işlemi
- Şekil 11** : Serbest nükleik asitlerin dolaşıma geçme yolları
- Şekil 12** : Fetüsten anneye hücre geçişi hipotezlerinin mekanizmalarının ve insan plasenta yapısının basitleştirilmiş gösterimi
- Şekil 13** : System Software Setup Tablosuna örnek girişinin tapılması
- Şekil 14** : PCR döngü parametrelerinin ve toplam hacim bilgisinin sisteme girişinin gösterimi
- Şekil 15** : A7 kodlu örneğe ait amplifikasyon plot
- Şekil 16** : Elde edilen Standart Curve Eğrisi
- Şekil 17** : A1 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi
- Şekil 18** : A2 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 19** : A3 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi.

- Şekil 20** : A4 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 21** : A5 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 22** : A6 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 23** : A7 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 24** : B1 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 25** : B2 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 26** : B3 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 27** : B4 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 28** : B5 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 29** : B7 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 30** : C1 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.
- Şekil 32** : C2 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

TABLO DİZİNİ

- Tablo I** : Oluşturulan standartların konsantrasyonları
- Tablo II** : Maternal kandan elde edilen DNA izolatları için RT-PCR döngü parametreleri
- Tablo III** : Maternal kandan elde edilen DNA izolatları için PCR döngü parametreleri
- Tablo IV** : Ağız içi svaplarda elde edilen DNA izolatları için PCR döngü parametreleri
- Tablo V** : Katılımcıların kodları ve gebelik bilgileri.
- Tablo VI** : Maternal kandan elde edilen fetal DNA konsantrasyonları
- Tablo VII** : Pearson Korelasyon analizi sonuçları
- Tablo VIII** : Maternal plazma örneklerinden amplifiye edilen fetal alleller ve ağız içi svap örneklerinden elde edilen paternal allellerin karşılaştırmalı gösterimi
- Tablo IX** : Bebeklerden ve babalarından alınan tükürük örneklerinden amplifiye edilen allellerin karşılaştırmalı gösterimi

KISALTMALAR

ABI Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CVS Chorionic Villus Sampling (Koriyonik Villus Örneklemesi)
DNA Deoksiribonükleik asit
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamintetraasetik asit)
PCR Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Rpm Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR Real Time PCR (Eş zamanlı PCR)
STR Short Tandem Repeat (Kısa Ardışık Tekrar)
QIA Qiagen
µl Mikrolitre
ml Mililitre

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Doğum öncesi genetik tanı, son yıllarda hızla ilerleme kaydeden bir araştırma konusudur. 1950'lerde genetik danışmanlık elde olan tek imkândı. Çiftler tanınmış birkaç 'mendelian' geçişli hastalığın tekrarlama riski açısından bilgilendirilmekte ancak bu çiftlere hiçbir tanı ya da işlem yapılmamaktaydı (1). 100 yılı aşkın bir süredir kullanılan 'amniyosentez' tekniğinin genetik araştırma amaçlı ilk kullanımı 1956 yılında rapor edilmiş, *Fuchs ve Riis* (2) 'Barr cisimciği'nin var olup olmadığını inceleyerek bu yolla prenatal cinsiyet tayini yapmayı başarmışlardır. Takip eden yıllarda, Hemofili A, Duchenne Kas Distrofisi gibi cinsiyete bağlı genetik hastalıkların tanıları bu teknik ile konulmuştur. 1968 yılında ise amnion sıvısından kültüre edilen fetal hücreler ile ilk prenatal trisomi 21 tanısı konulmuştur (3). Bu gelişmeleri takiben Koriyonik Villus Örnekleme (CVS) tekniği gündeme gelmiş, 1982-1984 yılları arasında bu teknikle gebeliğin ilk 3 ayında prenatal tanının uygulanabilirliği gösterilmiştir (4).

Babalık tayini ise; 1984'de 'DNA parmak izi- DNA Fingerprint' çalışmaları sonuçlanana kadar, ABO, MN ve Rh sistemlerinde kan gruplarının tespiti ve karşılaştırılmasının ötesine geçememiştir. Bu sistemlerin ayırt etme gücü %40 olasılıkta kalmış ve 1970'lerde İnsan Lökosit Antijenlerinin (HLA) de bu çalışmalara dahil edilmesiyle bu oran ancak %80'lere ulaşmıştır (5,6).

DNA'nın doğrudan moleküler genetik yöntemlerle incelenebilmesi doğum öncesi babalık tayini için de önemli bir gelişme olmuştur. Ancak materyal elde etmek için başvuru amniosentez, CVS ve kordosentez gibi yöntemler hem uygulanabilirlik süreleri, hem de içerdikleri ciddi riskler bakımından özellikle doğum öncesi babalık tayini için olabildiğince nadir kullanılmaktadır (7). Gebeliğin ortalama 15-18nci haftaları arasında uygulanan amniosentez ve 11-13 haftaları arası uygulanan CVS teknikleri yaklaşık olarak %1 oranında abortus riski taşımakta olup 10 ncü haftadan önce uygulanan CVS' lerde ilave olarak ciddi kol ve bacak anomalileri rapor edilmiştir (8-10).

Tüm bu problemler, özellikle adli amaçlı doğum öncesi babalık tayinleri için girişimsel olmayan yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (7). 1893 yılında

Alman araştırıcı *Schmorl*(11) tarafından eklampsi nedeniyle ölen gebe kadınların kan dolaşımında saptanan trofoblastlar ile başlayan çalışmalar, lenfosit, granüositler, eritroblastlar ve hematopoetik kök hücre çalışmaları ile devam etmiştir. Anne kanındaki fetüse ait hücrelerin doğum öncesi genetik tanıda kullanılabilmesi için belli kriterler sağlanmalıdır. Bu hücreler tüm hamile kadınlarda ve gebeliğin erken döneminde yeterli miktarda bulunmalı, bir sonraki gebelikte anne kanında varlıklarını devam ettirmemeli ve maternal hücrelerden ayrımlarını sağlayabilecek kendilerine özgü markerları olmalıdır. Bu kriterlerin hepsinin aynı anda bir hücre tipinde sağlanamamasına ek olarak genetik mozaizm nedeniyle sağlıklı bir karyotip elde edilememesi ve ilave zenginleştirme işlemlerinin gerekliliği gibi sorunlar bu çalışmaları kısıtlamıştır (12).

1997 yılında *Lo ve ark.* (13) anne plazma ve serumunda fetüse ait serbest DNA'ları tespit etmişlerdir. Fetal hücrelere kıyasla miktarlarının fazla olması, ilk trimesterde tespit edilebilmeleri ve doğumdan kısa bir süre sonra maternal kandan temizlenmeleri gibi ek avantajları da olan serbest fetal DNA'lar ile yapılan ilk doğum öncesi babalık tayini, 2008 yılında *Wagner ve ark.* (14) tarafından rapor edilmiştir. Maternal otozomal DNA'nın supresyonu nedeniyle sadece Y kromozomu üzerinde olsa da babalık tayini açısından başarı elde edilmiştir (15,16).

Babalık tayinini zorunlu kılan cinsel saldırı, boşanma gibi adli olaylarda doğum öncesi tespitin, konuyla ilgili birçok soruna çözüm getirebileceği düşünölmektedir. Cinsel saldırı sonucu hamile kalmış bir kadının analiz için gebeliğin ilerleyen aşamalarını beklemek zorunda kalması, uygulanacak girişimsel tekniklerin doğuracağı sağlık problemleri, bir yasal eşin varlığı söz konusu olduğunda gebeliğin devamı hususunda karar verilebilmesi; önüne geçilmesi gereken problemler arasındadır (7). Bu sorunların çözümü adli sürecin hızlandırılmasına da katkıda bulunabilecektir. Bu çalışmanın amacı, anne kanından serbest fetal DNA analizi yöntemiyle doğum öncesi babalık tayininin Türkiye'de rutin uygulamada yer alan kurumlarda kullanılabilirliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BABALIK TAYİNİ:

Adli DNA analizlerin en önemli kullanım alanlarından biri otozomal, mitokondriyal ve Y- kromozomal DNA özelliklerinin değerlendirilmesi ile anne- baba bağlantılı soy bağı tespitinin yapılmasıdır (17). Babalık testi denilen analiz; temelde bir erkeğin, bir çocuğun biyolojik babası olup olmadığının incelenmesidir (18). Bu testlerin bilimsel temeli, tek yumurta ikizleri dışında her bireyin, incelenen gen bölgeleri açısından benzersiz olmasına dayanmaktadır. Mendelian geçiş kuralları, biyolojik olarak yakın kişilerin benzer alleller taşıdıklarını göstermektedir. Bu bağlamda soy bağı tespiti; genetik aktarım kurallarına uygun olarak yarısı anne ve yarısı baba kaynaklı genetik materyalin uyumunun araştırılmasına dayanmaktadır (17).

Bu incelemelerin bilimsel yöntemlerle yapılamadığı dönemlerde birçok farklı ülkenin çözüm için ilginç yasal düzenlemeler yaptıkları bilinmektedir. Eski Roma İmparatorluğu'nda zina, hayat kadınları ile ve ensest ilişki sonucu doğan çocuklar (*incestuosi*), babalardan hiçbir hak talep edememekteydi. VI.yy' da Roma İmparatoru Justinian tarafından hazırlatılan "*corpus iuriscivilis*" ile değişen bu durum, bazı davalarda nafaka talebini mümkün kılmaktaydı. Fakat bu gibi cinsel davalarda, erkeğin dölleme ve erekte olabilme kabiliyeti, "*cogressus*" denilen başhemsire, cerrah ve rahipten oluşan meclisin önünde kanıtlanmak durumundaydı (19). Eski İngiliz ve Amerika Birleşik Devletleri yasalarına göre de; erkek impotansını veya döllenme tarihinde ülke sınırları dışında olduğunu ispatlayamadığı takdirde, doğan çocuğun babası kabul edilmekteydi (18). 1912 yılına kadar Fransa'da, 1942 yılına kadar ise İtalya'da, yalnızca anne kaçırılmışsa ve hamile kalma tarihleri olayla uyumlu ise dava açılması mümkün olabilmekteydi (20). Bu dönemlerde kulak, çene, burun, yüz şekli gibi anatomik özellikler ile bazı fizyolojik ve patolojik benzerlikler kesinliği olmayan yardımcı bulgular olarak kullanılmaktaydı (18).

1575 yılında Rönesansın ünlü Fransız cerrahı Ambroise Paré (1509-1590), anatomik çalışmalarını baz alarak yazdığı makalesinde *congressus*'un karar mekanizmasını eleştirmiş ve insanların tanımadıkları ve korktukları kişilerin önünde cinsel iktidarlılıklarını ispatlayamayacaklarını savunmuş, ancak bu yazılarını yayınlamaya cesaret edememiştir (19).



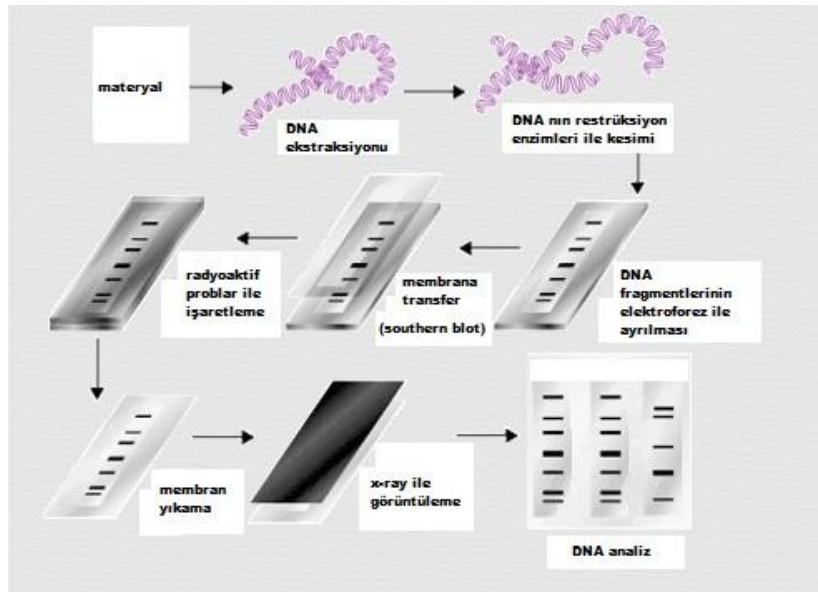
Şekil 1: *Congressus*'da yapılan bir cinsel iktidar muayenesi (Medieval Manuscript, MS W133, folio 277, The Walters Art Museum, Baltimore) (19).

1600'lü yıllarda mikroskobun keşfi ve ardından 1677 yılında Johann Ham'ın (1651-1723) spermatozoayı buluşu önemli birer gelişme olmuştur. 1900'lü yılların başlarında Karl Landsteiner tarafından ABO kan grup antijenlerinin bulunması ve 1920'li yıllarda kan gruplarının kalıtsal olarak aktarıldığının keşfedilmesi ile babalık tayininde nispeten daha güvenilir bilimsel teknikler kullanılmaya başlanmıştır (19). Yalnızca %30'luk bir ayırım gücüne sahip bu sisteme ek olarak, 1927'de MN sistemi ve 1940'da Rh sistemi gibi kalıtsal antijenik özelliklerin keşfedilmesi bu oranı % 40'a çıkarmıştır. Takip eden yıllarda; kırmızı kan hücreleri dışındaki kan hücrelerinde bulunan bir protein olan HLA'nın (human leukocyte antigen) incelenmesi ile %80'lik bir güvenilirlik yüzdesi elde

edilmiştir. Bununla birlikte, sadece birkaç günlük ve fazla miktarda kan ile çalışılabilmesi gibi dezavantajları nedeniyle HLA yöntemi yaygın bir yöntem olarak kullanılamamıştır (5,18,19).

1985 yılında *Jefferys ve ark.*'nın (21) DNA molekülünün kodlama yapmayan bölgelerindeki 'tekrarlayan dizilerin varlığı' varsayımı üzerine kurguladıkları '*DNA Profilleme (DNA Fingerprint-DNA Parmakizi)*' yöntemini geliştirmelerinin ardından, genetik ve adli birçok çalışmanın yanı sıra babalık tayini uygulamalarının da yönü değişmiştir (18).

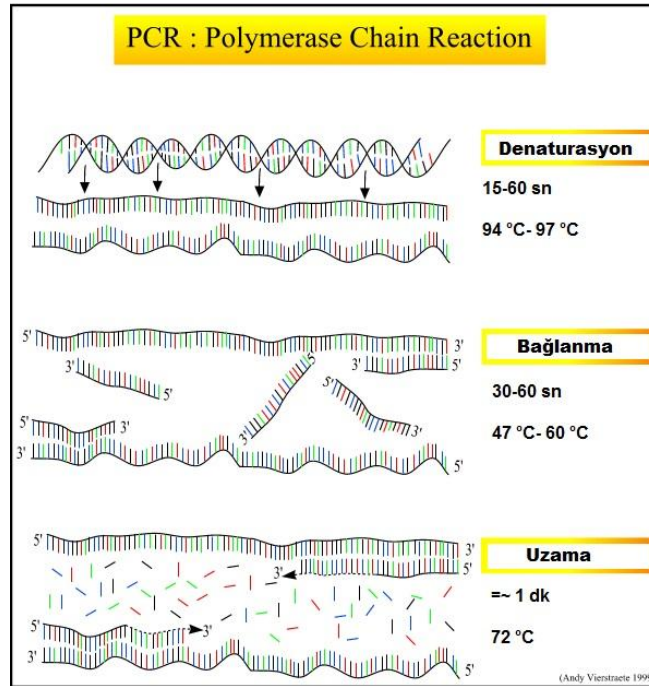
Başlangıçta DNA üzerinde bulunan 'minisatellite' ya da 'Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlanan Diziler (VNTRs)' olarak adlandırılan gen bölgelerinin kişiye özgü tekrar sayıları, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile incelenmekteydi. Bu yöntemin temeli DNA'nın belirli bir dizilişi tanıyan enzimler ile (Restüriksiyon Enzimleri) farklı boyut ve dizilimlere sahip gen parçalarına ayrılması ve bu parçaların elektrik alandan farklı miktarlarda etkilenmeleri prensibine dayanmaktaydı. Elektroforez ile ayrıştırılan bu fragmentler işaretli probolar kullanılarak görünür hale getirilip analiz edilmekteydi (22,23).(Şekil 2).



Şekil 2:SouthernBlot tekniği ile DNA analizi

(URL-1, <http://www.docstoc.com/docs/115701763/Stages-in-DNA-fingerprinting>)

1983'te Kary Banks Mullis'in belirli bir DNA bölgesini milyonlarca kez çoğaltmaya yarayan ve bu sayede ona 1993 Nobel Kimya ödülünü kazandıracak olan 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (PCR) bulmasından sonra DNA analizleri, çok az miktarda dahi kimliklendirme yapılmasını sağlayacak duyarlılığa ulaşmıştır (22). PCR tekniğinde; 10-100 baz çifti uzunluğundaki birimlerin organize bir şekilde 20-50 kez ardarda tekrarlanması sonucunda oluşan VNTR'ler yerine, 3-7 baz çiftinden oluşan ünitelerin 5-25 kez ardına tekrarlanması ile oluşan 'mikrosatellit' ya da 'Sort Tandem Repeat- Kısa Tekrarlı Diziler (STR)' olarak adlandırılan kişiye özgü tekrar dizileri kullanılmaktadır. Temel DNA üzerindeki bu parçacıkların seçilerek çoğaltılmasına, böylelikle kimliklendirme için kullanılacak DNA miktarının artırılmasına dayanan bu tekniğin 3 ana aşaması bulunmaktadır. Kısaca; farklı sıcaklıklarda gerçekleşen enzim aktiviteleri sayesinde önce denatüre edilen DNA'nın belirli bölgelerinin, takip eden bağlanma ve uzama aşamaları sayesinde milyonlarca kopyasının oluşturulması işlemidir (24)(Şekil 3).



Şekil 3: PCR Tekniği

(URL-2, <http://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik/>)

PCR spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. Tekniğin temeli, hücre içindeki DNA replikasyonuna benzer bir prensibe dayanmaktadır. İlk adımda denatüre edilen DNA sarmalı açılmakta ve komplementer iki DNA iplikçığı elde edilmektedir. Denatüre DNA'ya primer adı verilen, bilinen nükleotid dizinli, küçükmoleküllerin eklenmesi ve böylece DNA iplikçiklerinin komplementer dizinleri ile hibritleşmesi ikinci basamağı oluşturur. Bir primer, incelenmek istenen bölgenin hemen başlangıcındaki hedef dizinle hibritleşir. Daha sonra bir DNA polimeraz ile bu primerin hedef dizin boyunca uzaması sağlanır. Böylelikle hedef dizin primer için bir kalıp oluşturur. Ve sonuçta bu hedef dizine komplementer (tamamlayıcı) yeni bir dizin sentezlenir. DNA'yı bu şekilde logaritmik olarak çoğaltarak, 20 kadar PCR döngüsü ile başlangıçtaki kalıbın yaklaşık bir milyon kopyası üretilmektedir (23,24).

Adli DNA kimliklendirme çalışmalarında, aynı ülkenin farklı kriminal laboratuvarları arasında, ayrıca uluslararası suçla mücadele çerçevesinde hukuki yardımlaşmayı sağlayabilmek ve veri paylaşımını anlamlı kılabilmek üzere DNA'nın aynı polimorfik bölgelerinin çalışılması hedeflenmiştir. Bu standartın sağlanabilmesi için ABD'de 1997 yılında CODIS (Combined DNA Index System) adıyla bir DNA veri bankası oluşturulmaya başlanmıştır. CODIS sistemi içinde FBI tarafından belirlenen 13 STR lokusu yer almaktadır. Bu lokuslar: D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO lokuslarıdır. Günümüzde, ceza ya da hukuk davalarında delil teşkil etmek üzere gerçekleştirilen DNA analizlerinde, hangi bölgelerin inceleneceğine dair herhangi bir yasal yaptırım bulunmamasıyla birlikte, kriminal laboratuvarlar Uluslar Arası Polis Birliği (Interpol), Avrupa Adli Bilimler Ağı (ENFSI) gibi uluslar arası meslek örgütlerinin tavsiyelerine bağlı kalmaktadırlar (25,26).

DNA profillemeye tekniğinin adli bilimler alanındaki ilk kullanımı 1986 yılında olmuştur. Leicester'da 1986 yılında tecavüz edilip öldürülen Dawn Ashworth'ın katil zanlısı olarak yargılanan Richard Buckland'ın 1983'de benzer şekilde öldürülen Linda Mann isimli genç kızın ölümü ile de ilgisi olduğunu düşünen polisler Alec Jeffreys ve ekibinden yardım istemişlerdir. Olay yerinden elde edilen semen örnekleri ile Richard Buckland'ın kan örneğinden elde ettikleri DNA profillerini karşılaştıran ekip iki cinayetin

de aynı kişi tarafından işlendiğini onaylamış, fakat bu kişinin Richard Buckland olmadığını tespit etmişlerdir. Takip eden araştırmalar sonucunda Colin Pitchfork'un kan örneği analiz edilmiş ve suçluluğu kanıtlanmıştır (27). DNA profillemeye tekniğinin babalık tayini çalışmalarındaki ilk kullanımı ise 1988 yılında gerçekleşmiştir (5).

'Had it not been for DNA fingerprinting, you might still be at liberty'

Life for sex killer who sent decoy to take genetic text

By Craig Seton

The sex killer of two teenage girls started a life sentence yesterday, five months after he was tagged by the world's first mass screening of potential suspects using genetic fingerprinting.

Leicester Crown Court was told that Colin Pitchfork, aged 27, a married bakery worker, could not be convicted for more than three years. He even denied a plot to avoid taking the genetic test, developed at Leicester University.

Pitchfork persuaded a 6ft law worker, Ian Kelly, of Stuart Street, Leicester, to send in for him when 5,500 males aged 15 to 30 volunteered for a blood test. The geneticist initially cleared Pitchfork, who had convictions for indecent exposure.

Pitchfork, of Littlethorpe, Leicester, pleaded guilty to the rape and murder of Lynda Mann, aged 15, from the neighbouring village of Narborough, in 1983, and the murder of Dawn Ashworth, aged 15, from the adjoining village of Enderby, three years later.

He further admitted two charges of indecent assault and one of conspiracy to pervert the course of justice.

Pitchfork, a married man with two sons, had dropped off his wife at an evening class before attacking his first victim while his baby son was sleeping in his car. After the killing, he had collected up his wife, showing no signs of what he had done.

He was sentenced to two terms of life imprisonment for each murder and 10 years

each to run concurrently, for raising the girls. Mr Justice Cleton said: "Had it not been for genetic fingerprinting, you might still be at liberty."

Kelly, who admitted conspiracy to pervert the course of justice, was jailed for 18 months, suspended for two years, after the court was told he did not know that he was shielding a killer.

Mr Brian Escott Cox, QC, for the prosecution, said that in August 1986, a month after Dawn Ashworth's killing, Richard Buckland, aged 17 from Narborough, was seen lurking near where she died.

Mr Buckland was arrested. Police were convinced that the same local man had killed both girls.

In October, samples of the killer's semen, taken from the girls, and blood from Mr Buckland, were sent for analysis. Mr Escott Cox said: "The answer which came back was not the one the police expected. Undoubtedly the same man raped both girls, but it was not Buckland."

Proceedings were dropped and the murder incident room was reopened. All males aged between 15 and 30 from the adjoining villages of Enderby, Narborough and Littlethorpe were asked to provide blood samples for genetic fingerprinting.

Mr Escott Cox said more than 5,000 males responded and only two refused. One had a genetic reason, the other was Pitchfork.

Three times last January appointments were made for

him to give a blood sample. Twice he did not turn up.

The court was told he had started posting workmen to take the test for him, offering one £50 and another £200. Finally, Kelly agreed.

On August 30 last year, Kelly admitted to workmen that he had given the sample. A girl in the group told the police and Pitchfork and Kelly were arrested.

Detectives then sent a sample of Pitchfork's blood to be compared with the analysis of semen taken from the murdered girls. They were a perfect match.

Pitchfork was the first murderer in the world to be convicted by genetic fingerprinting. Dr Alec Jeffreys, aged 35, developed genetic fingerprinting, or DNA testing, at Leicester University in 1984.

He discovered a repeatedly occurring sequence among the genes in each person's hereditary chemical, deoxyribonucleic acid (DNA). The DNA fingerprint that results is unique to each individual.

A rapist who was convicted at Bristol Crown Court last October became the first criminal to be sentenced through genetic fingerprinting.

Genetic fingerprinting was used to prove that a man who raped his stepdaughter, aged 11, who later gave birth to a daughter, was the father of her child.

The man was found guilty of rape at the Central Criminal Court yesterday. Sentence was postponed for reports.



Dawn Ashworth (top) and Lynda Mann, teenage victims of Colin Pitchfork, the killer rapist, pictured on his wedding day.

Şekil 4: 'The Times' in 23 Ocak 1988 tarihli sayısından (27)

Nesebin reddi ve babalık gibi konular kamu düzenine ilişkin durumlardır. Babalık konusunda herhangi bir nedenle oluşmuş şüphenin giderilmesi ve soy bağı ile ilgili durumun netleşmesi yasal açıdan bir zorunluluk olmasının yanı sıra bireysel ve sosyal açıdan da önemli yansımaları olan bir sorundur (18). Bu davalarda, Türk Medeni Kanunu'nda belirtilen iki kural saklı kalmak koşuluyla Hukuk Muhakemeleri Kanunu uygulanır. "Hakim maddi olguları re'sen araştırır ve kanıtları serbestçe takdir eder" (TMK m.284/b.1), " Taraflar ve üçüncü kişiler, soybağının belirlenmesinde zorunlu olan

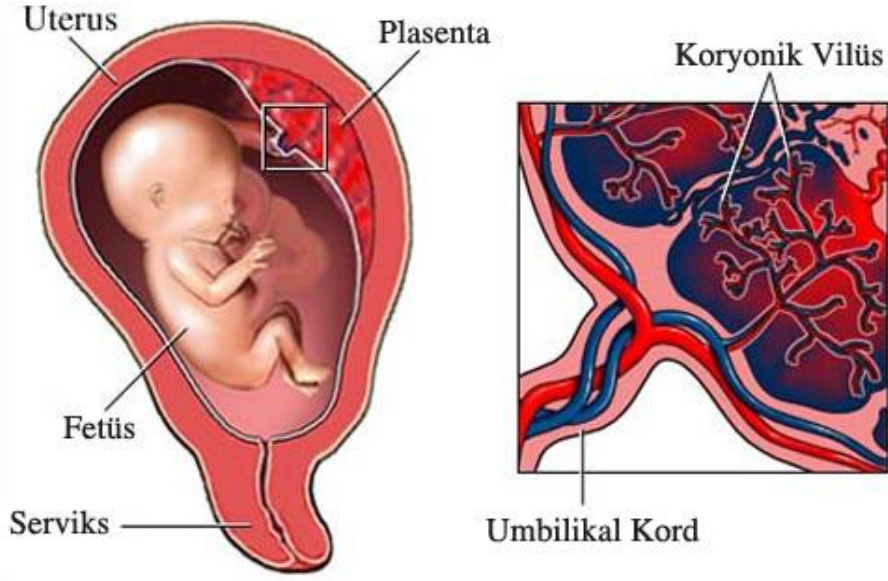
ve sağlıkları yönünden tehlike yaratmayan araştırma ve incelemelere rıza göstermekle yükümlüdürler. Davalı, hakimin ön gördüğü araştırma ve incelemeye rıza göstermezse, hakim durum ve koşullara göre bundan beklenen sonucu, onun aleyhine doğmuş sayabilir” (TMK m.284/b.2). Hukuk Muhakemeleri Kanunu’nun “Soybağı tespiti için inceleme” başlıklı hükmünde; “Uyuşmazlığın çözümü bakımından zorunlu ve bilimsel verilere uygun olmak, ayrıca sağlık yönünden bir tehlike oluşturmamak şartıyla, herkes, soybağının tespiti amacıyla vücudundan kan ve doku alınmasına katlanmak zorundadır. Haklı bir sebep olmaksızın bu zorunluluğa uyulmaması halinde, hakim incelemenin zor kullanarak yapılmasına karar verir. Üçüncü kişi tanıklıktan çekinme hakkı bulunduğunu ileri sürerek bu yükümlülüğten kaçınamaz” denilmektedir (HMK.m.292).

2.2. PRENATAL TANI

Prenatal tanı ailede genetik bir kusurun varlığı veya bulunabilme riskine ilişkin yapılan işlemler bütünü olarak adlandırılır. Temel anlamı ile fetüsdeki hastalıkların doğum öncesi dönemde tespit edilmesi işlemidir. Prenatal tanının amacı, gebeliğin etik açıdan terminasyona uygun olduğu dönem içinde, risk altındaki fetusda, söz konusu genetik hastalıklardan herhangi birinin bulunup bulunmadığını ortaya koymak, aynı zamanda hastalığın varsa doğum öncesi tedavisine ve/ veya doğum sonrası gerekli önlemlerin alınmasına, tedavi planlanmasına olanak sağlamaktır (28). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1992 yılında yaklaşık 14 milyon doğum üzerinden elde ettiği verilere bakıldığında konjenital ve genetik bozuklukların sıklığının bin canlı doğumda 42 olduğu görülmektedir (29). Prenatal tanı yöntemleri ile Down Sendromu, kromozom anomalileri, nöral tüp defekti, Spinabifida, Tay Sachs, orak hücre anemisi, talasemi, kistikfibrozis, kas distrofisi, Frajil X Sendromu gibi doğumsal defektler ve konjenital bozukluklar doğum öncesi erken dönemde belirlenebilmektedir (15).

1896'da *Röntgen WK* (30)'nin X-ışınlarını keşfetmesinin ardından, bu ışınların gebelik sürecinde fetüsün duruş biçimini tanımlayarak ve herhangi bir anomaliyi saptayabilmek için kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Aynı yıl gebe bir kadavranın röntgeni çekilerek fetüs iskeletinin görüntülenmesi başarılmıştır (31). Literatürde fetal defekt belirten ilk prenatal tanı 1917 yılında rapor edilmiştir (32). Prenatal tanının genetik alanda ilk kullanımı ise 1960'larda gerçekleşmiş, *Steele ve Breg* (33) amniyotik sıvıdan kültüre ettikleri hücreler ile bir fetüsün kromozom yapısını belirlemişlerdir. Ardından koriyonikvilüs örnekleme (CVS) ve perkütan umbilikal örnekleme 1970'lerde ve 1980'lerde kullanıma girmiştir (34).

Prenatal tanıda anne çevre, fetus ise hasta olarak kabul edilmektedir. Buradaki en önemli karakteristik doktorun hasta yani fetus ile doğrudan temas edememesidir. Anne üzerinden yapılacak müdahaleler ve yaklaşımlar bebeği doğrudan etkileyecektir (Şekil 2). Bu sebeple özel tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Prenatal tanı testleri tarama ve tanı testleri olarak iki grupta değerlendirilebilir. Anne serumu taranması, ultrasonografi gibi girişimsel olmayan (non-invaziv) yöntemler tarama testleri içinde yer alırken, koriyonikvillus örnekleme (CVS), amniyosentez ve kordosentez gibi girişimsel (invaziv) yöntemler ise tanı testleri içerisinde yer almaktadır (28,35).



Şekil 5: Fetus, uterus ve plasentanın gösterimi.

(URL-3, www.hopkinsmedicine.org)

2.2.1. Babalık Tayininde Prenatal Tanı Yöntemleri

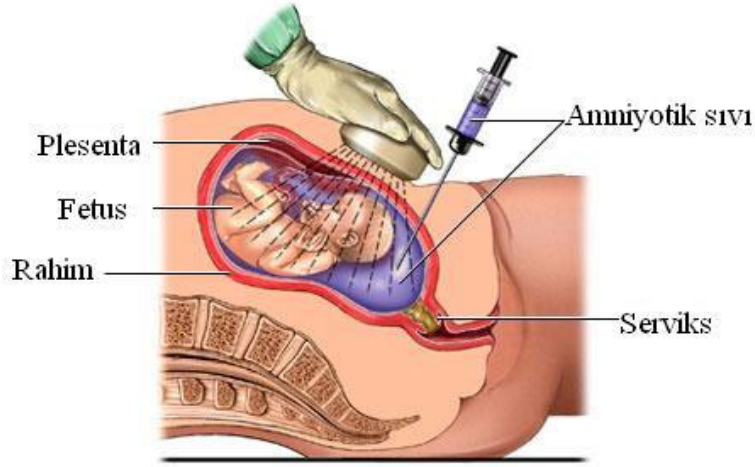
Prenatal babalık tayini çalışmaları oldukça uzun bir tarihe sahiptir. Uzun bir süre kromozomal heteromorfizm, kan grubu antijenleri, serum enzimleri, HLA tiplmesi yapılarak gerçekleştirilen bu çalışmalar yeterince yüksek babalık indeksi oranlarına ulaşamamıştır. Prenatal babalık tayini için günümüzde kullanılan amniyosentez, kordosentez, CVS, çölosentez gibi doğrudan fetüse ait genetik materyal eldesi ile yapılan çalışmalar, yüksek yüzdelerde doğru sonuçlar vermektedir. Bunun yanı sıra oluşturdukları maternal ve fetal riskler sebebi ile bu yöntemlere adli makamlar tarafından nadiren başvurulmaktadır (6,7,18).

2.2.1.1. Amniyosentez

Amniyosentez; hamilelik esnasında uterustan amniyotik sıvı örneği alınması şeklinde uygulanan bilinen en eski prenatal tanı yöntemidir. Besleyici ve koruyucu nitelikte olan amnion sıvısı çeşitli biyokimyasal ürünlerin yanı sıra, fetüse ait deri, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi hücrelerini içermektedir. 'Amniyosit' adı verilen bu hücreler kültüre edildikten sonra fetüse ait genetik materyalin incelenmesi mümkün olmaktadır (2).

Yöntem ilk kez 1882 yılında *Schatz* (36) tarafından fazla olan amnion sıvısının miktarını azaltmak için uygulanmıştır. 1956 yılında *Fucs ve Riis* (2) tekniği genetik amaçlı olarak ilk defa kullanarak fetal cinsiyet tayini yapmışlardır. Metabolik hastalık olarak 'adrenogenital sendromun' teşhisi ilk defa 1965 yılında amniyosentez ile konulmuştur (37). 1966 yılında *Steel ve Breg'in* (33) amniyotik sıvıdan fetal karyotip tayininin mümkün olduğunu göstermelerinin ardından, *Valenti ve ark.* (38) tarafından amniyosentez ile prenatal trisomi 21 tanısı konulmuştur. Amniyosentez yöntemi ile gerçekleştirilen ilk babalık tayini 1993 yılında *Nata ve ark* (39) tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde amniotik sıvı kullanılarak yapılan ilk babalık tayini ise 2003 yılında *Aşıcıoğlu ve ark.* (7) tarafından gerçekleştirilmiştir. Öz abisi tarafından istismara uğradığı iddia edilen olguya gebeliğin 12. haftasında amniyosentez uygulanmış ve DNA analizi sonunda öz abinin, yüksek bir babalık indeksi ile bebeğin biyolojik babası olduğu tespit edilmiştir.

Amniyosentez işlemi esnasında, ultrasonografi eşliğinde amnion kesesi içine sokulan bir iğne yardımı ile yaklaşık 20 ml amniyotik sıvı alınmaktadır. Fetüse ait genetik materyal içeren bu sıvı kromozom, DNA ve protein analizleri için kullanılmaktadır (28).



Şekil 6: Amniyosentez işlemi.

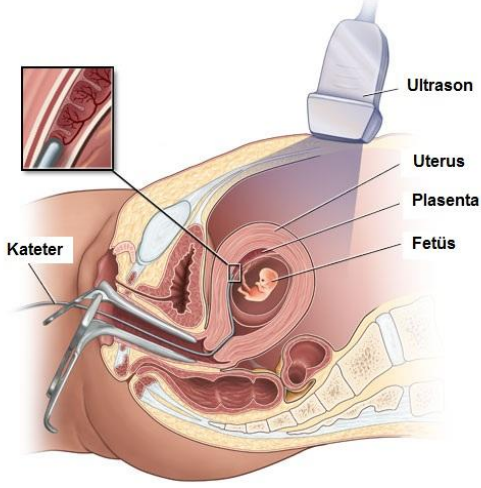
(URL-4, www.health.qld.gov.au/consent/html/anatomy_images.asp)

Amniyosentez, erken gebelik haftalarından itibaren tüm gebelik boyunca uygulanabilmekle birlikte, amnion sıvısının yeterli hacme ve hücre yoğunluğuna 16-18. haftalarda ulaşması sebebi ile tercihen 16- 20nci gebelik haftaları arasında yapılmaktadır. 14. haftadan önce uygulanması halinde 'erken amniyosentez', 15-16ncı haftalar içerisinde gerçekleştirilenlere ise 'midtrimester amniyosentez' denilmektedir . İşlem sonrası amniyotik sıvı sızıntısı, enfeksiyon gibi maternal komplikasyonların yanında nedbe dokusu, patellar tendon yırtığı, organ ponsiyonu, nörolojik hasar gibi giderek artan önemli fetal sekeller de bildirilmiştir. Amniyosentez sonrası düşük riski ise donanımlı merkezlerde ve deneyimli ellerde %1 olarak kabul edilmektedir (7,28,40).

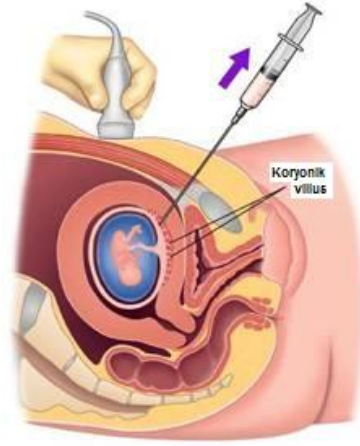
2.2.1.2. Koriyonik Villus Örnekleme (CVS)

CVS; bir iğne ya da katater yardımı ile gelişmekte olan ve fetus ile aynı genetik yapıya sahip olan plasentadan koriyonik doku örneği alınması işlemidir. Örnek alımı 'transservikal' ve 'transabdominal' olmak üzere 2 yolla gerçekleştirilmektedir (40). *Brambati ve ark.* (41) transservikal ve transabdominal CVS olgularını karşılaştırmaları

sonucunda, işlem başarısı ve komplikasyon riskleri açısından belirgin farklılıkların olmadığını rapor etmişlerdir. Uygulama kolaylığı bakımından günümüzde sıklıkla transabdominal yol tercih edilmektedir (40,41).



Şekil 7: Transservikal CVS



Şekil 8: Transabdominal CVS

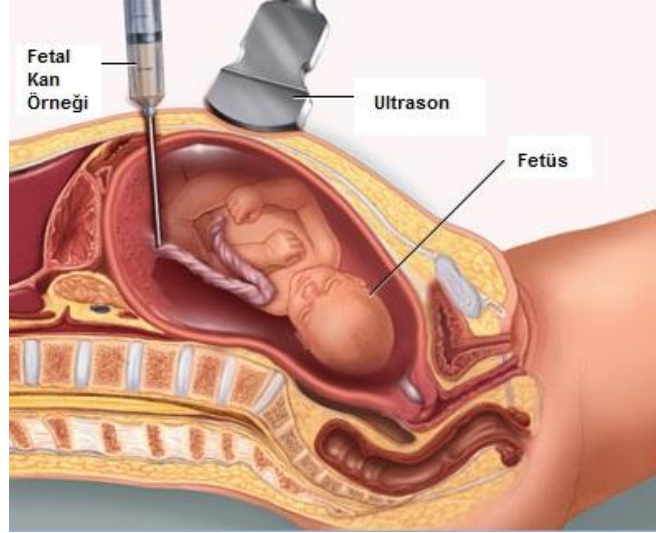
(URL-5, www.knowgenetics.org/chorionic-villus-sampling/)

Koriyon hücrelerinden kültür yapılabilineceği ilk kez 1968 yılında *Hahnemann ve Mohr* (42) tarafından gösterilmiş fakat olguların yarısında abortus meydana gelmiştir. 1980'lerde real-time ultrasonun devreye girmesiyle ilk transservikal CVS, 1982 yılında *Kazy ve ark.* (43) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yöntemin babalık tayini amaçlı ilk başarılı kullanımı ise 1995 yılında *Hammond ve ark* (44) tarafından bildirilmiştir.

10ncu gebelik haftasından önce yapılan CVS uygulamalarında oromandibular hipogenez ve ekstremité ucu amputasyonları görülebilmektedir. Bu sebeple günümüzde CVS'in gebeliğin 10. haftasından sonra uygulanması kabul görmüştür (39). CVS'de işleme bağlı fetal kayıp oranları değişik merkezlerin çalışmalarına göre %1.3-5 arasında değişim göstermektedir (45).

2.2.1.3. Kordosentez (Fetal Kan Örneklemesi)

Kordosentez, özellikle ileri gebelik haftalarında başvuru ve hızlı karyotipleme gerektiren olgularda tercih edilen bir prenatal tanı yöntemidir (46). Ultrasonografi altında ilk kordosentez 1983 yılında *Daffos ve ark.* (47) tarafından uygulanmıştır. İşlem serbest el tekniği ya da ultrasonprobuna takılan iğne yönlendirici yardımı ile yapılabilir. Fetal kan örnekleme için en sık olarak umbilikal kordonun plasentaya giriş yerinin 1-2 cm distali kullanılır. (48)



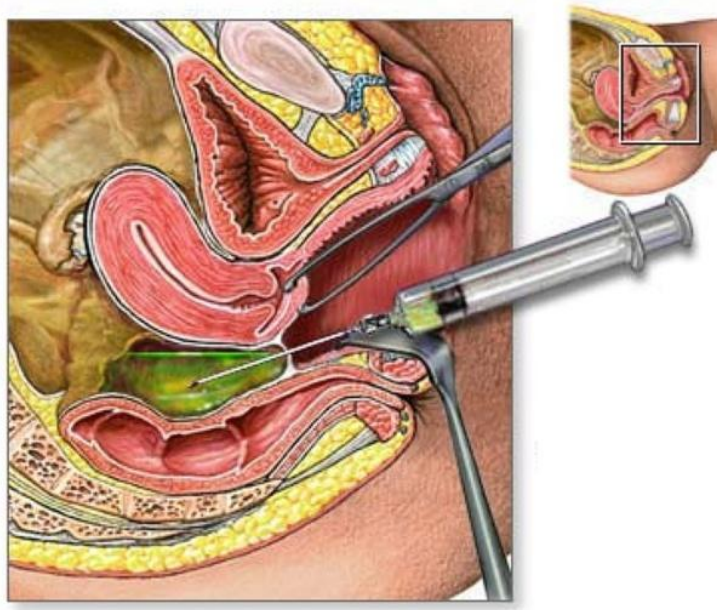
Şekil 9:Kordosentez İşlemi

(URL-6, www.centre-gynecologic-sarria.com)

Yöntem genellikle gebeliğin 18'nci haftasından itibaren uygulanır. Kordosentez girişimlerinde, koryoamniyonit, yetişkin tip respiratuar distres sendromu gibi maternal komplikasyonlar ve fetal kayıp, intraamniyotik kanama, fetal bradikardi, umbilikal kordon hematomu ve trombozu, prematür membran rüptürü ve prematür doğum ve fetomaternal transfüzyon gibi fetal komplikasyonlar görülebilir. İşlem sonrasında fetal kayıp riski %1,2- 4,9 olarak bildirilmiştir (46,48,49)

2.2.1.4. Çölosentez

Gebeliğin ilk trimester döneminde amniyon kesesi ekstra embriyonik mezodermden türevlenen ekzoçöломik boşlukla çevrilidir. Çölosentez, erken gebelik dönemlerinde bu boşluktan sıvı alınması işlemidir (50).



Şekil 10:Çölosentez işlemi

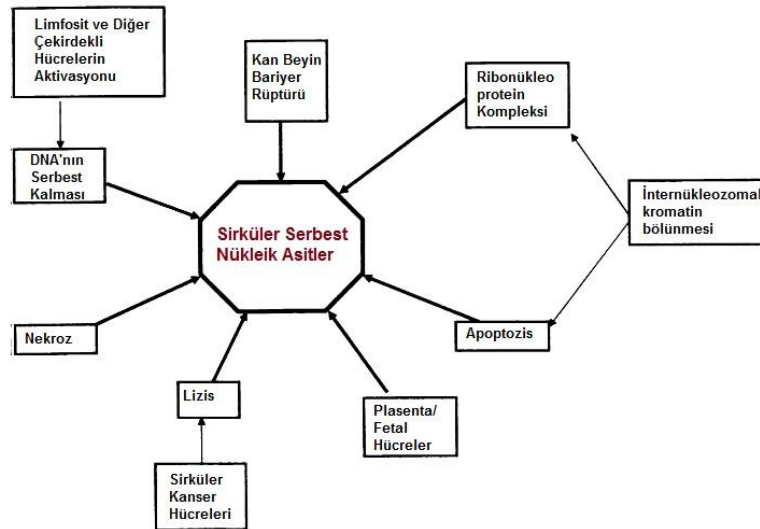
(URL-7, www.filipinonurseadvocate.blogspot.com.tr)

Gebeliğin 6-10ncu haftaları arasından uygulanabilen tekniğin erken gebelik haftalarında uygulanabilmesi, doğrudan fetal kökenli hücre eldesi gibi avantajları olmakla beraber, yüksek oranda fetal kayıp riski içermesi bakımından tercih edilmemektedir. *Ross ve ark.*(51) fetal kayıp oranını %25 olarak saptamışlardır. Bu teknik uygulanarak yapılan ilk prenatal babalık tayini 2004 yılında *Makrydimas ve ark.*(52) tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.3. SİRKÜLER KANDA SERBEST NÜKLEİK ASİTLER

DNA ve RNA'yı içeren nükleik asitlerin asıl işlev gördükleri yer hücre içidir (intraselüler), fakat günümüzde genetik materyalin periferal kanda ekstraselüler olarak da bulunduğu bilinmektedir. Watson ve Crick'in DNA'nın çift heliks yapısını keşfetmelerinden 5 yıl önce, 1948 yılında *Mandel ve M'etais*(53) plazmada bulunan nükleik asitlerin varlığını belirlemişlerdir. *Tan ve ark.*(54) 1966 yılında yaptıkları araştırmada 'Sistemik Lupus Eritematozus' (SLE) hastalarının serumlarında serbest DNA'ları tespit etmişlerdir. Takip eden çalışmalar yüksek seviyelerdeki DNA'nın yalnızca SLE hastalarının serumlarında değil ayrıca romatoidatrit, pankreatit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, peptik ülser hastalığı, hepatit ve özafajit hastalarında da bulunduğunu göstermiştir (55). 1977'de *Leon ve ark.* (56) pankreas kanseri olan hastaların plazma ve serumları üzerine yaptıkları çalışmanın sonucunda yüksek seviyelerde DNA oranları tespit etmişler ve kanserde sirküler serbest nükleik asit üzerine yapılan çalışmalara öncülük etmişlerdir (55).

Her ne kadar plazma ve serumda bulunan miktarlarının çeşitli hastalıklar ile artış gösterdiği kanıtlanmış olsa da sirküler nükleikasitlerin asıl orijini hala bir tartışma konusudur. Genel olarak kabul gören görüş ise limfosit ve diğer çekirdekli hücrelerin apoptosisi sonucu sirkülasyona katıldıkları yönündedir (55,56).

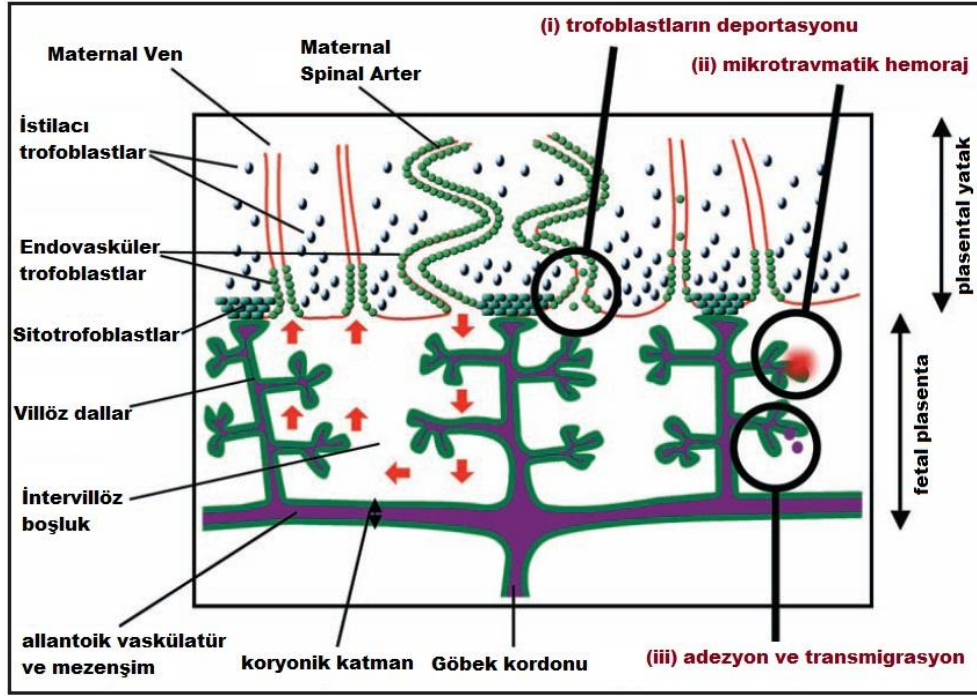


Şekil 11: Serbest nükleik asitlerin dolaşıma geçme yolları. (56)

2.4. MATERNAL KANDA FETAL HÜCRELER

Anne kanında fetüse ait hücrelerin varlığı ilk kez 1893 yılında Alman patolog *Schmorl*(11) tarafından, eklampsi nedeniyle ölen hamile kadınların kan dolaşımında trofoblastların histolojik olarak gözlemlenmesi ile ortaya konmuştur. Bu bulguları destekleyen bir çalışma olarak *Douglas ve ark. (57)* 1959'da eklampsili hastaların toplar damar kanlarında trofoblastların varlığını rapor etmişlerdir. 1964 yılında *Clayton ve ark. (58)* hamile kadınlardan aldıkları kan örneklerinde fetal hemoglobin (HbF) içeren hücrelere rastlamışlardır. Tüm bu veriler ışığında sitogenetik uzmanları, anne kanındaki fetal hücrelerin varlığını geleneksel tekniklerle araştırmaya başlamışlardır. Erkek fetüs taşıyan gebe kadınların kanında, 46,XY karyotipine sahip fetal lenfositlerin varlığı *Walknowskave ark.(59)* tarafından 1969 yılında rapor edilmiştir. Bu çalışma ile maternal kandaki fetal hücrelerin normal gebeliklerde de varolduğu ilk kez gösterilmiştir. *Schröder ve ark.'nın (60)* maternal kanda Y kromatin pozitif hücreleri saptamaları ile önceki çalışmalar destek bulmuştur. 70'li yılların sonlarına doğru zenginleştirme teknikleri odaklı çalışmalar hız kazanmıştır (61). 1979 yılında *Herzenberg ve ark. (62)* izole edilecek fetal hücrelerin sayısını arttırmak amacı ile 'flowsitometri' kullanımını ilk kez rapor etmişlerdir. Mevcut moleküler teknolojilerin devreye girmesiyle 1989 yılında *Lo ve ark (63)* erkek fetüs taşıyan gebe kadınların kanlarındaki Y kromozom dizilerinin varlığını tespit etmek amacı ile 'Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PCR)' kullanan ilk grup olmuşlardır. Takip eden yıllarda birçok araştırmacı kromozoma özgü DNA problemleri ile 'Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)' tekniğinden yararlanarak, akımla ayrıştırılmış fetüse ait çekirdekli eritrositlerin incelenmesi ile anöploidilerin doğum öncesi tanısında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (1,61,64).

Çeşitli dokulardan kaynaklanan fetüse ait hücreler çoğunlukla plasentanın intervillöz boşluğunda görülmektedir (1). Fetüse ait kan hücrelerinin maternal dolaşıma geçişinin fetüsten anneye kanama sonucunda olduğu düşünülmektedir. Ancak bunun mekanizması ve bu kanamaların normal gelişim sürecinin bir gereği mi yoksa travma bağlantılı mı olduğu hususu henüz kesinlik kazanmamıştır (64).



Şekil 12: Fetüsten anneye hücre geçişi hipotezlerinin mekanizmalarının ve insan plasenta yapısının basitleştirilmiş gösterimi (65).

Çekirdekli eritrositlerin maternal kandan dansite gradient santrifügürasyon, seçici hücre parçalanması, flowsorting ve MACS (magnetic activated cell sorting) gibi yöntemlerle ayrıştırılması sağlanıp, bu teknikle prenatal dönemde babalık tayini çalışmaları yapılmışsa da kesin bir başarı elde edilememiştir (7,66).

2.4.1. Maternal Kanda Fetal Hücrelerin Sıklığı

Maternal kanda nispeten az miktarda fetal hücre bulunmaktadır ancak bu hücrelerin periferik kandaki sıklıkları hakkında literatürde geniş bir aralık rapor edilmiştir. Bu aralık 10^5 de 1 çekirdekli hücreden 10^8 de 1 e kadar uzanmaktadır (61). En sık tespit edilen değer anne kanının 1ml sine ~1 fetal hücre düştüğü yönündedir (67). Analiz edilen hücre tipi, kan örneğinin alındığı gebelik yaşı gibi birçok faktör bu aralığı etkileyebilmektedir (68,69).

2.4.2. Maternal Kanda Fetal Hücre Tipleri

Sirkülasyondaki fetal hücrelerin prenatal tanıda rutin olarak kullanılabilmesi için; tüm gebe kadınların kanlarında bulunmaları, erken gebelik haftalarındaki miktarlarının analiz için yeterliliği, bir sonraki gebelikte anne kanındaki varlıklarını devam ettirmemeleri ve maternal hücreler ile ayrımlarını sağlayabilecek spesifik işaretleyicilere (marker) sahip olmaları gibi kriterler sağlanmalıdır. Maternal sirkülasyonda bulunan fetüse ait hücre tipleri; trofoblastlar, eritroblastlar (çekirdekli kırmızı kan hücreleri- ÇKKH), lökositler (lenfosit ve granüositler) ve hematopoetik kök hücrelerdir (12).

2.4.2.1. Trofoblastlar

Trofoblastlar gebeliğe özgü hücrelerdir. Morfolojileri sayesinde maternal kan hücrelerinden kolayca ayırt edilebilirler. Ayrıca kan hücrelerinden ayrı bir hücre serisi oldukları için, izolasyonda kullanılacak trofoblast-özü antikorların geliştirilebilmesi teorik olarak mümkündür. Ancak trofoblastik antijenlerin maternal lökositlerin yüzeylerine doğru çekilmesi pratikte sorun yaratmaktadır. Trofoblastların gebeliğin ilk 3 ayında maternal dolaşımda sıklıkla görülmelerinin yanı sıra akciğer dolaşımı yoluyla kandan rutin olarak temizleniyor olmaları, tanı için kullanılacak hücre sayısında hızlı ve belirgin bir düşüşe sebep olmaktadır. Ekstra embriyonik kökenleri nedeniyle plasentanın bir parçası olan bu hücrelerin nispeten yüksek oranda (%1-2) kromozomal mozaizm göstermeleri, genetik analizde fetüse ait karyotipi tam ve güvenilir olarak yansıtmamaktadır. Ek olarak bu hücrelerin çok çekirdekli olabilmeleri FISH ve DNA analizlerinde sorun yaratmaktadır (12,70,71).

2.4.2.2. Eritroblastlar

Eritroblastlar bir başka deyişle fetal çekirdekli kırmızı kan hücreleri (ÇKKH), gebeliğin ilk 3 aylık döneminde maternal sirkülasyonda en fazla bulunan fetal hücre tipidir (61). Sınırlı bölünme yetenekleri ve yaşam süreleri sayesinde bir sonraki gebelikte, maternal kandaki varlıklarını tüm gebelik süresince devam ettirmeleri, erken gebelik haftalarında dahi tespit edilebilmeleri ve zenginleştirme işlemlerine elverişli biyokimyasal karakteristikleri nedeniyle 1990'ların başından itibaren birçok çalışma bu hücre tipine yoğunlaşmıştır (71). Ancak *Troegerve ark.* (72) başta olmak üzere birçok araştırmacı sirkülasyonda bulunan ÇKKH'lerin büyük bir kısmının (~%50) maternal kökenli olduğunu tespit etmişlerdir. Fetal eritrositleri maternal kökenli olanlardan ayırmak için çeşitli yüzey antijenleri ve fetal hemoglobin çalışmaları yapılmışsa da kesin bir başarı elde edilememiştir (61,66,70-73).

2.4.2.3. Lökositler

Maternal kanda fetal lenfositlerin varlığı ilk kez 1969 yılında *Walknowska ve ark* (59) tarafından yapılan sitogenetik çalışmalar sonucu elde edilen hücre kültüründe Y kromozomunun gösterilmesi ile kanıtlanmıştır. Sahip oldukları HLA antijenleri bir avantaj olarak görünen bu hücre tipine, 1979 yılında *Herzenbergve ark.* (62) akılla ayırıştırma yöntemini uygulamışlardır. Anne ve fetus HLA farklılıklarından yararlanan bu çalışmada HLA-A2 negatif hamilelerin kanlarında HLA-A2 pozitif hücreleri ayırıştırımayı başarmışlardır. Fakat bu durum bu hücrelerin aslında HLA antijenlerini henüz kaybetmemiş öncü çekirdekli kırmızı kan hücreleri olabileceği şeklinde de yorumlanmıştır. Bununla birlikte fetal lökositlerin prenatal tanıda kullanımlarını kısıtlayan başlıca sorunlar, bu hücrelerin antijenlerine özgül monoklonal antikorların bulunmaması ve doğumdan 1-5 sene sonra dahi maternal kandaki varlıklarını sürdürebildiklerine dair çalışmalar bulunmasıdır. (61,71,74)

2.5. MATERNAL KANDA SERBEST FETAL DNA'LAR

Kanser hastalarının periferik kanlarında tümör orjinli DNA'ların moleküler tekniklerle tespit edilebilmesi, araştırıcıları bu sahada orjini farklı DNA'ları incelemeye yöneltmiştir. Plasentanın geçirgen bir membran olması fetal DNA ve RNA'nın maternal sirkülasyona serbestçe geçişini mümkün kılabilmektedir (75). Bu yaklaşımla *Lo ve ark.* (13) 1997 yılında yaptıkları çalışma ile ilk kez maternal kanda fetal DNA'ların varlığını göstermişlerdir. Bu çalışmada agresif olarak büyüyen fetoplental birim ile tümör arasındaki benzerliklerden yola çıkarak, erkek fetüs taşıyan hamile kadınların periferik kanlarında, Y kromozomuna spesifik gen sekanslarına konvansiyonel PCR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforezi uygulanarak başarı elde edilmiştir (56).

Maternal plazmada fetal DNA tespiti, fetal hücre tespitinden daha kolaydır. Yapılan birçok çalışma maternal kandaki serbest fetal DNA oranının fetal hücrelerine göre çok daha fazla olduğunu göstermektedir (75-77). *Lo ve ark.* (77) 1998 yılında yaptıkları çalışmada Real Time PCR yöntemi ile maternal serum ve plazmadaki fetal DNA'nın konsantrasyonunu ölçmüşler, erken gebeliklerde fetal DNA'nın total serbest DNA'nın serumda ortalama %0.13'ünü ve plazmada ortalama %3.4'ünü, geç gebeliklerde serumda ortalama %1.0'ini ve plazmada ortalama %6.2'sini oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Fetal hücrelerin aksine serbest fetal DNA'lar doğumdan kısa bir süre sonra maternal dolaşımdan temizlenmektedir. *Lo ve ark.* (76) bu moleküllerin yarı ömürlerini ortalama olarak 16.3 dakika olarak belirtmişlerdir.

Birçok potansiyel klinik uygulama alanı olan maternal plazmadaki serbest fetal DNA'ların biyolojileri hakkında günümüzde hala tam bir bilgi yoktur. Orijinlenebilecekleri düşünülen olası dokular fetal hematopoietik hücreler, plasenta ve DNA moleküllerinin direkt transferidir. Çeşitli fetal hücre tiplerinin maternal kanda sirküle olması, araştırıcılara fetal hematopoietik hücrelerin serbest fetal DNA'lar için uygun bir doku kaynağı olabileceğini düşündürmüştür (78). Plazmadaki DNA'nın hücre ölümü için marker olarak kullanılabilmesinin ardından (79) *Sekizawa ve ark.* (80) maternal kandaki eritroblastların % 42,7 sinin apoptozise gittiğini, bu yüzden

serbest fetal DNA'nın maternal bağışıklık sistemi ile apoptotik fetal hücreler arasındaki etkileşimden kaynaklanıyor olabileceğini önermişlerdir. Fakat yapılan birçok çalışma ile varılan genel kanı, maternal kanda nispeten az miktarda bulunan çekirdekli fetal hücrelerin, yüksek konsantrasyondaki serbest fetal DNA oranına ulaşmak için yeterli olamayacağı yönündedir. (78)

Fetal DNA dizileri amniyotik sıvı, maternal idrar, maternal serebrospinal sıvı, ve maternal peritoneal sıvı gibi diğer maternal vücut sıvılarında da gözlemlenmiştir (81-84). Bununla birlikte amniyon sıvısındaki serbest fetal DNA konsantrasyonunun maternal plazmadakinden yaklaşık 200 kat daha fazla olması, bu DNA moleküllerinin konsantrasyon gradiyentine bağlı olarak plasenta veya membranlardan maternal sirkülasyona direkt geçişinin mümkün olabileceğini düşündürmüştür. (85)

Plasenta; büyüklüğü ve hücresel aktivitesinin fazla olması nedeniyle serbest fetal DNA için mantıklı bir kaynak olarak görülmüştür. Yapılan birçok çalışma maternal sirkülasyondaki serbest fetal DNA miktarının gebelik yaşıyla doğru orantılı olarak arttığını göstermiştir (75,77,85). *Guilbert.J ve ark.* (86) in vitro üreme teknolojisi kullanılan çalışmalarında embriyo transferinden yalnızca 18 gün sonra, henüz fetoplasental sirkülasyon kurulmadan önce, fetal SRY dizisinin varlığını göstermişlerdir. Bu bulgu serbest fetal DNA'ların kaynağının yüksek oranda trofoblastik hücreler olduğu görüşünü desteklemektedir (79). Bir başka güçlü bir kanıt ise 2003 yılında yapılan bir çalışma ile plasentaya özgü mRNA moleküllerinin maternal plazmada tespit edilmiş olmasıdır (87).

2.5.1. Maternal Kandaki Serbest Fetal DNA'nın Klinik Uygulamaları

Hamile kadınların plazmalarında serbest fetal DNA'nın bulunması ve konsantrasyonunun maternal sirkülasyondaki fetal hücrelere göre daha fazla olduğunun gösterilmesi birçok yeni prenatal tanı uygulamasının önünü açmıştır (78). *Honda ve ark* (88) 2002 yılında serbest fetal DNA'nın analizi ile, gebeliğin 5nci haftasında %100 başarı oranıyla cinsiyet tayini yapabilmüşlerdir. Cinsiyete bağlı hastalıkların prenatal

incelenmesine olanak veren ilk başarılı uygulama erkek bir fetüse gebe olan kadınların plazmalarında Y kromozomuna ait dizilerin belirlenmesidir (13,89). Maternal plazma DNA analizi ayrıca RhD negatif gebe kadınlarda fetalRhD kan grubu durumunu girişimsel olmayan olarak belirlemek için kullanışlı bir analizdir (90). Bu analiz birçok araştırmacı grup tarafından yüksek doğrulukta gösterilmiş ve 2001'den beri İngiliz Ulusal Kan Servisi tarafından rutin uygulamaya sokulmuştur (91,92). Rutinde kullanılan ilk serbest fetal DNA temelli girişimsel olmayan prenatal tanı uygulaması olması bakımından büyük önem taşımaktadır (93).

Normal gebelikler için maternal plazmadaki serbest fetal DNA konsantrasyonunun belirlenmesinden kısa bir süre sonra, araştırmacılar bazı patolojik gebeliklerde bu miktarda gözlenebilecek muhtemel sapmalar ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu alandaki ilk bulgu preeklemsi hastalarında kaydedilmiş ve normal gebeliklere göre ortalama serbest fetal DNA miktarında beş kat artış olduğu bildirilmiştir (94). Yapılan çalışmalar ile; preeklemsiye ek olarak erken doğum (95), hiperemesiz gravidarum (96), idiyopatik polihidramniyoz (97), fetal kromozomal anomaliler (98,99) ve plasentaya yapılan girişimsel uygulamaların ardından (100) maternal plazmadaki serbest fetal DNA miktarında sapmalar olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak maternal plazma ya da serumdaki serbest fetal DNA konsantrasyon artışının, riskli gebeliklerin prenatal tanısında kullanılabilmesi önerilmektedir (78,93).

Ayrıca, miyotonik distrofi (101), akondroplazi (102), kistikfibroz (103), Huntington hastalığı (104), konjenital adrenal hiperplazi (105), fetal β -talasemi majör hastalığı (106) gibi tek gen hastalıklarının girişimsel olmayan prenatal tanısı için maternal plazmadaki serbest fetal DNA'nın kullanılabilmesi gösterilmiştir (85,93).

2.6. SERBEST FETAL DNA'LAR İLE BABALIK TAYİNİ VE Y-STR TEKNİĞİ

Gebelikle sonuçlanan birçok vakada, hamileliğin cinsel saldırı mı yoksa rıza gösterilen ilişki sonucunda mı oluştuğu belirsizdir. Bu durumda babalığın tespiti için izlenebilecek yollar amniyosentez, CVS gibi invaziv yöntemlerle sınırlıdır (107). Maternal kanda serbest fetal DNA'ların keşfi, doğum öncesi babalık tayininde de, çeşitli riskleri bulunan invaziv teknikler yerine non-invaziv tekniklerin geliştirilebileceğini düşündürmüştür (108). Bu yöntemle ilk çalışma 2009 yılına *Wagner ve ark.* (14) tarafından rapor edilmiştir. Polimorfik STR lokuslarının amplifiye edilmesi esasına dayanan bu çalışmada Y-STR analizinde başarı elde edilmiştir. Maternal serbest DNA'nın supresyonu sebebi ile araştırmacılar otozomal STR amplifikasyonunu gerçekleştirmemişlerdir.

Adli genetik incelemelerde yaygın olarak tercih edilen STR (Short tandem repeats-kısa ardışık tekrar dizileri) polimorfizmi ile arzulanan babalık indeksine çok az sayıda lokus çalışılarak ulaşılabılırken, PCR yöntemi sayesinde eser miktardaki hücresel materyalden dahi sonuç almak mümkün olmuştur. Ayrım gücünün yüksek olması ve ortaya çıkan sonuçların %99.9 oranla delil niteliği taşıması nedeni ile STR çalışmaları, güncel babalık testlerinde '*altın standart*' olarak kabul edilmektedir (19).

Y kromozomal STR polimorfizminin evolüsyonel incelemelerde kullanılmasının yanı sıra paternite olgularında kullanımı da son yıllarda giderek yaygınlaşmıştır. Y kromozomu 21. kromozomdan sonraki en küçük kromozom olup akrosentrik bir yapıya sahiptir. Genomun sadece %2 kadarı Y kromozomu tarafından oluşturulur. Yaklaşık altmış milyon baz çifti içermektedir (109). Y-STR'lar sadece erkek ebeveyn tarafından kalıtıldığından aynı soydan gelen tüm erkeklerde yeni bir mutasyon olasılığı dışında bir çok jenerasyon boyunca aynı haplotip görülecektir (110).

Y-STR ortalama mutasyon oranları ile otozomal STR lokuslarındaki ortalama mutasyon oranları arasında çok önemli farklılıklar olmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (111). Kayser ve ark. (112) 2000 yılında yaptıkları çalışmada, adli amaçlı kullanılan 15 Y-STR (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392,

DYS393, YCAI, YCAII ve DYS413) toplamda 4999 mayoz, güvenilir baba-oğul çiftlerinde gözlemlenmişler ve 14 mutasyon tanımlanmışlardır. Mutasyonları DNA sekans analizleriyle doğrulanmış ve mutasyona uğramış baba-oğul çiftlerindeki babalık olasılığını >%99.999 olarak tespit etmişleridir. Şu anda insan Y kromozomu üzerinde bulunan yaklaşık 220 STR belirteci adli genetik çalışmalarını için kullanılmaktadır ancak, büyük çoğunluğu için sekans varyasyonu ve ayırım kapasitesi hakkındaki bilgi yeterli değildir. Günümüzde DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 ve DYS439 adli alanda sıklıkla kullanılan Y-STR bölgeleridir (113).

Noninvaziv prenatal babalık tayininin uygulanması zor bir teknik olmasının en önemli nedeni, maternal kandaki serbest fetal DNA'nın total serbest DNA'ya oranının, %20 den az olması olarak görölmektedir. Buna ek olarak bu komponentler plazmada yüksek oranda degrade durumda bulunmaktadır (108).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP-“Single nucleotide polymorphism”) genomun herhangi bir bölgesindeki tek nükleotid dizilim farklılıklarıdır (114). Degrade DNA örnekleri için kısa fragmentler halindeki SNP'lerin analizi daha başarılı olabileceği düşünölmektedir (115). Babalık testindeki potansiyel avantajlara bağlı olarak adli araştırmacıların otozomal SNP'lere ilgisi artmıştır. SNP'lerin düşük mutasyon oranları vardır ve özellikle bozulmuş DNA örneklerinde kısa ampliconların kullanılması avantaj sağlamaktadır (116)

Guo ve ark (107) 2012 yılında yaptıkları çalışmada; 8-14 gebelik haftalarında bulunan 30 kadının maternal kan örneklerinden elde ettikleri serbest fetal DNA'ları SNP (Single Nucleotide Polymorphism) kullanarak incelemiş ve tüm örneklerin babalık tayininde başarılı olmuşlardır. *Ryan ve ark* 'nın (108) 2013 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise yine SNP tekniğinden yararlanılarak 6 haftalık gebelikte prenatal dönem babalık tayini başarısı elde edilmiştir.

Tek baz değişikliği içeren lokuslarda gözlenen toplam allel sayısı az olduğundan SNP'lerin bireyleri ayırım güçleri sınırlıdır. Adli DNA testinde potansiyel olarak uygulanmalarını tartışan birçok makale tek kaynaktan alınan örneklerde STR'lar ile eşit

ayırım gücünün oluşturması için gerekli olan markırların sayısına odaklanmıştır. Multipleks amplifikasyonun düzeyini geliştirmek için yapılan son çalışmalarla adli olaylarda kullanılmak üzere en uygun SNP lokuslarının seçimi yapılmaya çalışılmaktadır. Ancak SNP'ler ve STR'ler arasındaki karşılaştırma SNP'lerin adli DNA kimliklendirme markıları olarak STR'lerle yer değiştirmeye henüz hazır olmadığını göstermiştir (117). SNP'ler STR'ler kadar polimorfik olmadıkları için aynı ayırım gücü ve rastgele olasılık hesaplamalarına ulaşmak amacıyla daha fazla SNP bölgesine ihtiyaç vardır. Günümüzde 13-15 STR lokusunun ayırım gücüne karşılık yaklaşık 40-60 SNP bölgesinin kullanılması gerektiği düşünülmektedir (118).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya Özel Huzur Hastanesi'nde takibi yapılan, gebelik yaşı 9-29 hafta olan 7 gönüllü hamile kadın ve partnerleri dahil edildi. Kan ve tükürük örneklerine Y-STR profillenmesi amacı ile DNA analizi yapıldı. Örnekler alınmadan önce katılımcılardan, çalışma hakkında bilgilendirildiklerine ve gönüllü katılım sağladıklarına dair imzalı onamları alındı (*Ek 1*). Çalışmanın laboratuvar kısmı, T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu'nun 18.10.2011 tarih ve B.03.1.ATK.0.01.00.08/475 sayılı izni ile (*Ek 2*) T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi Laboratuvarlarında 2011-2014 yılları arasında gerçekleştirildi.

Çalışma başlangıçta 20 çift ve doğacak bebeklerine DNA analizi yapılması şeklinde planlanmış olmasına karşın; bilgilendirilmiş onamları alınan kişilerde gönüllülük esası dahilinde bu sayılara ulaşamadı.

3.1. ÖRNEK TOPLANMASI



Gönüllü katılım sağlayan ($n=7$) tüm olgulardan alınan periferik kan örnekleri ($V=9\text{ ml}$) pıhtılaşma önleyici ($EDTA=$ *Etilendiamin tetraasetik asit*) madde içeren tüplere toplandı. Numune alma işlemleri hamilelere herhangi bir girişimsel müdahale olmadan önce gerçekleştirildi.



Çalışmaya dahil edilen gönüllü hamilelerin partnerlerinden ise ($n=5$) steril swaplar aracılığı ile ağız içi tükürük örnekleri alındı.

* Kontrol grubu oluşturmak üzere doğumu gerçekleştiren 2 olgunun bebeklerinden ağız içi swap örnekleri alındı. Karşılaştırma için analiz edildi.

3.1.1.Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- * Santrifüj- Centrifuge 5804 (Eppendorf)
- * Santrifüj- Mikro 200 (Hettich)
- * İnkübatör- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- * İnkübatör- Big SHOT III Hybridization Owen 230402 (Boekel)
- * Vorteks- Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)
- * Otomatik İzolasyon-Bio Robot EZ 1 (Qiagen)
- * Real Time PCR Cihazı- 7500 Real time PCR System (Applied Biosystems)
- * PCR Cihazı-GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)
- * Elektroforez- 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

3.1.2.Deneylerde Kullanılan Ticari Kitler

- * QIAamp[®] DNA Blood Maxi Kit (Qiagen)
- * Spin-X UF Concentrator (CORNING)
- * Quantifiler[®] Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)
- * ampFLSTR[®] Yfiler[™] Kit (Applied Biosystems)
- * EZ 1 DNA Tissue Kit (Qiagen)

3.2. KAN ÖRNEKLERİNDEN PLAZMA AYRIŞTIRILMASI

- * EDTA'lı tüplerde bulunan kan örnekleri ($V=9ml$) santrifüje yerleştirildi.
- * 1400g ile 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
- * Süpernatant plazmalar dikkatlice temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- * Santrifüj işlemi aynı hızda 10 dakika süreyle tekrarlandı.
- * Plazmalar temiz mikrosantrifüj tüplerinde toplanarak çalışmanın devamı gerçekleştirilene kadar geçen sürede $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

3.3. KAN ve TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDEN DNA EKSTRAKSİYONU

3.3.1. Plazma Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

$-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de korunan plazma örnekleri ($V=4ml$), oda sıcaklığında izolasyon prosedürüne uygun hale getirildi. Kanlardan ayrıştırılan plazma örneklerinin DNA izolasyonu QIAamp[®] DNA Blood Maxi Kit (Qiagen) ile gerçekleştirildi.

- * Her bir örnek için tüplere 4ml ATL Buffer ve 100 μ l Proteinaz K eklendi.
- * Örnekler Boekel Scientific Big Shot III Hybridization Owen ile $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 60 dk 15 rpm ile inkübe edildi.
- * Her bir tüpe 12ml AL Buffer eklendi.
- * Örnekler Boekel Scientific Big Shot III Hybridization Owen ile $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 10 dk 15 rpm ile inkübe edildi.
- * Tüplere 10'ar ml Etanol eklendi ve karışımı sağlamak amacı ile birkaç kez alt üst edildi.
- * Karışım spin kolonlara aktarıldıktan sonra 1850 g ile 3 dk santrifüj edildi. Üst filtre alınıp alttaki tüp atıldı.

* AW 1 Buffer'dan 5'er ml spin kolonlara eklendikten sonra 4500 g ile 1 dk santrifüj edildi. (Kitin içerisinden çıkan 151 ml AW 1 Buffer'a 200ml etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.)

* Üst filtre alınıp alttaki tüpler yenilendi.

* AW 2 Buffer'dan 5'er ml spin kolonlara eklendikten sonra 4500 g ile 15 dk santrifüj edildi. (Kitin içerisinden çıkan 127 ml AW 1 Buffer'a 300ml etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.)

* Üst filtre alınıp alttaki tüpler yenilendi.

* Spin kolonlara 1ml distile su eklenip oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.

* Tüpler 4500 g de 2dk santrifüj edildi.

* İzolat spin kolondan bir kez daha geçirildi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Santrifüj işlemi 4500 g ile 5 dk tekrar edildi.

3.3.2.Tükürük Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

* Ağız içi epitel örneklerin alındığı steril svap uçları, küçük petri kaplarında bistüri ile dikkatlice ayrılarak 2ml lik ependorf tüplerine yerleştirildi.

* Her bir tüpe 400µl G2 Buffer ve 20µl Proteinaz K eklendi.

* Tüpler 5-10 saniye vortekslendi.

* Örnekler Eppendorf Thermomixer comfort ile 56⁰C'de 60 dk inkübe edildi.

* Hettich Mikro200 ile 13000 rpm de 1 dk santrifüj yapıldı.

* İzolasyon için Forensic Kart ile Qiagen Bio Robot EZ 1 otomatik DNA izolasyon cihazı ve EZ1 DNA Tissue Kit kullanıldı.

* Cihaza örnek 200 µl yüklendi.

* Proses sonucu 100µl izolat elde edildi.

3.4. PLAZMA ÖRNEKLERİNE DNA ULTRAFİLTRASYONU

- * Elde edilen izolatlar Spin-X UF konsantratör filtrelerine aktarıldı.
- * Tüpler 3000g ile 8dk santrifüj edildi.
- * Fitre üzerinde kalan 30 µl'lik izolatlar 2ml'lik ependorflara aktarıldı.

3.5. REALTİME PCR YÖNTEMİ İLE KANTİTASYON

İzolatların kantitasyonları 'Quantifiler Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)' kullanılarak 7500 Realtime PCR System ile gerçekleştirildi.

- * Hazırlık aşamasında; farklı dilüsyonlardaki standartların hazırlanması için 8 eppendorf tüpüne 20'şer µl 'Dilution Buffer' eklendi.
- * 10 µl 'Dna Standard' 5sn vortekslendikten sonra birinci tüpe eklendi ve pipetaj yapıldı.
- * Seri sulandırma için birinci tüpten alınan 10µl karışım ikinci tüpe aktarıldı.
- * 8 tüp için de bu işlem tekrarlandı.

Tablo I: Oluşturulan standartların konsantrasyonları

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	50	16,7	5,56	1,85	0,62	0,21	0,068	0,023

* 'Reaction mix' ve 'Primer mix' 5'er sn vortekslendi.

*Cihaza yerleştirilecek plate'in kuyucuklarına her bir örnek, farklı dilüsyonlardaki standartlar ve biri pozitif diğeri negatif olmak üzere iki kontrol örneğinin her biri için 12,5µl 'Reaction mix' ve 10,5 µl 'Primer mix' konuldu.

* Standartların çalışılacağı ilk 16 kuyucuğa son hacim 25 µl'ye tamamlayacak şekilde 2'şer µl farklı dilüsyonlardaki standartlar, örneklerin çalışılacağı kuyucuklara ise 2'şer µl izolat eklendi.

* Plate'in üzeri optik yapışkan film ile kaplandı.

* Plate proses öncesi kısa bir süre spin edildi.

3.5.1. Real Time PCR Döngü Parametreleri ve Veri Girişi

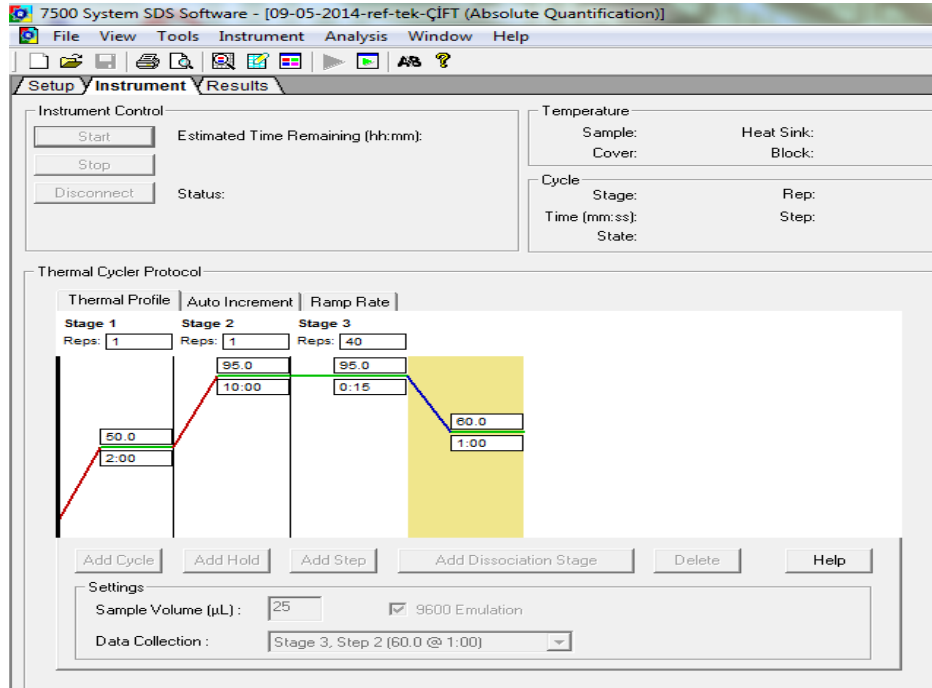
Örnekler cihaza yüklendikten sonra gerekli veri girişleri SDS Sequence Detection Software V.1.2.3 programı kullanılarak yapıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standart 1A 5.00e-001 5.00e-001	Standart 2A 5.00e-001 5.00e-001	2014-1241-3-1	2014-1289-1-1	2014-1245-2-2	2014-1284-1-2	2014-1251-1-1	2014-1275-8-1	2014-1252-1-2	2014-1251-2-1	PK poz (72823)	
B	Standart 1B 1.67e-001 1.67e-001	Standart 2B 1.67e-001 1.67e-001	2014-1241-4-1	2014-1289-2-1	2014-1250-1-2	2014-1285-1-2	2014-1036-1-1	2014-1227-2-1	2014-1251-3-2	2014-1211-13-1	PK poz (72824)	
C	Standart 1C 5.56e-000 5.56e-000	Standart 2C 5.56e-000 5.56e-000	2014-1250-1-1	2014-1290-1-1	2014-1250-2-2	2014-1289-1-2	2014-1251-3-1	2014-1227-3-3	2014-1036-1-2	2014-955-1-3	PK poz (72825)	
D	Standart 1D 1.85e-000 1.85e-000	Standart 2D 1.85e-000 1.85e-000	2014-1250-2-1	2014-1290-2-1	2014-1250-3-2	2014-1289-2-2	2014-1252-1-1	2014-1275-9-2	2014-1251-1-2	2014-1252-2-2		
E	Standart 1E 6.25e-001 6.25e-001	Standart 2E 6.25e-001 6.25e-001	2014-1250-3-1	2014-1290-3-1	2014-1290-5-2	2014-1291-1-2	2014-1253-1-1	2014-1227-2-2	2014-1253-4-2	2014-1251-2-2		
F	Standart 1F 2.10e-001 2.10e-001	Standart 2F 2.10e-001 2.10e-001	2014-1275-5-1	2014-1290-4-1	2014-1275-6-2	2014-1291-2-2	2014-1253-2-1	2014-1227-2-4	2014-1253-3-2	2014-1211-13-2		
G	Standart 1G 6.00e-002 6.00e-002	Standart 2G 6.00e-002 6.00e-002	2014-1277-1-1	PK poz (72823)	2014-1277-1-2	PK poz (73035)	2014-1253-3-1	2014-1253-3-2	2014-725-1-6	2014-955-1-4		
H	Standart 1H 2.30e-002 2.30e-002	Standart 2H 2.30e-002 2.30e-002	2014-1284-1-1	PK poz (72824)	2014-1281-1-2	PK poz (73036)	2014-1253-4-1	2014-1253-1-2	2014-1252-2-1	PK poz (72822)		

Şekil 13: System Software Setup tablosuna örnek girişinin yapılması

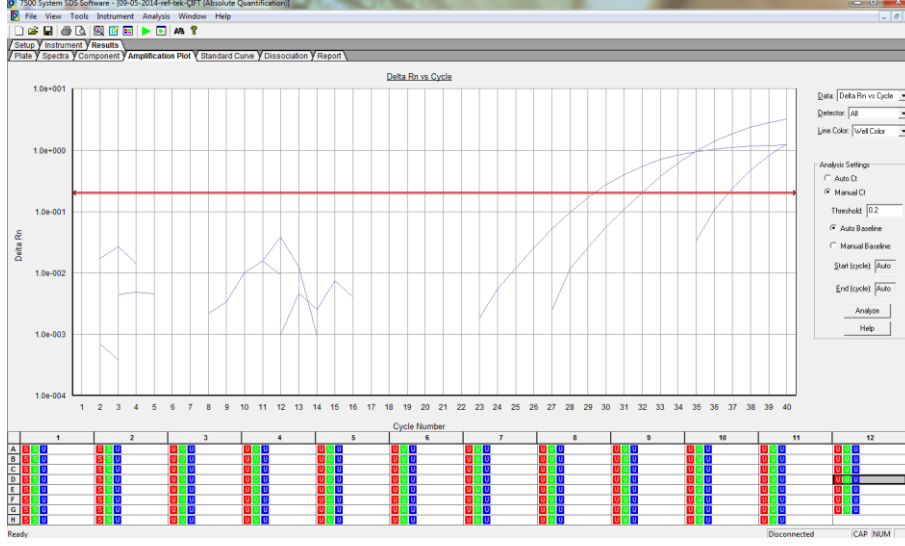
Tablo II : Maternal kandan elde edilen DNA izolatları için RT- PCR döngü parametreleri

Aşama	Hazırlık		40 Döngü	
			Denatürasyon	Uzama
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2 dakika	10 dakika	0,15 dakika	1 dakika

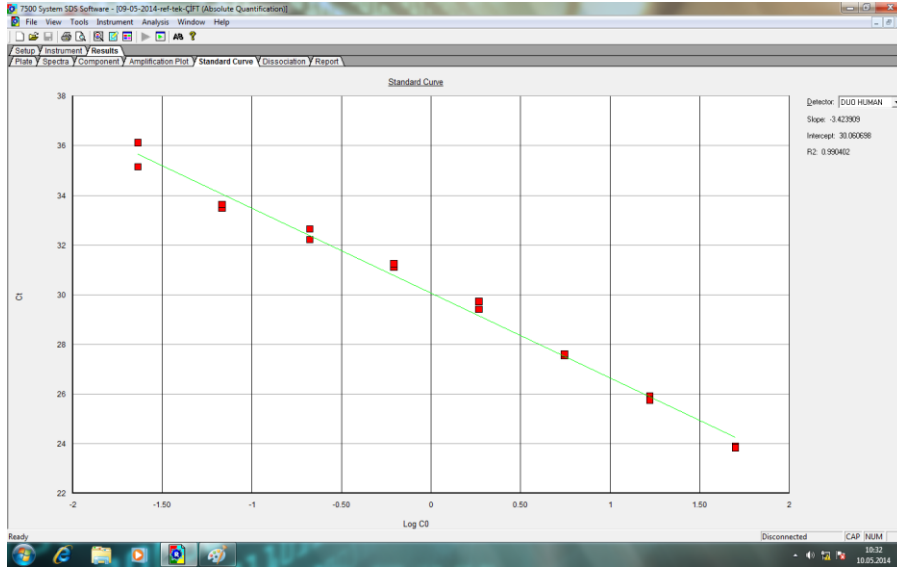


Şekil 14: PCR döngü parametrelerinin ve toplam hacim bilgisinin sisteme girişi

3.5.2. Kantitasyon Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Analizi



Şekil 15: A7 kodlu örneğe ait amplifikasyon plot



Şekil 16: Elde edilen Standart Curve Eğrisi

İşlem tamamlandıktan sonra izolatların kantitasyon değerleri görüntülenerek miktar tayinleri yapıldı (Şekil 15). Elde edilen değerler önceden hazırlanan ve miktarları bilinen standartlar sayesinde oluşan eğri ile kıyaslanarak sonuca ulaşıldı (Şekil 16).

3.6. MULTİPLEKS PCR

DNA miktar tayini yapılan izolatların amplifikasyonları 'ampFLSTR Yfiler™ Kit (Applied Biosystems)' kullanılarak 'Gene Amp PCR System 9700' ile yapıldı. Fetüsün DNA profilini belirlemek için Y kromozomu üzerinde yer alan DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385, DYS437, DYS438, DYS 439, DYS448, DYS 456, DYS458, DYS635 ve GATA H4 dizilerine PCR deney düzeneği kuruldu.

3.6.1. İzolatların PCR için hazırlanması

Konvansiyonel PCR yöntemi ile amplifiye edilecek olan farklı konsantrasyonlardaki DNA örneklerini, kitin çalışabileceği optimum dilüsyona (0,2- 1 ng/μl) getirebilmek için;

* Yüksek konsantrasyondaki örnekler distile su ile dilüye edildi

* Düşük konsantrasyondaki örnekler için ise PCR döngü sayısı 32 olarak arttırıldı.

3.6.2. PCR Karışımının Hazırlanması

* Çoğaltılacak örneklerle birlikte, biri pozitif diğeri negatif olmak üzere iki kontrol örneği için PCR karışımı şu şekilde hazırlandı;

* 'Reaction mix' ve Y filler 'Primer set' 3'er saniye vortekslendi.

* Kapakta kalabilecek miktarları önlemek için tüpler kısaca spin edildi.

* Ayrı bir tüpte 200μl Reaction mix, 100μl Yfiller Primer set ve 10 μl AmlıTaq Gold DNA Polimeraz karıştırıldı.

* Her bir örnek için tüplere, hazırlanan karışımdan 15 μl ve son hacim 25μl olacak şekilde 10μl izolat eklendi.

3.6.3.PCR Döngü Parametreleri

Tablo III : Maternal kandan elde edilen DNA izolatları için PCR döngü parametreleri

Aşama	Başlangıç İnkübasyonu	30 Döngü			Son Uzama Aşaması
		Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	
Sıcaklık	95°C	94 °C	61 °C	72 °C	60 °C
Zaman	11 dakika	1 dakika	1 dakika	1 dakika	80 dakika

Tablo IV : Ağız içi svaplardan elde edilen DNA izolatları için PCR döngü parametreleri

Aşama	Başlangıç İnkübasyonu	30 Döngü			Son Uzama Aşaması
		Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	
Sıcaklık	95°C	94 °C	61 °C	72 °C	60 °C
Zaman	11 dakika	1 dakika	1 dakika	1 dakika	80 dakika

* PCR sonunda program +4⁰C ye ayarlandı ve bir sonraki aşamaya kadar örneklerin bozulması engellendi.

3.7. PCR ÜRÜNLERİNİN KAPİLLER ELEKTROFOREZİ

Amplifikasyonu yapılan örneklerin elektroforezi 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile yapıldı.

3.7.1.Örneklerin Yükleme ve Yürütme İçin Hazırlanması

* Yürütülecek PCR ürünleri ile birlikte, biri pozitif diğeri negatif olmak üzere iki kontrol örneği ve tiplendirme yapmak için gerekli olan 'Ladder' da göz önüne alınarak, yeterli sayıda tüp temin edildi.

* Her bir örnek için plate'in kuyucuklarına 5'er saniye vortekslenen 9,75µl 'Formamit' ve 0,25µl 'Size standard' eklendi.

* Birinci kuyucuğa 1 µl 'Ladder' diğeri kuyucuklara ise 1'er µl PCR ürünü yüklendi.

* Kapakta kalabilecek miktarları önlemek için tüpler kısaca spin edildi.

* Plate denatürasyon için PCR cihazında 95⁰C'de 3 dakika bekletildi.

* Denatürasyon sonunda plate 3 dakika buzda bekletildi.

3.7.2.Örneklerin Yüklenmesi, Yürütülmesi ve Analizi

* Elektroforez işlemi 3130xl Genetic Analyzer cihazlarında üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirildi.

* Örnek başına 9,75 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) ve 0,25µl Size Standard 500 LIZ (Applied Biosystems) temiz bir tüpte karıştırılarak yükleme plaketine dağıtıldı.

(Formamid DNA'nın denatüre olmasını ve oluşan PCR ürünlerinin tek iplikçik (SS) olarak kalmasını sağlamaktadır. Size standard ise işaretli primerlerden farklı bir işaretleyici fluoresan boya ile işaretlenmiş, büyüklüğü bilinen DNA parçacıkları içerir ve

PCR ürünlerinin büyüklüklerinin tespitinde kullanılır. Size Standat 500 LIZ; 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 ve 500 bp uzunluğunda DNA parçacıkları içermektedir. 250 bp uzunluğundaki DNA parçacığı aynı zamanda kalite kontrol maçı kullanılmaktadır. Analiz edilirken bu parçacık boyutuna bilinen değeri verilmez, ancak analiz sonrasında aldığı değer kontrol edilir; 246-250 arasındaki değerler geçerli kabul edilir.)

*Allel isimlendirmesinin yapılabilmesi için her çalışma grubunda 1 adet Allelic Ladder yüklendi.

(Allelic Ladder kit içeriğinde gelen ve olası allelleri içeren, cetvel niteliğinde bir karışımdır.)

* Elektroforez sonuçları GeneMapper ID v.3.2 programı kullanılarak analiz edildi.

* Kit üreticisinin sağladığı Panel ve Bin Set'ler kullanılarak allel isimlendirmesi yapıldı.

* Analiz yapılırken analitik eşik değeri öncelikli olarak 50 rfu seçildi, ancak ilk analizi takiben gerekli görüldüğü hallerde, 50 rfu değerinin altında kalmış allellerin isimlendirilmesi için 10 rfu olarak değiştirildi.

3.8. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS-20 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanıldı. Betimleyici istatistiklerin yanı sıra, değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığını değerlendirmek için Pearson Korelasyon analizi yapıldı. Gebelik yaşı ve total DNA miktarı ile ölçülen SRY değerleri arasında anlamlı korelasyonun bulunup bulunmadığı analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. OLGULAR

A6 kodlu katılımcının partnerinden örnek alınmadığı için partner ile ilgili çalışma yapılamadı. Doğumları gerçekleşen A1 ve A2 kodlu katılımcıların bebeklerine ait tükürük örneklerine (C1 ve C2) DNA incelemesi yapılarak kontrol grubu oluşturuldu. Çalışma sürecinde diğer olgular henüz doğum yapmadığından A1 ve A2 de olduğu gibi bebeklere ait tükürük örneklerine DNA incelemesi yapılamadı. Bir olgu dışında tüm olgularda gebelik yaşı 10 haftanın üzerinde idi. En fazla gebelik yaşı olan olgu, 29 hafta idi. Üç olgunun önceki gebelikleri bulunmaktaydı ve üçü de erkek bebektir. Olguların gebelikleri ile ilgili bilgiler tablo V’de verildi.

Tablo V: Katılımcıların kodları ve gebelik bilgileri.

OLGU Örnek No. (Maternal kan)	PARTNER Örnek No. (Bukkal Swap)	BEBEK Örnek No. (Bukkal Swap)	GEBELİK YAŞI	GEÇMİŞ GEBELİK
A1	B1	C1	27 hafta	(-)
A2	B2	C2	16 hafta	(-)
A3	B3	-	25 hafta	(-)
A4	B4	-	29 hafta	(-)
A5	B5	-	23 hafta	(+)/♂
A6	-	-	9 hafta	(+)/♂
A7	B7	-	22 hafta	(+)/♂

4.2. KANTİTASYON SONUÇLARI

Tablo VI: Maternal kandan elde edilen total ve fetal DNA konsantrasyonları

ÖRNEK	GEBELİK YAŞI	Ölçülen Miktar Total DNA (RPPH1) ng/μl	Ölçülen Miktar Fetal DNA (SRY) ng/μl
A1	27 hafta	0.222	0.012
A2	16 hafta	0.143	0.002
A3	25 hafta	0.562	0.011
A4	29 hafta	0.026	0.000
A5	23 hafta	0.000	0.000
A6	9 hafta	0.356	0.000
A7	22 hafta	0.280	0.032

Total DNA miktarları ve maternal kanda saptanan fetal DNA miktarları (SRY) ng/ml cinsinden hesaplanarak tablo VI' da gösterildi.

A5 kodlu olguda materyal miktarı ve uygulanan prosedür ile ilgili bir problem yaşanmamasına rağmen, kan plazmasından DNA elde edilemedi. Aynı şekilde fetal DNA tespiti ile ilgili kantitatif bir değer ve elektroforez sonucunda DNA profili elde edilemedi. Ancak A2 kodlu olguda maternal kanda tespit edilen fetal DNA miktarı 0.002 ng/μl ve A4 kodlu olguda bu değer 0.000 ng/μl olmasına rağmen elektroforez sonucunda Y-STR DNA profili elde edilebilindi.

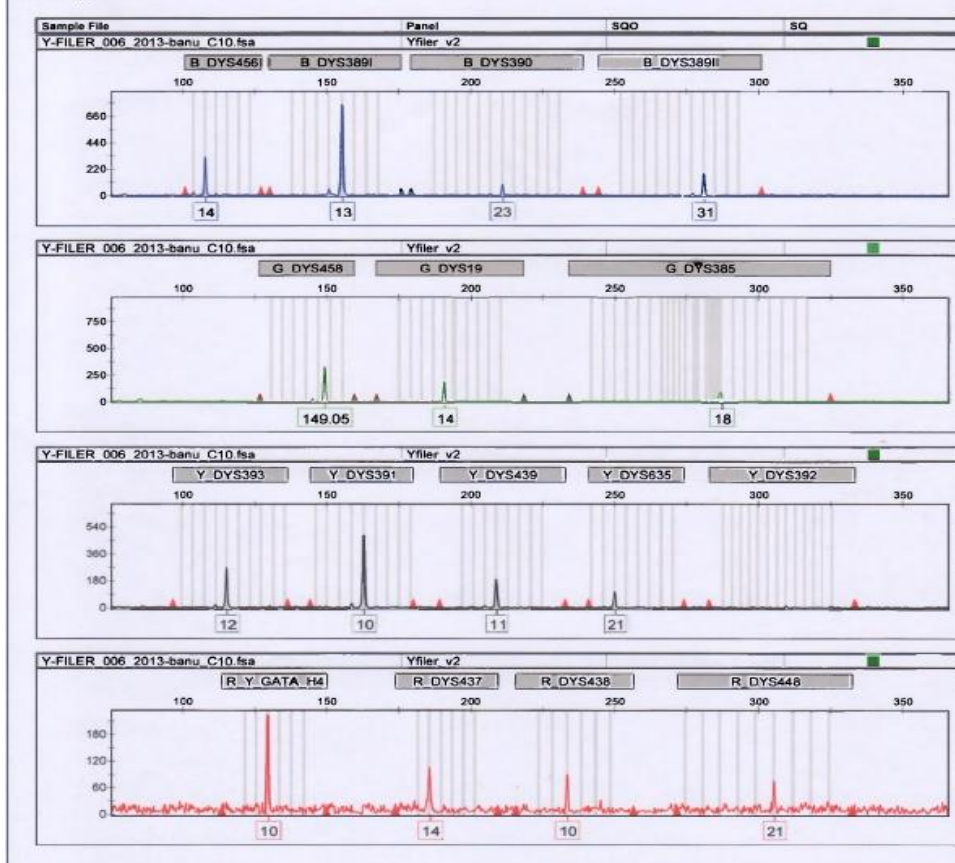
Örneklemin gebelik yaşı ortalaması $21,57 \pm 6,925$ Total DNA ortalaması $.227 \pm .1961$, Fetal DNA (SRY) ortalaması ise $.008 \pm .0118$ olarak hesaplandı. Pearson Korelasyon analizi kullanılarak gerçekleştirilen analizde gebelik yaşı ve total DNA miktarı ile ölçülen SRY değerleri arasında anlamlı korelasyon saptanamadı ($r = -.216$, $p > .05$, $r = -.224$, $p > .05$). (tablo VII)

Tablo VII: Pearson Korelasyon analizi sonuçları

	Ortalama (N=7)	Fetal DNA miktarı ile Korelasyonu
Gebelik Yaşı	21.57	216
Total DNA	.227	.224
Fetal DNA	.008	1

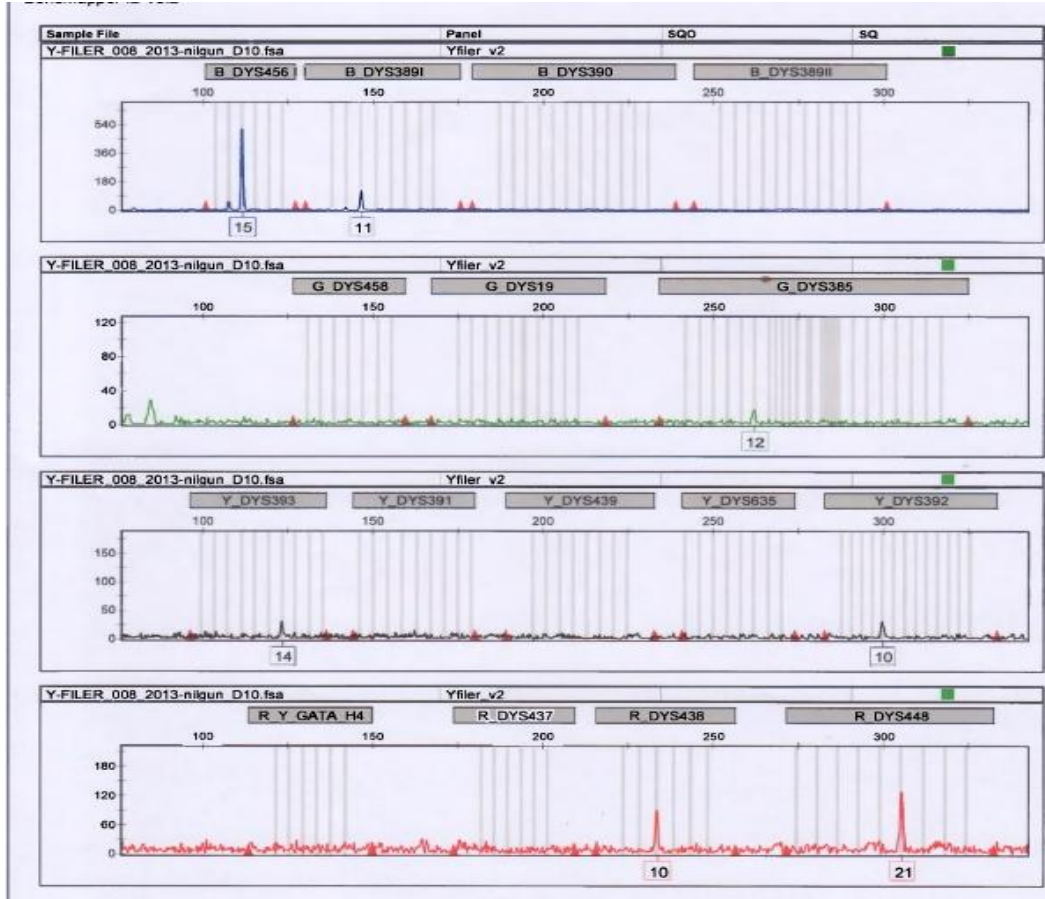
4.3.MATERNAL PLAZMADAN İZOLE EDİLEN FETAL DNA'NIN Y KROMOZOM PROFİLLERİ

Olgu A1:



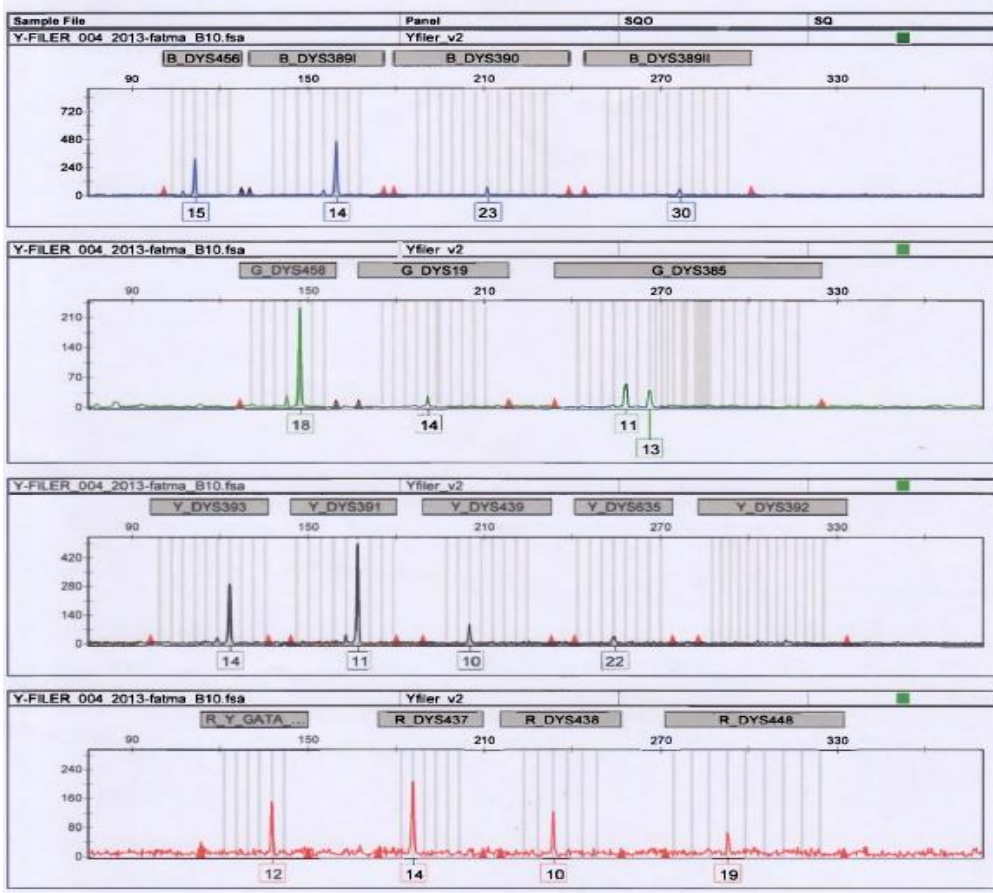
Şekil 17: A1 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi

Olgu A2:



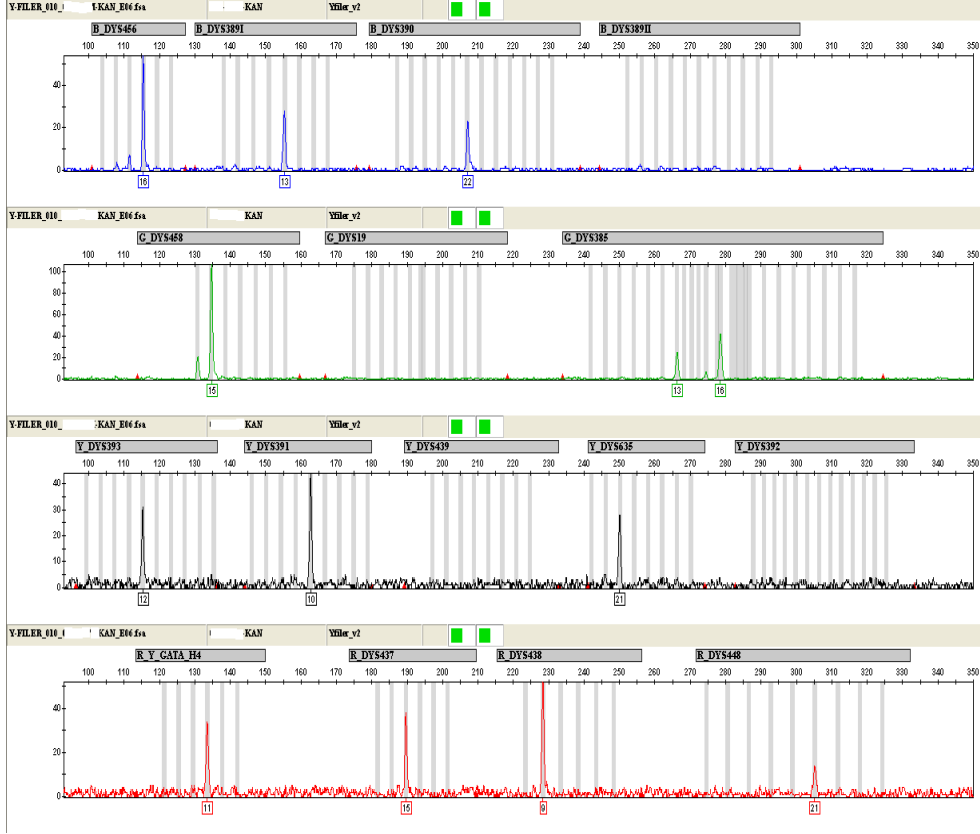
Şekil 18: A2 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu A3:



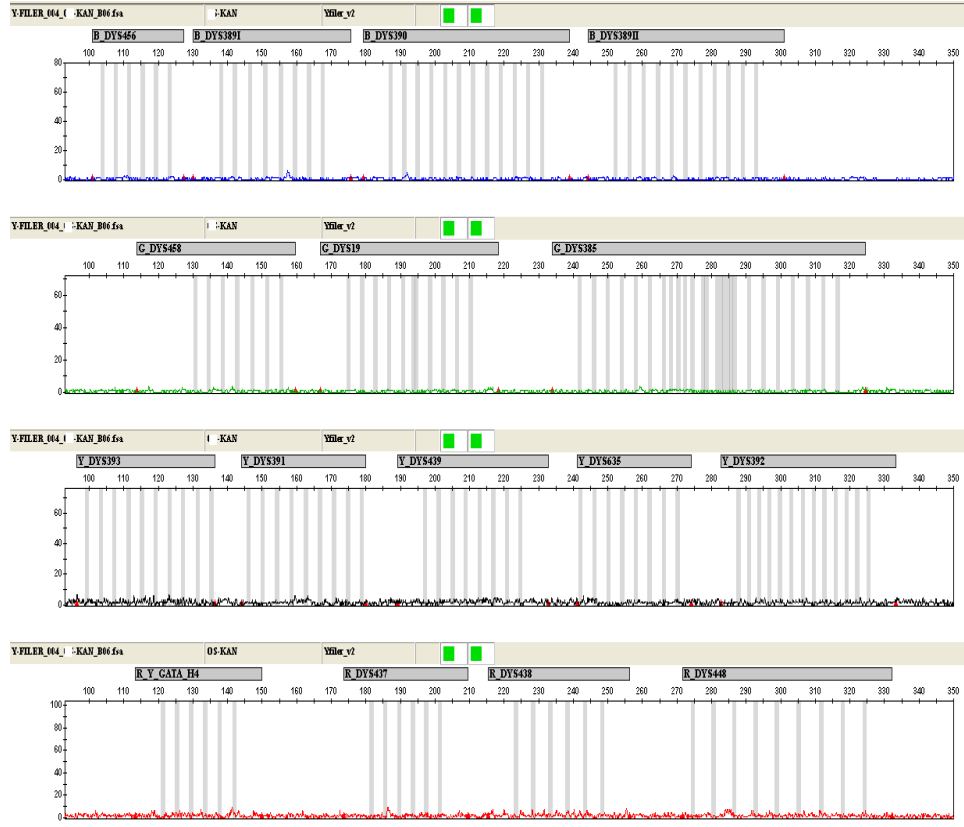
Şekil 19: A3 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu A4:



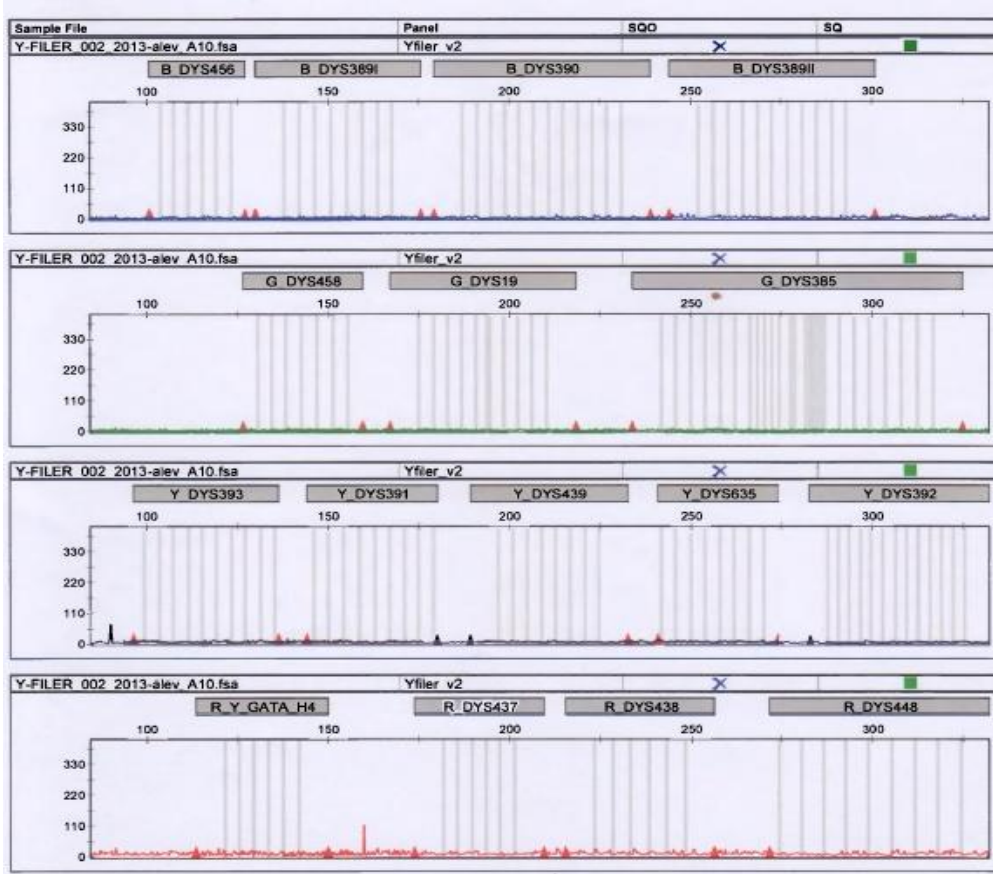
Şekil 20: A4 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu A5:



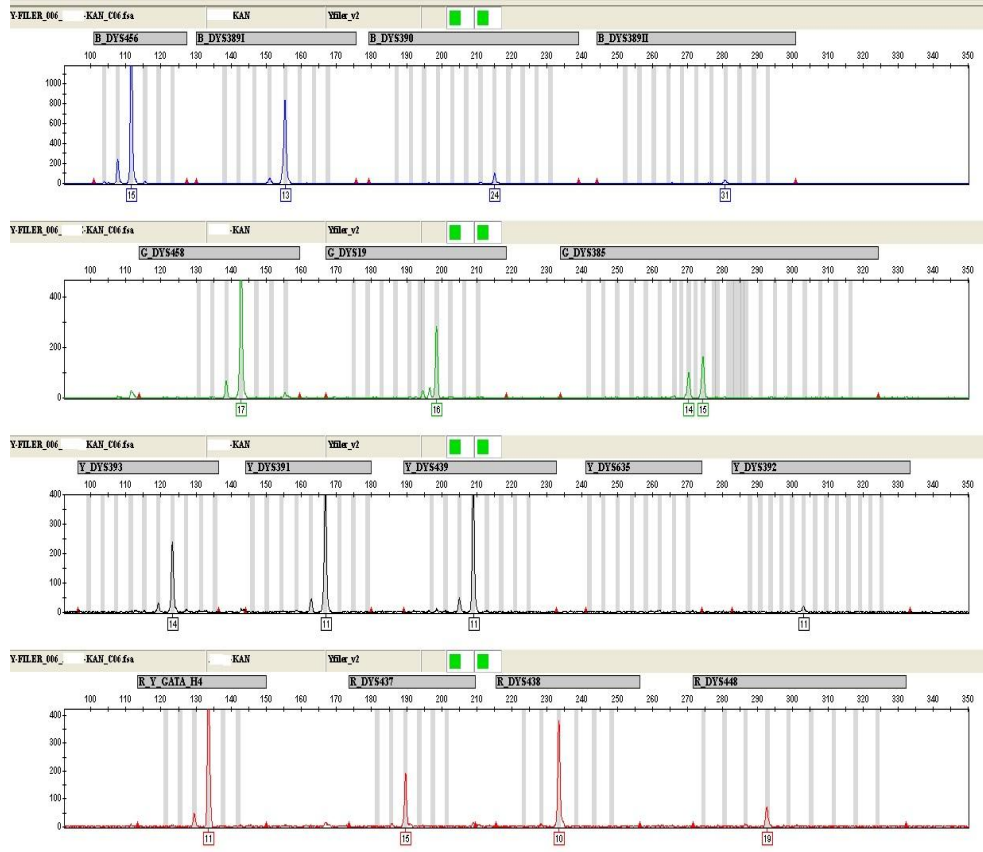
Şekil 21: A5 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu A6:



Şekil 22: A6 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

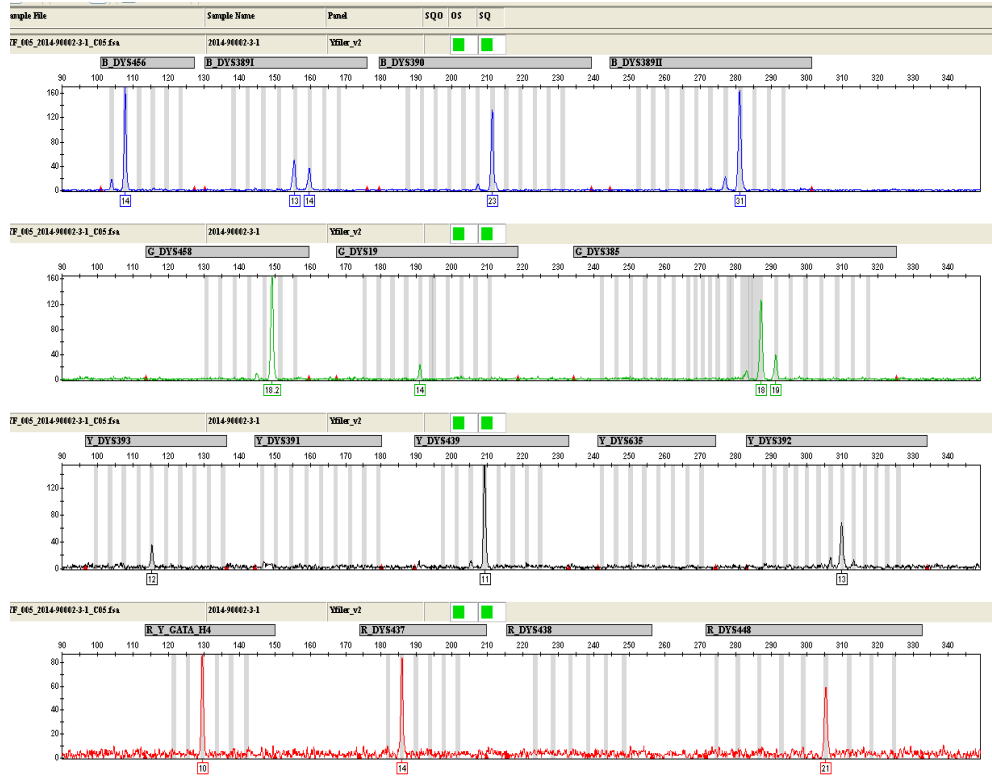
Olgu A7:



Şekil 23: A7 kodlu maternal kan örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

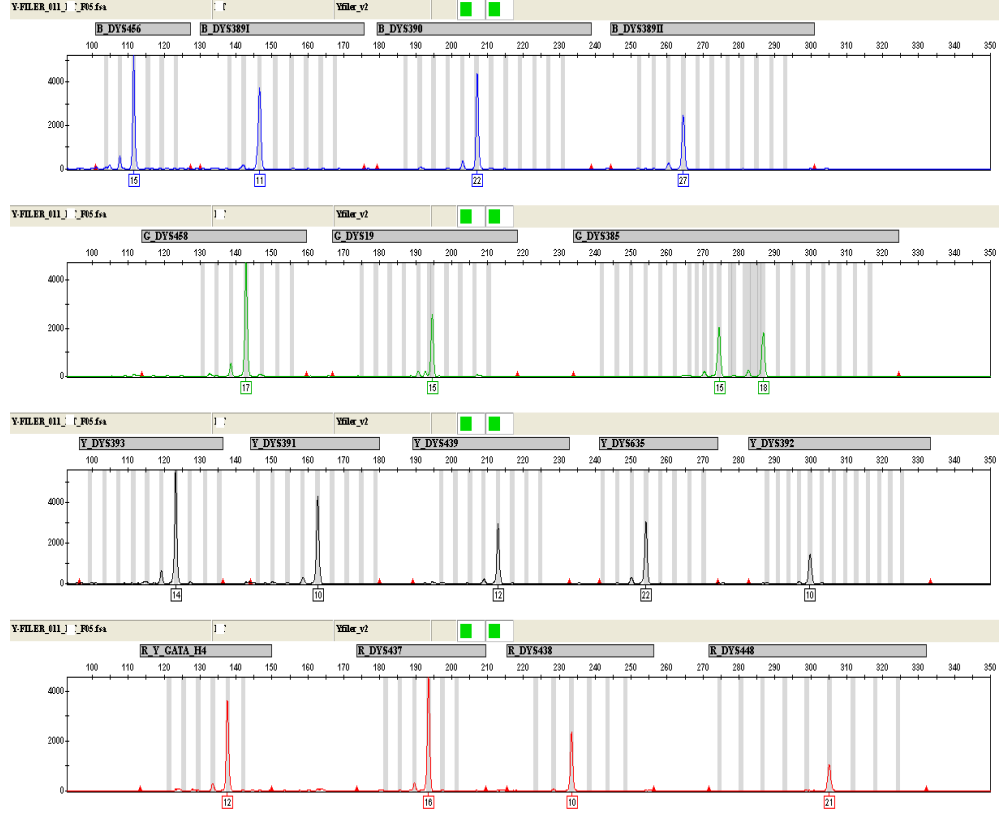
4.4. AĞIZ İÇİ SVAP ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN PATERNAL DNA'NIN Y KROMOZOM PROFİLLERİ

Olgu B1:



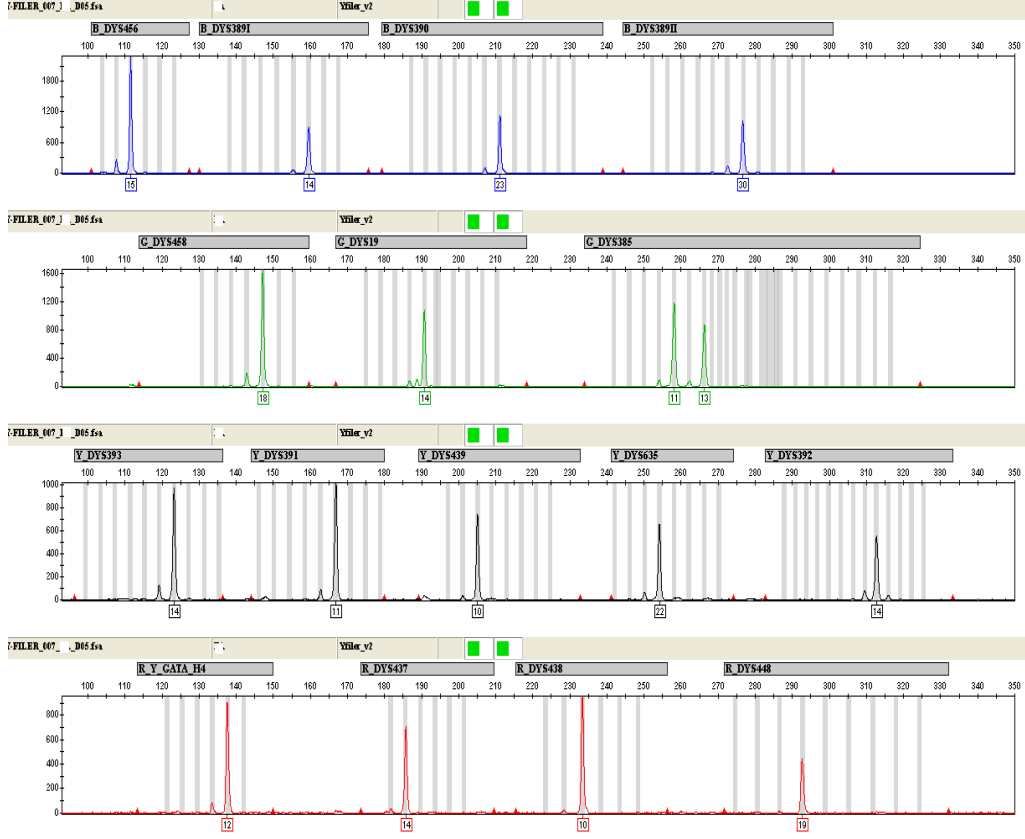
Şekil 24: B1 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu B2:



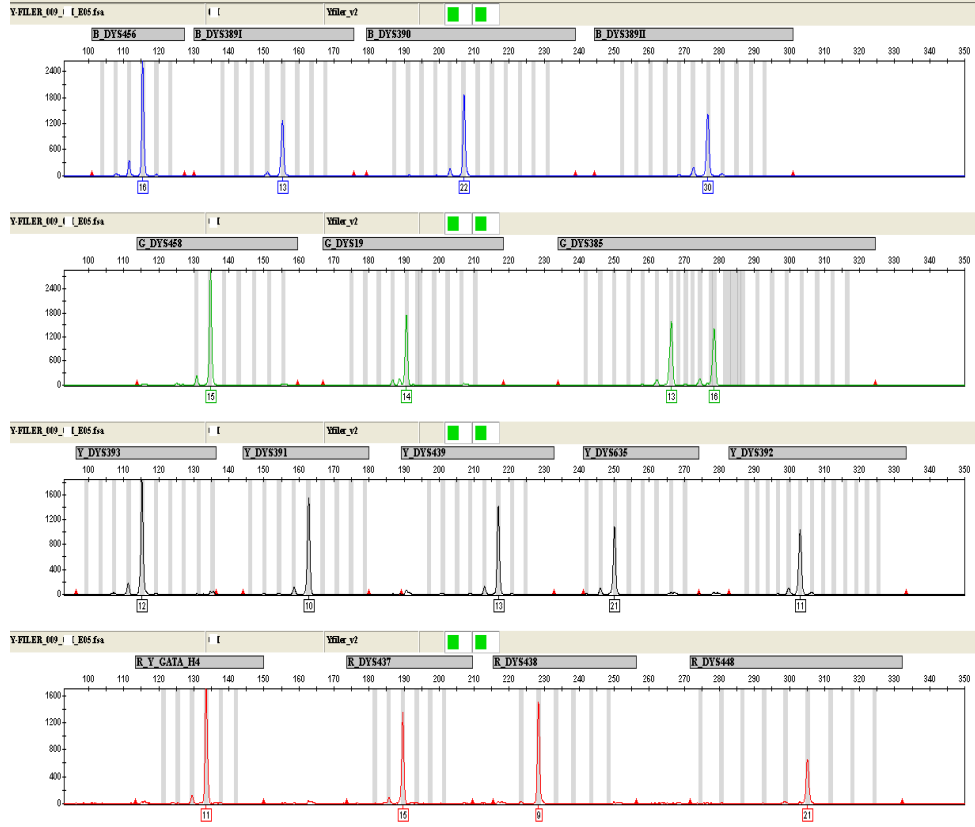
Şekil 25: B2 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu B3:



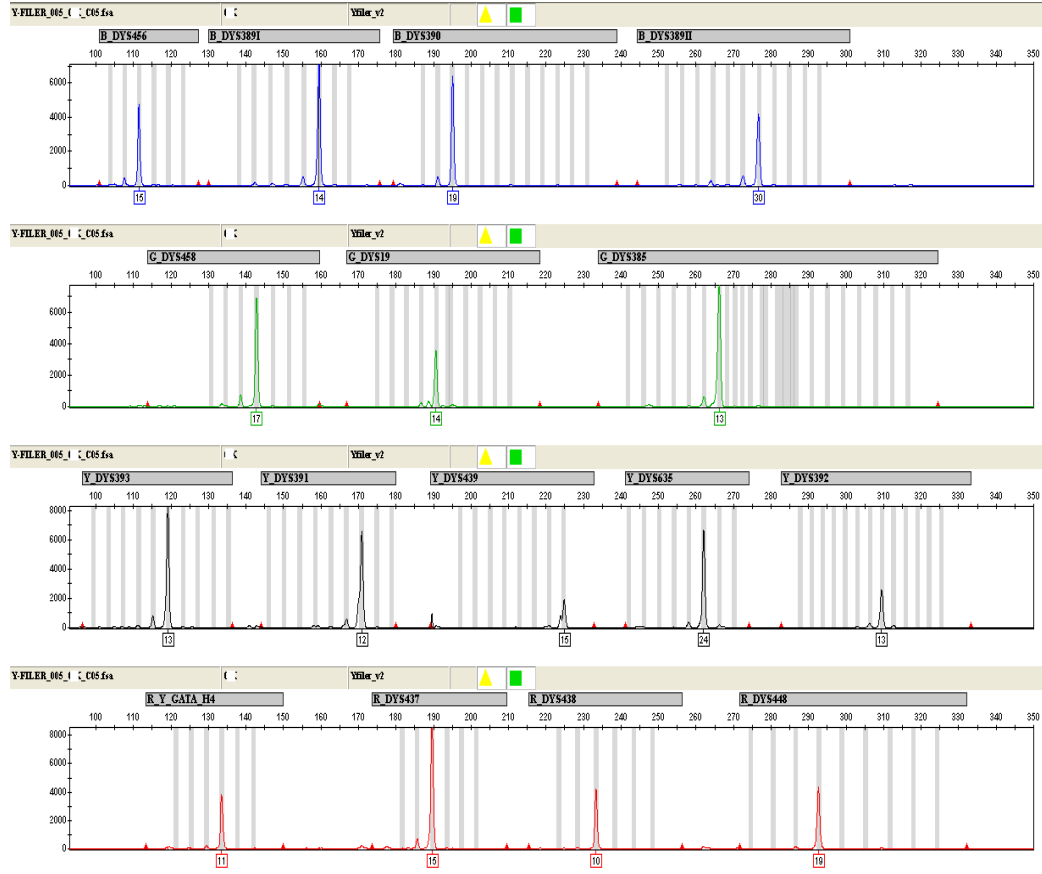
Şekil 26: B3 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

Olgu B4:



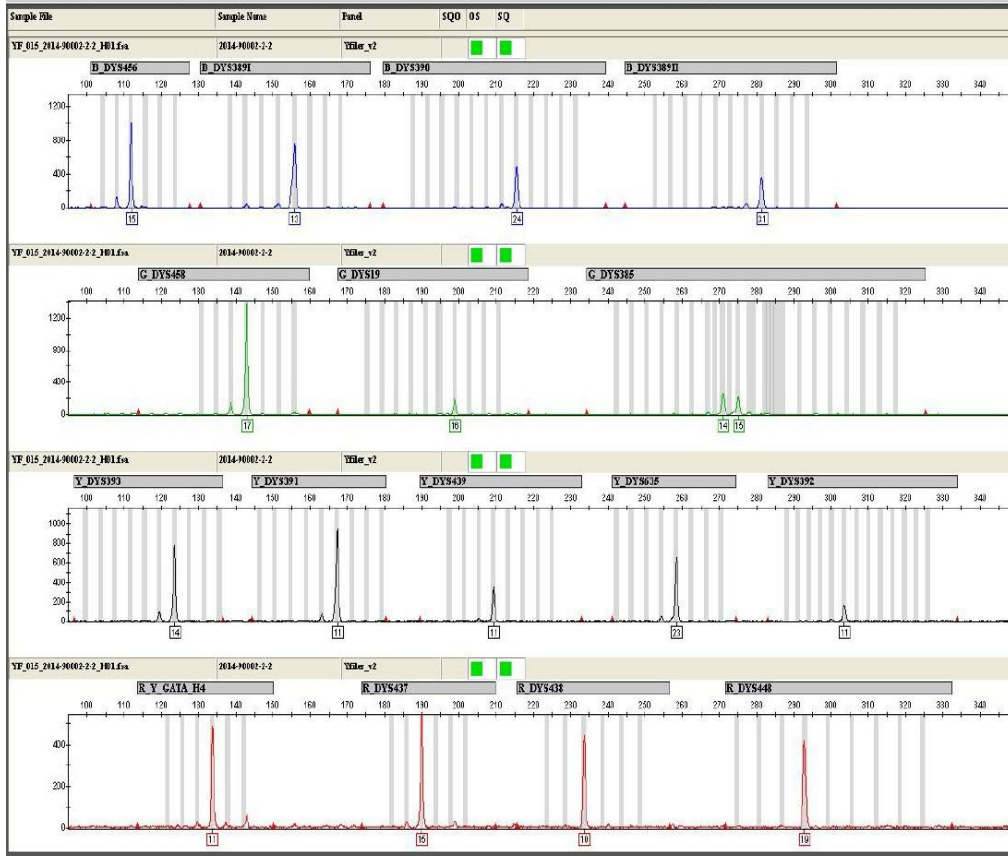
Şekil 27: B4 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi.

Olgu B5:



Şekil 28: B5 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'lerinin elektroforegram ile gösterimi.

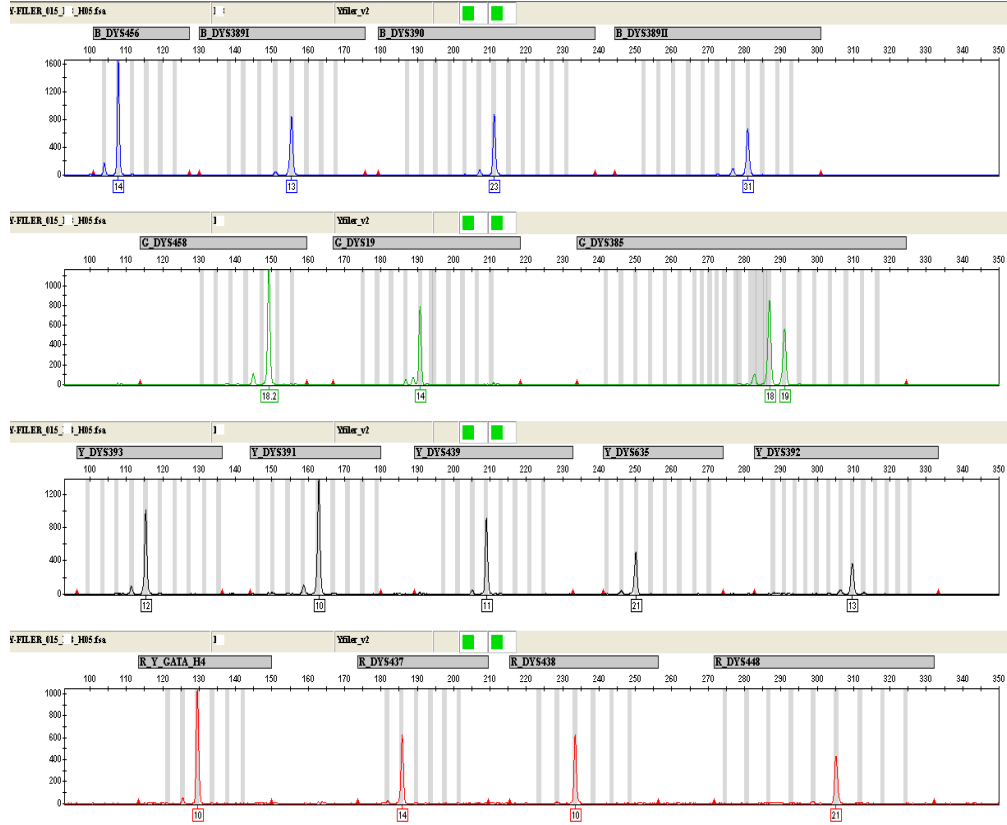
Olgu B7:



Şekil 29: B7 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi.

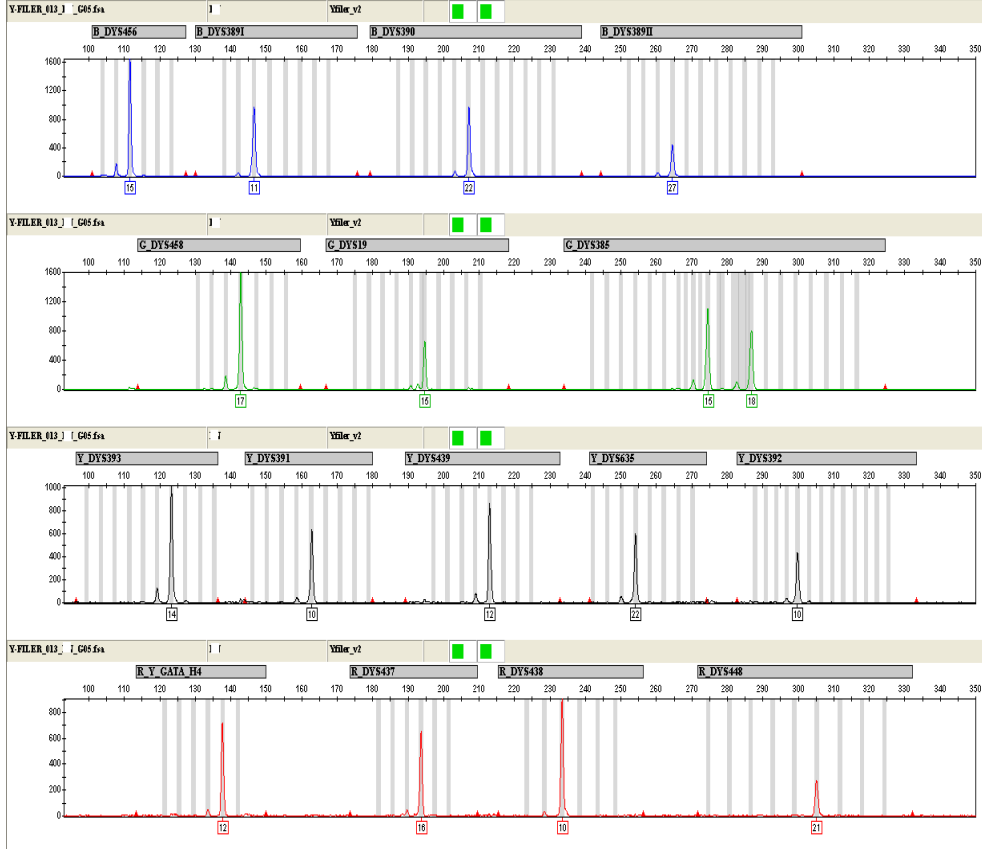
4.5. BEBEKLERİN AĞIZ İÇİ SVAP ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN DNA'NIN Y KROMOZOM PROFİLLERİ

Olgu C1:



Şekil 30: C1 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi.

Olgu C2:



Şekil 31: C2 kodlu tükürük örneğine ait Y kromozom STR'larının elektroforegram ile gösterimi.

4.6. DNA PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI

Tablo VIII : Maternal plazma örneklerinden amplifiye edilen fetal alleller ve ağız içi svap örneklerinden elde edilen paternal allellerin karşılaştırmalı gösterimi

Olgu No.	STR Lokusu															Tespit edilen lokus sayısı	Paternal Eşleşme	
	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	DYS437	DYS438	DYS448			GATA H4
A1 ♀	14	13	23	31	-	14	18	12	10	11	21	-	14	10	21	10	14	12
	14	13 14	23	31	18,2	14	18 10	12	-	11	-	13	14	-	21	10	13	
A2 ♀	15	11	-	-	-	-	12	14	-	-	-	10	-	10	21	-	7	6
	15	11	22	27	17	15	15 18	14	10	12	22	10	16	10	21	12	16	
A3 ♀	15	14	23	30	18	14	11 13	14	11	10	22	-	14	10	19	12	15	15
	15	14	23	30	18	14	11 13	14	11	10	22	14	14	10	19	12	16	
A4 ♀	16	13	22	-	15	-	13 16	12	10	-	21	-	15	9	21	11	12	12
	16	13	22	30	15	14	13	12	10	13	21	11	15	9	21	11	16	
A5 ♀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	14	19	30	17	14	13	13	12	15	24	13	15	10	19	11	16	
A6 ♀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A7 ♀	15	13	24	31	17	16	14 15	14	11	11	-	11	15	10	19	11	15	15
	15	13	24	31	17	16	14 15	14	11	11	23	11	15	10	19	11	16	
B7 ♂	15	13	24	31	17	16	14 15	14	11	11	23	11	15	10	19	11	16	

*♀ simgesi maternal plazmadan çalışılan örnekleri, ♂ simgesi ise paternal yanak içi epitel svaplardan çalışılan örnekleri temsil etmektedir.

Tablo IX : Bebeklerden ve babalarından alınan tükürük örneklerinden amplifiye edilen allellerin karşılaştırmalı gösterimi

Olgu No.	STR Lokusu																Tespit edilen lokus sayısı	Eşleşen Lokus Sayısı
	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	DYS437	DYS438	DYS448	GATA H4		
C1	14	13	23	31	18,2	14	18 19	12	10	11	21	13	14	10	21	10	16	13
B1	14	13 14	23	31	18,2	14	18 10	12	-	11	-	13	14	-	21	10	13	
C2	15	11	22	27	17	15	15 18	14	10	12	11	10	16	10	21	12	16	16
B2	15	11	22	27	17	15	15 18	14	10	12	22	10	16	10	21	12	16	

5. TARTIŞMA

Adli DNA analizlerinin kullanım alanlarından biri de otozomal, mitokondriyal ve Y kromozomal DNA özelliklerinin değerlendirilmesi ile anne ve baba bağlantılı soy bağının kurulmasıdır. Soy bağı tespiti; genetik aktarım kurallarına uygun olarak yarısı anne ve yarısı baba kaynaklı genetik materyalin uyumunun araştırılmasına dayanmaktadır (17). İnsan genomunda bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti, her biri farklı lokuslarda yer alan 50,000-100,000 geni kodlamaktadır. Bu genler “allel” olarak adlandırılan birkaç farklı formda bulunabilmektedir. Bir gen için her birey, biri anneden diğeri babadan aktarılan iki farklı allel taşıyabilirken, bir populasyon örneği aynı gen için çok sayıda allele sahip olabilmektedir. Bu genetik polimorfizm adli amaçlı DNA analizlerinin temelini oluşturmaktadır (119).

Babalık tayinini zorunlu kılan cinsel saldırı olguları başta olmak üzere, boşanma gibi diğerk bazı adli olaylarda, babalığın doğum öncesi erken tespitinin, konuyla ilgili birçok soruna çözüm getirebileceği düşünülmektedir (7). Cinsel saldırı sonucu hamile kalmış bir kadının, babalık tayini için gebeliğin ilerleyen aşamalarını beklemek zorunda kalması ciddi bir sorundur. Ayrıca uygulanacak amniosentez, CVS ve kordosentez gibi girişimsel tekniklerin doğuracağı sağlık problemleri ve bir yasal eşin varlığı söz konusu olduğunda gebeliğin devamı hususunda yasal küretaj süresi içerisinde karar verilebilmesi, önüne geçilmesi gereken diğerk sorunlardır. Bu çerçevede, maternal kandan serbest fetal DNA analizi yöntemiyle doğum öncesi babalık tayininin rutin uygulamalarda kullanılabilirliğinin araştırılmasının, adli sürecin hızlandırılmasına da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Holmes ve ark.'na (120) göre ABD'de her yıl gerçekleşen cinsel saldırıları olgularının ortalama %5'i hamilelikle sonuçlanmaktadır. İstem dışı oluşan gebeliklerin %78.9'u ise 10 haftadan önce sonlandırılmaktadır. Bu durum mağdurların çoğunun hamileliklerini babalıkla ilgili herhangi bir test uygulamadan önce sonlandırdıklarını göstermektedir (107). *Hammond ve ark.* (44) tarafından yapılan bir çalışmada istem dışı cinsel ilişki sonucu oluşan gebelikler nedeni ile 7 ile 23ncü gebelik haftalarını kapsayan dönemde prenatal babalık testi yapılan 10 olgunun sadece 1'inin adli makamlara

başvurduğu bildirilmektedir. Bu bulgu cinsel saldırı olgularında adli makamlara başvurunun gerçek sayının ancak onda biri kadar olduğu savını destekler niteliktedir (7). Aynı çalışmada 10 olgudan 6'sında gebe kadınların yasal partnerinin babalık açısından dışlanmadığı ve bu çiftlerin tümünün gebeliğe devam kararı aldığı rapor edilirken, yasal eşlerin dışlandığı olgularda ise 4 çiftten 3'ünün gebeliği sonlandırma kararı aldığı bildirilmektedir (44) .

Konu hukuksal olarak ele alındığında da uygulanacak yöntemin sağlık açısından oluşturduğu riskin göz önüne alındığı görülmektedir. Soybağı tespitinde genetik analiz hem Türk Medeni Kanunu hem de Hukuk Muhakemeleri Kanunu'nda düzenlenmiştir (121). İlave olarak ülkemizde, 4.12.2004 tarihinde yürürlüğe giren 5271 sayılı Ceza Muhakemesi Kanunu (CMK)'nun 75 ve devamı maddelerinde “vücuttan örnek alınması, genetik analiz yapılmasında uyulması gereken kurallar” belirlenmiştir. Kanunda öngörülen bu işlemlerin yapılması ile ilgili usul ve esaslar ise, 01.06.2005 tarih ve 25832 sayılı Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren “Ceza Muhakemesinde Beden Muayenesi, Genetik İncelemeler ve Fizik Kimliğin Tespiti Hakkında Yönetmelik” ile düzenlenmiştir. “Moleküler Genetik İnceleme” kavramı CMK'da tanımlanmamış olmakla birlikte Yönetmeliğin 3. maddesinde şu şekilde tanımlanmaktadır; “*Gereken tür ve miktardaki biyolojik materyali kullanarak, kişiyi diğer kişilerden ayıran ve kalıtım kurallarına uygun olarak aktarılan hastalık dışındaki özelliklerinin moleküler düzeyde araştırılmasıdır*”.

Moleküler genetik inceleme, diğer bir söylemle DNA analizi, mağdur, şüpheli ya da olay yerinden elde edilen biyolojik materyaller üzerinde yapılmaktadır. Bu materyallerin elde edilmesine ilişkin usuller ile DNA analizinin yapılabilmesinin şartları, CMK ve Yönetmelikte ayrıntılı olarak açıklanmıştır. CMK 75 ve 76 maddeleri ile ilgili yönetmelik birlikte değerlendirildiğinde, DNA analizinde kullanılacak materyalin mağdur ya da şüpheliden alınacak olması halinde; “Vücuttan kan veya benzeri biyolojik örnekler alınabilmesi için müdahalenin, kişinin sağlığına açıkça ve öngörülebilir zarar verme tehlikesinin bulunmaması gerektiği, ayrıca mağdur ve diğer kişilerin vücudundan örnek almada, cerrahi bir müdahalede bulunmama koşulunun öngörüldüğü” anlaşılmaktadır. Bu bağlamda, günümüzde kullanılan amniyosentez, kordosentez, CVS, çölosentez gibi doğrudan fetüse ait genetik materyal elde etmeye yarayan yöntemlerin sağlık açısından

taşıdıkları ciddi riskler, kanun ve yönetmelikle getirilen bu ilke ile çelişebilmektedir. Bu nedenle, DNA analizince kullanılacak biyolojik materyalin elde edilmesi için, daha az ya da hiç risk içermeyen yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması gereklidir.

Ülkemizde prenatal dönemde babalık tayini için kullanılan tek yöntemin amniyosentez olduğu bilinmektedir. Bu işlemin adli amaçlı uygulanmasına dair literatürde yalnızca bir olguya rastlanılmıştır (7). Amniyosentez, erken gebelik haftalarından itibaren tüm gebelik boyunca uygulanabilmektedir. Ancak, bunun için amnion sıvısının yeterli hacme ve hücre yoğunluğuna ulaşması zorunludur. Yöntem için, tercihen 20'nci gebelik haftası uygun görülmektedir. Aksi takdirde işlem sonrası amniyotik sıvı sızıntısı, enfeksiyon gibi maternal komplikasyonların yanında nedbe dokusu, patellar tendon yırtığı, organ ponsiyonu, nörolojik hasar gibi giderek artan önemli fetal sekellerin de gelişebileceği bildirilmiştir. Amniyosentez sonrası düşük riski ise donanımlı merkezlerde ve deneyimli ellerde dahi %1 olarak kabul edilmektedir (7,28,40). Kanunda da belirtildiği gibi biyolojik örnek alımı kişilere sağlık yönünden bir tehlike oluşturmamak şartıyla gerçekleştirilebilmektedir. Tüm bu veriler, bu çalışmada kullanılan yöntemin, yukarıdaki riskleri içermemesi nedeni ile avantajını açıkça göstermektedir.

Gebelik ile sonuçlanan cinsel saldırı olgularında rutin uygulama, mağdur gebeliğini küretaj için uygun görülen yasal süre içerisinde fark edebilmiş ve hamileliği sonlandırma kararı alınmış ise babalık tayininin küretaj materyalinden DNA analizi ile gerçekleştirilmesi şeklindedir. Türk Ceza Kanunu'nun 99 uncu maddesi bu süreyi "*Kadının mağduru olduğu bir suç sonucu gebe kalması hâlinde, süresi yirmi haftadan fazla olmamak ve kadının rızası olmak koşuluyla, gebeliği sona erdirene ceza verilmez. Ancak, bunun için gebeliğin uzman hekimler tarafından hastane ortamında sona erdirilmesi gerekir*" ifadesi ile belirlemiştir.

Maternal sirkülasyondaki serbest fetal DNA ile yapılan ilk doğum öncesi babalık tayini çalışması 2009 yılında gerçekleştirilmiştir. *Wagner ve ark.*(14) çalışmalarında fetüse ait polimorfik STR lokuslarını incelemiş ve 13 erkek gebelikte Y kromozomu üzerindeki 6-16 STR lokusunu tespit edebilmişlerdir. Bu durumu destekleyen şekilde, aynı yöntemin kullanıldığı bu çalışmada, gebeliklerinin farklı haftalarında (9-29 hafta)

olan 7 kadının plazmaları babalık tayini için analiz edilmiş ve 6 erkek gebelikte Y kromozomu üzerindeki 7-15 STR lokusu tespit edilmiştir.

A6 kodlu katılımcıdan elde edilen plazma örneği ile yapılan Y-STR çalışması sonuç vermemiştir. Bu durumun sebebinin fetüsün dişi olması olduğu ancak, doğumun gerçekleşmesinin ardından anlaşılmıştır. Literatürde henüz maternal kandaki serbest fetal DNA'lar kullanılarak yapılan ve dişi fetüslerde babalık tayini başarısı elde edilmiş bir STR çalışması bulunmamaktadır. *Wagner ve ark.* (14) bu başarısızlığı, plazmada bulunan maternal DNA miktarının serbest fetal DNA miktarından belirgin şekilde fazla olması ve bu fazlalığın fetal DNA'ya primer bağlanmasını suprese etmesi olarak ifade etmişleridir. Bu bilgi eşliğinde bu çalışma, maternal kanda Y-STR polimorfizmi tespiti üzerine kurulmuştur. Nitekim, dişi fetüs taşıyan A6 kodlu olguda Y kromozomuna ait herhangi bir veri elde edilememiştir.

A2 kodlu olguda maternal kanda tespit edilen fetal DNA miktarı 0.002 ng/μl ve A4 kodlu olguda bu değer 0.000 ng/μl olmasına rağmen elektroforez sonucunda Y-STR DNA profili elde edilebilmiştir.

A6 kodlu olgunun, geçmişte bir erkek bebek doğumu gerçekleştirdiği bilinmektedir. Literatürde fetal hücrelerin maternal kanda doğumdan yıllar sonra dahi tespit edilebildiğine dair çalışmalar mevcuttur (71,122-125). Bu çalışmada bu verileri destekleyecek bir sonuç alınamamıştır. Bahsi geçen çalışmalarda bu çalışmadan farklı olarak maternal ve fetal hücrelerin yüzey antijenlerinin farklılıklarına dayalı bir çalışma yürütülmüştür. 6 kodlu katılımcının maternal kan örneğinden elde edilen DNA profili sonuçları, bu çalışma ile benzer bir teknik kullanılan bir başka çalışma ile uyum göstermektedir. Söz konusu çalışmada *Lo ve ark.* (126) daha önce erkek bebek doğumu yapmış 8 kadının periferik kanlarında Y kromozomuna spesifik sekansların amplifikasyonu denemiş fakat olgulardan hiçbirinde pozitif bir sinyal alınamamıştır.

Maternal supresyona ek olarak karşılaşılan bir başka sorun ise bu komponentlerin plazmada yüksek oranda degrade durumda bulunmasıdır (108). Degrade DNA örnekleri için kısa fragmentler halindeki SNP'lerin analizinin bu problemin önüne geçebileceği düşünülmektedir (115). Otozomal SNP'lerin düşük mutasyon oranları ve özellikle bozulmuş DNA örneklerinde kısa ampikonların kullanılması gibi potansiyel avantajları

vardır. Bu komponentlerin babalık tayini için kullanılabilirliği adli araştırıcılar tarafından incelenmektedir (116). *Guo ve ark* (107) 2012 yılında yaptıkları çalışmada; 8-14 gebelik haftalarında bulunan 30 kadının maternal kan örneklerinden elde ettikleri serbest fetal DNA'ları SNP kullanarak incelemiş ve tüm örneklerin babalık tayininde başarılı olmuşlardır. *Ryan ve ark* 'nın (108) 2013 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise yine SNP tekniğinden yararlanılarak 6 haftalık gebelikte prenatal dönem babalık tayini başarısı elde edilmiştir. Ancak SNP'ler ve STR'ler arasındaki karşılaştırma SNP'lerin adli DNA kimliklendirme markerları olarak STR'lerle yer değiştirmeye henüz hazır olmadığını göstermiştir (117). SNP'ler STR'ler kadar polimorfik olmadıkları için aynı ayırım gücü ve rastgele olasılık hesaplamalarına ulaşmak amacıyla daha fazla SNP bölgesinin çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (118).

Babalık testlerinde ortak bir uygulama olarak, analiz edilen 6-15 STR lokusundan bir veya iki tanesinde uyumsuzluk gözlenmesi, babalığın reddinden çok bir mutasyon şeklinde değerlendirilmektedir (118). *Kayser ve ark.* (127) dışlama gücünü araştırmak için babalığı onaylanmış 415 baba-oğul çiftini 9 Y-STR lokusunda incelemiş ve bir baba-oğul çiftinde 2 Y-STR lokusunda mutasyon saptamışlardır. Çalışılan lokus sayısı 15 Y-STR'a çıkarılınca ikinci baba-oğul çiftinde de 2 mutasyon saptanmıştır. Babalık olgularında bir dışlama yapabilmek için en az 3 STR lokusunun uyumsuzluğu gerekmektedir (128). Dolayısı ile bu çalışmada, A2 ve B2 kodlu olguların (baba- oğul) DYS385 lokuslarında görülen uyumsuzluk bir dışlama olarak yorumlanmamaktadır.

Bazı Y-STR lokuslarında duplikasyon nedeni ile iki allel bulunmakta olup bu durumun karışık profil olarak değerlendirilmemesi gerekmektedir (128). Örneğin DYS385 lokusu, Y kromozomunun uzun kolu boyunca iki bölgede mevcuttur. Bu duplike bölgeler 40000 bp aralıklarla yerleşmiştir ve tek bir primer dizisi ile amplifiye edildiklerinde iki farklı alel meydana getirebilmektedirler. Bu iki alel "a" ve "b" olarak adlandırılmışlardır. Y kromozomunda primer bağlanan iki bölge mevcut olduğunda PCR amplifikasyonu sırasında bir yerine lokusun iki kopyası da amplifiye olabilir (129). Bu alışmada; B1, B2, B3, B7, A3, A4, A7, C1 ve C2 kodlu katılımcılara ait elektroforegramlarda DYS385 ve DYS389I lokuslarında gözlenen çift pikler bu şekilde açıklanabilir.

Lo ve ark. (77) 1998 yılında yaptıkları çalışmada maternal serum ve plazmadaki serbest fetal DNA konsantrasyonunu; erken gebeliklerde serumda ortalama %0.13 ve plazmada ortalama %3.4, geç gebeliklerde serumda ortalama %1.0 ve plazmada ortalama %6.2 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada, maternal plazmadaki serbest fetal DNA konsantrasyonu Real Time PCR tekniğiyle ve ticari kit ile ölçülmüş ve elde edilen en yüksek miktar 0.032 ng/μl olarak tespit edilmiştir.

Olguların gebelikleri ile ilgili bilgiler değerlendirildiğinde (tablo V), bir olgu (9 hafta) dışında tüm olgularda gebelik yaşının 10 haftanın üzerinde olduğu görülmektedir. *Lo ve ark. (77)* Mann-Whitney rank sum testi uygulayarak yaptıkları istatistiksel analizde 27 hamile kadının kanlarını incelemiş, maternal plazma ve serumda bulunan serbest fetal DNA konsantrasyonunun geç gebeliklerde erken gebeliklere oranla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir ($P<.0005$). Bu çalışmada ise gebelik yaşı ile serbest fetal DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Pearson Korelasyon analizi sonuçlarına göre (tablo VII), gebelik yaşı ile serbest fetal DNA değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($r=-.216, p>.05$). Bu durumun örneklem sayısının azlığı ve analize dahil edilen olguların gebelik haftalarının birbirine yakınlığı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Zira fetal DNA miktarının ilerleyen gebelikte doğru orantılı olarak arttığını ifade eden birçok çalışma (77, 130-133) mevcuttur.

Yapılan görüşmelerde, konunun adli amaçlı bir çalışma olmasının katılımcılarda ciddi bir tedirginlik yarattığı gözlemlenmiştir. Birçok kadın babalık tayini gibi bir amaçla çalışma yapılmasının, eşlerinde şüphe uyandıracak endişesine kapıldıklarını ifade etmiştir. Erkek partnerlerin endişelerinin ise eşlerinin bu hassas dönemde strese girebilecekleri ile ilgili olduğu görülmüştür. Uzun zaman beklenmesi ve farklı kaynaklar araştırılmasına rağmen olgu sayısı arttırılamamıştır. Tüm bunların yanı sıra, toplumumuzun bilimsel çalışmalara katkıda bulunmak için olsa dahi DNA örneklerini paylaşmaktan imtina ettikleri ve bu anlamda ciddi bir güven sorunu yaşadıkları gözlemlenmiştir.

Çalışma sürecinde, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan maternal kanda babalık tayini amacı ile İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsüne gönderilen 2 cinsel saldırı olgusu da çalışmaya dahil edilmek

istenilmiştir. Talepte bulunan birim ile çalışmanın yapılacağı birim aynı kampüs içerisinde olduğundan, ilgililer tarafından, örneklerin alınacağı tüplerde pıhtılaşmayı önleyici bir faktörün olmasına gerek duyulmamıştır. Zira rutin uygulamada, hemolize uğramış hatta kurumuş kandan dahi adli DNA analizleri yapılabilmektedir.

Söz konusu olgular, alınan kanların geçen süre içerisinde pıhtılaşması ve istenilen özellikte plazmaya ulaşamaması sebebi ile bu çalışmaya dahil edilememiştir. Yapılan çalışmalar serbest fetal DNA'nın maternal serumdan çok maternal plazmada bulunduğunu göstermektedir (77). Bu çalışmada kullanılan yöntem de maternal plazmanın ayrıştırılmasına gereksinim göstermektedir. Bu şekilde materyal gönderilmesi alışkanlık haline geldiğinden, bu tutumdan vazgeçilmesi zaman alabilir. Ancak bu sonuç, incelenen yöntem rutin uygulamaya geçtiğinde, talepte bulunan kurumların uyarılması gerektiğini göstermektedir. Diğer yandan taleplerin başlamış olması da çalışma açısından özel bir öneme sahiptir.

6. SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, anne kanından serbest fetal DNA analizi yöntemiyle doğum öncesi babalık tayininin Türkiye'de rutin uygulamada yer alan kurumlarda kullanılabilirliğini araştırmaktır.

Zira babalık tayinini zorunlu kılan cinsel saldırı, boşanma gibi adli olaylarda doğum öncesi tespitin önemi büyüktür. Cinsel saldırı sonucu hamile kalmış bir kadının analiz için gebeliğin ilerleyen aşamalarını beklemek zorunda kalması, uygulanacak girişimsel tekniklerin doğuracağı sağlık problemleri, bir yasal eşin varlığı söz konusu olduğunda gebeliğin devamı hususunda karar verilebilmesi; önüne geçilmesi gereken problemler arasındadır. Kanunda da belirtildiği üzere, DNA analizinde kullanılacak biyolojik materyal alınırken müdahalenin, kişinin sağlığına açıkça ve öngörülebilir zarar verme tehlikesinin bulunmaması gerekmektedir. Anne kanından serbest fetal DNA analizi ile doğum öncesi babalık tayini, girişimsel olmayan ve erken gebelik haftalarında dahi başarılı sonuçlar veren bir yöntemdir. Ayrıca yöntem teknik olarak mevcut kurumlarımızda uygulanabilecek niteliktedir.

Ülkemizde anne kanından serbest fetal DNA analizi yöntemi ile babalık tayini yapmayı amaçlamış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda bu çalışma bir ilk olma özelliğindedir. Türkiye'de prenatal dönemde babalık tayini için kullanılan tek yöntemin amniyosentez olduğu görülmektedir. Bu işlemin ülkemizde adli amaçlı kullanılmasına dair, literatürde yalnızca bir olgu sunumuna rastlanmıştır. Ancak bu girişimsel yöntem, uygulanabilirlik süresinin fazlalığı ve ciddi riskler oluşturabilmesi nedeniyle adli makamlar tarafından mümkün olduğunca başvurulmamaktadır.

Erken gebelik haftalarında uygulanabilirliği ve girişimsel olmayan bir method ile güvenilir sonuçlar alınabilmesi, doğum öncesi babalık tayini için bu yöntemin ilerleyen zamanlarda mevcut kurumlarımızda rutin uygulamaya geçebileceğini düşündürmektedir. Ancak bunun için birtakım problemlerin çözüme ulaşması gerekmektedir.

Yapılan çalışmalar serbest fetal DNA'nın maternal serumdan çok maternal plazmada bulunduğunu göstermektedir. Dolayısı ile rutin uygulamadan farklı olarak bu

çalışmada kullanılan yöntem maternal plazmanın ayrıştırılmasına gereksinim duymaktadır. Pıhtılaşma önleyici madde içermeyen tüplere alınan kanlardan, istenilen özellikte plazma elde edilemeyecek olması talepte bulunan kurumların uyarılmasını ya da yöntem rutin uygulamaya geçtiğinde, materyal gönderecek kurumlar için bir yönerge hazırlanmasını gerektirebilir.

Bir diğer önemli husus ise fetüsün dişi olması durumunda, plazmadaki maternal DNA yoğunluğunun fetal DNA'yı baskılamasıdır. Bu durum, yöntemin dişi fetüs taşıyan hamilelerde başarıya ulaşmasını engellemektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalar bu sorunu ortadan kaldırmak üzerine olmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- 1-**Simpson JL, Elias S. (1994) Fetal cells in maternal blood: Overview and historical perspective. In: Simpson JL, Elias S, eds. Fetal Cells in Maternal Blood: Prospective for Noninvasive Prenatal Diagnosis. New York Academy of Sciences; p.1-8.
- 2-**Fuchs F, Riis P. (1956) Antenatal sex determination. Nature (London), 177,330
- 3-** Nadler HL. (1968) Antenatal detection of hereditary disorders. Pediatrics, 42:6 912-8.
- 4-** Kuliev AM, Modell B, Jackson L, et al. (1993) Risk evaluation of CVS. Prenat Diagn, 13:197-209.
- 5-** Adams J. (2008) Nature Education Citation: Paternity testing: blood types and DNA. Nature Education 1(1):146
- 6-** Strom CM, Rechitsky S, Ginsberg N, Verlinsky O, Verlinsky Y. (1996) Prenatal paternity testing with deoxiribonucleic acid techniques. Am J Obstet Gynecol, 174:1849-54
- 7-** Aşıcıoğlu F., Çetinkaya Ü., Müslamanoğlu Ö. (2003) Prenatal Babalık Testi: Bir Etik İkilem. Perinatoloji Dergisi.; Cilt: 11, Sayı: 1-2/Mart-Haziran
- 8-**Tabor A., Alfirevic Z. (2010) Update on Procedure-Related Risks for Prenatal Diagnosis Techniques Fetal Diagn Ther,;27:1-7
- 9-**Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, MacKenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM. (1991) Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days gestation. Lancet;337:762-3
- 10-**Jong A, Dondorp WJ, Smulders CEM, Frints SGM, Wert GMWR. (2010) Non-invasive testing: ethical issues explored. European Journal of Human Genetics 18,272-277
- 11-** Schmorl G. (1893) Pathologisch- anatomische Untersuchungen ueber Publereklampsie. Liepzig: Vogel
- 12-** Sargent IL, Johansen M, Chua S, Redman CV. (1994) Clinical experience: Isolating trophoblasts from maternal blood. Ann N Y Acad Sci, 731:154-61
- 13-** Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, RedmanCWG, Wainscoat JS. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 350: 485-87

- 14-** [Wagner J](#), [Dzijan S](#), [Marjanović D](#), [Lauc G](#). (2009) Non-invasive prenatal paternity testing from maternal blood. *Int J Legal Med.* Jan ;123(1):75-9.
- 15-** Lo YMD. (2000) Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications. *Clinical Chemistry*, 46:12 1903-1906
- 16-** Hall A, Bostanci A, Wright CF. (2010) Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free DNA technology: applications and implications. *Public Health Genomics*, 13:246-255
- 17-** Tuğ A. (2010) Babalık testlerinde son düzenlemeler. *Journal of Forensic Medicine*, 24(1): 52-589.
- 18-** Tuğ A., Elma C. (2008) Ankara Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı 2004-2007 verileri ile babalık testlerinin değerlendirilmesi. *Journal of Forensic Medicine*, 22(3): 15-21.
- 19-** K. Albrecht., D. Schultheiss. (2004) Proof of paternity: Historical reflections on an andrological- forensic challenge. *Andrologia* 36,31-37.
- 20-** Berki OF. (1950) Türk devletler hususi hukukunda babalık davası. *Ankara Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi*, 7(3): 359-377.
- 21-** Jeffreys AJ., Wilson W., Thein SL. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73
- 22-** Butler J.M. (2007) Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*. 43(4):ii-v.
- 23-** Tamaki K., Jeffreys A.J. (2005) Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Leg Med* 7(4):244-50.
- 24-** Bartlett J.M.S, Stirling D. (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols Methods in Molecular Biology*, 226, pp 3-6
- 25-** Butler J.M. (2006) Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing, *J Forensic Sci.*, 51 (2): 253-265
- 26-** Niewoehner L., Andrasko J., Biegstraaten J., Gunaratnam L., Steffen S., Uhlig S., Antoni S. (2008) GSR2005--continuity of the ENFSI proficiency test on identification of GSR by SEM/EDX. *J Forensic Sci.* Jan;53(1):162-7.

- 27-** Aronson JD. (2005) DNA fingerprinting on trial: the dramatic early history of a new forensic technique. *Endeavour Sep*; vol (29) No.3.
- 28-** Yararbaş K, Ilgın-Ruhi H. (2006) Prenatal tanı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 26:666-674
- 29-** Hook EB. (1992) Chromosome abnormalities; prevalence, risks and recurrence. In: Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson-Smith MA (eds) *Prenatal diagnosis and screening*. Edinburg: Longman Group UK Limited, 351-392
- 30-** Röntgen WC (1896) On a new kind of rays. *Science III*: 227-231
- 31-** Brecher R, Brecher E. (1969) *The Rays: A history of radiology in the United States and Canada*. New York: Williams and Wilkins
- 32-** Case JT. (1917) Anencephaly successfully diagnosed before birth. *Sung Gyn Obstet*, 24:312-317
- 33-** Steele MW, Breg WR Jr. (1966) Chromosome analyses of human amniotic fluid cells. *Lancet*, 1:383-385
- 34-** Resta RG. (1997) The historical perspective: The first prenatal diagnosis of a fetal abnormality. *Journal of Genetic Counseling*, 6:81
- 35-** Beksaç MS. (1996) Prenatal tanıda noninvaziv yöntemler. In: Beksaç MS Ed. *Fetal Tıp; Prenatal Tanı*. Ankara Medical Network, 45-52
- 36-** Schatz F. (1982) Eine besondere art von ein seitiger polyhydramnie mit aderseitiger oligohydramnie bei zwillingen. *Arch Gynaekol*, 19:329-37
- 37-** Jeffcoate TNA, Fliegner JHR, Russel SH. (1965) Diagnosis of adrenogenital syndrome before birth. *Lancet*, 2:553
- 38-** Valenti C, Schutta EJ, Kehatty T. (1968) Prenatal diagnosis of Down's Syndrome. *Lancet*, 2:220
- 39-** Nata M, Nagae M, Aoki Y, Sagisaka K, Uehara S. (1993) Prenatal paternity testing with DNA analyses. *Int J Legal Med*, 106:160-162
- 40-** Uludağ S. (1999) Prenatal tanı amacıyla yapılan girişimlerde komplikasyonlar va zamanlama. *Perinatoloji Dergisi*, Cilt: 7 Sayı: 4, 281-289

- 41-** Brambati B, Oldrini A, Lanzani A. (1990) Transabdominal and transcervical chorionic villus sampling; efficiency risk evaluation of 2411 cases. *Am J Med Genet*, 35:160-164
- 42-** Hahnemann N, Mohr J. (1968) Genetic diagnosis in embryo by means of biopsy from extra embryonic membranes. *Bull Soc Hum Genet*, 2:23
- 43-** Kazy Z, Rozovsky I, Bakhaey V. (1982) Chorion biopsy in early pregnancy: a method of early prenatal diagnosis for inherited disorders. *Prenat Diagn*, 2:39-45
- 44-** Hammond HA, Redman JB, Caskey TC. (1995) In utero paternity testing following alleged sexual assault. *JAMA* 273:1774–1777
- 45-** Boehm FH, Crane JP (1996): Sonographically guided chorionic villus sampling. In Fleicher AC, Manning FA, Jeanty P, Romero R eds *Sonography in Obstetrics and Gynecology*, Fifth edition, Prentice -Hall International Inc p 622-628.
- 46-** Yıldırım G, Güngördük K, Gül A, Aslan H, Ceylan Y, Gedikbaşı A. (2008) Kliniğimizde uygulanan kordosentez sonuçları: 260 olgunun değerlendirilmesi. *J Turkish-German Gynecol Assoc*, Vol. 9(4); 224-230.
- 47-** Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F (1983): A new procedure for blood sampling in utero; Preliminary results of fifty-three cases. *Am J Obstet Gynecol* 146: 985-986.
- 48-** Erdemoğlu M, Kale A, Akdeniz N. (2007) Prenatal tanı amacıyla kordosentez uygulanan 172 olgunun değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*;1:7-13.
- 49-** Foley MR, Sonek J, Paraskos J.(1991) Development and initial experience with a manually controlled spring wire device (“Cordostat”) to aid in difficult funipuncture. *Obstet Gynecol*, 77:471.
- 50-** Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Kaponis A, Lolis D. (1997) Prenatal diagnosis of b-thalassaemia by coelocentesis. *Molecular Human Reproduction*, vol.3(8); pp. 729–731.
- 51-** Ross JA, Jurkovic D, Nicolaidis K.(1997) Coelocentesis: A Study of Short Term Safety. *Prenat Diagn*, 17:10 913-917
- 52-** Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Kaponis A, Lolis D. (2004) Prenatal Paternity Testing Using DNA Extracted from Coelomic Cells. *Fetal Diagn Ther*, 19:75-7

- 53-** Mandel P, M'etais P. (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. CR Acad Sci ,Paris 142: 241–243
- 54-** Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. (1966) Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 45: 1732–1740
- 55-** Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. Cancer and Metastasis Reviews 18: 65–73
- 56-** Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M. and Yaros, M.J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 37, 646–650.
- 56-** Swarup V, Rajeswari M.R. (2007) Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. FEBS Letters 581 (2007) 795–799
- 57-** Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. (1959) Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. Am J Obstet Gynecol, 78:960-73
- 58-** Clayton EM, Feldhaus WD, Whitacre FE. (1964) Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. Obstet Gynecol, 23: 915-9
- 59-** Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. (1969) Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. Lancet, 1:1119-22
- 60-** Schroder J, Schroder E, Cann HM. (1977) Fetal cells in the maternal blood. Lack of response of fetal cells in maternal blood to mitogens and mixed leukocyte culture. Hum Genet, 38:91-7
- 61-** Martin WL, Durrant LG, Liu DTY. (1998) Non-invasive fetal cell isolation from maternal blood. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, Vol. 105,pp 576-583
- 62-** Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J. (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. Proc Natl Acad Sci USA, 76:1453-5
- 63-** Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampiero M, Gillmer MD, Fleming KA. (1989) Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet, 2:1363-5

- 64-** Sargent IL, Choo YS, Redman CW. (1994) Isolating and analyzing fetal leukocytes in maternal blood. *Ann N Y Acad Sci.* 731:147-53
- 65-** Dave GS, Tan XW, Xiao ZG. (2007) Cell migration from baby to mother. *Cell Adh Migr*, 1(1): 19–27.
- 66-** [Hromadníková I](#), [Bendukidze N](#), [Mrstinová M](#), [Ivasková E](#). (2001) Analysis of paternal alleles in nucleated red blood cells enriched from maternal blood. *Folia Biologica (Praha)*, 47; 36-39.
- 67-** Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM. (1997) PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Human Genet*, 61:822-9
- 68-** Price JO, Elias S, Wachtel SS, et al. (1991) Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol*, 165:1731-7
- 69-** Shulman LP. (2003) Fetal cells in maternal blood. *Curr Womens Health Rep*, 3:47-54
- 70-** Ho SSY, O' Donoghue K, Choolani M. (2003) Fetal cells in maternal blood: State of the art for non-invasive prenatal diagnosis. *Ann Acad Med*, 32:579-604
- 71-** Bianchi DW. (1995) Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *The Journal of Pediatrics*, 127:847-56
- 72-** Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, et al. (1999) Approximately half of erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod*, 5:1162-1165
- 73-** Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 3279-3283
- 74-** Lo YM. (1994) Non-invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *Clin Pathol*, 47:1060-1065
- 75-** Lo YMD. (2001) Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann NY Acad Sci* , 945: 1–7
- 76-** Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *AM. J. Hum. Genet*, 64:218-224

- 77-** Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *AM. J. Hum. Genet*, 62:768-775
- 78-** Poon LLM, Lo YMD. (2001). Circulating fetal DNA in maternal plasma. *Clinica Chemica Acta*, 313:151-155
- 79-** Fournié GJ, Martres F, Pourrat JP, Alary C, Rumeau M. (1993). Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology*, 39:215–221
- 80-** Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. (2000). Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn*, 20:886-9
- 81-** Bianchi DW, LeShane ES, Cowam JM. (2001) Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem*, 47:1867-9
- 82-** Al-Yamata MK, Mustafa AS, Ali S, Abraham S, Khan Z, Khaja N. (2001) Detection of Y chromosome specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested plomerase chain reaction. *Prenat Diagn*, 21:399-402
- 83-** Angert RM, LeShane ES, Yarnell RW, Johnson KL, Biznchi DW. (2004) Cell free fetal DNA in cerebrospinal fluid of peripartum women. *Am J Obstet Gynecol*.
- 84-** Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Mello G, Mecacci F, Scarselli G. (2003) Detection of the fetal DNA in the peritoneal cavity during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 107:210-1
- 85-** Bianchi DW. (2004) Circulating fetal DNA: Its origin and diagnostic potential. *Placenta*, 25 Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 18, S93–S101
- 86-** Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. (2003). Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: Detection by real time pcr in early pregnancy after assisted reproductive techniuqe. *Hum Reprod*, 18:1733-6
- 87-** Ng EKO, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS. (2003). mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:4360-2

- 88-**Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. (2002) Fetal -gender determination in early pregnancy through quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet*,110:75-79
- 89-** Costa JM, Benachi A, Gautier E. (2002). New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med*, 346: 1502
- 90-** Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, et al. (1998) Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*, 339:1734–1738
- 91-** Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. (2000) Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 107:766–769
- 92-** Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. (2002) Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 42:1079-1085
- 93-** Lo YMD. (2005) Recent Advances in Fetal Nucleic Acids in Maternal Plasma, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Volume 53(3): 293–296
- 94-** Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, et al. (1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45:184–188
- 95-** Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM (1998) Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 352: 1904–1905
- 96-** Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, et al. (2001) Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem*, 47:2164– 2165
- 97-** Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. (2000) High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn*, 20:838-41
- 98-** Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, et al. (1999) Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem*, 45:1747–1751

- 99-** Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Jackson LR. (2000). Fetal dna in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn*, 20:795-8
- 100-** Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, et al. (2002) Increased cell-free fetal dna in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem*, 47:1856-1858
- 101-** Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 46:301–302
- 102-** Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T (2000) Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 356:1170
- 103-** Gonzales- Gonzales MC, Garcia- Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda- Sanchez I, Diaz- Recasens J, Gallardo E, et al. (2002) Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal dna from maternal plasma. *Prenat Diagn*, 22:946-948
- 104-** Gonzales- Gonzales MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia- Hoyos M, Lorda- Sanchez I, Diaz- Recasens J, Ayusto C, et al. (2003) Huntington disease- unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn*, 23:232-234
- 105-** Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YMD. (2002) Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem*, 48:778-780
- 106-** Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DHK, Lo YMD (2002) Prenatal exclusion of beta-thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 360:998– 1000
- 107-** [Guo X](#), [Bayliss P](#), [Damewood M](#), [Varney J](#), [Ma E](#), [Vallecillo B](#), [Dhallan R](#). (2012) A Noninvasive Test to Determine Paternity in Pregnancy. *N Engl J Med*, 3;366(18):1743-5
- 108-** Ryan A, Baner J, Demko Z, Hill M, Sigurjonsson S, Baird ML, Rabinowitz M. (2013) Informatics-based highly accurate noninvasive prenatal paternity testing. *Genetics in Medicine* 15, 473-477
- 109-** Quintana-Murci L, Krausz C, McF.ireavev K. (2001) The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci Int*, 118: 169-181

- 110-** Prinz M, Sansonc M.Y (2001) Y Chromosome-specific short tandem repeats in Forensic Casework. *Croatian Med Journal*, 42(3)288-291
- 111-** Sajantila A., Lukka M., Syvanen AC. (1999) Expreimentally observed germline mutations at human micro-and minisatellite loci. *Eur J Human Genet*, 7:263-266
- 112-** Kayser M., Roewer L., Hedman M., Henke L., Henke J., Brauer S., Kruger C., Krawczak, Nagy M., Dobosz T., Szibor R., de Knijff P., Stoneking M. and Sajantila A., (2000) Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *American Journal of Human Genetics*, 66:1580– 1588.
- 113-**Özkorkmaz EG.,Özkorkmaz A. (2011) Y-STR Belirteçleri: Adli Önemi ve Terminolojisi. *Turkiye Klinikleri J Foren Med*, 8(2):85-91
- 114-**Wang DG. et al. (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Scinece*, 280 (5366): 1077-1082
- 115-** Divne AM., Allen M. (2005) A DNA microarray system for forensic SNP analysis. *Forensic Science International*, 154:111- 121.
- 116-**Sobrinho B., Lareu M., Brion M., Carracedo A. (2004) SNP genotyping with single base extension-tag microarrays.*International Congress Series*, 1261:331-333.
- 117-** Butler JM., Coble MD., Vallone P. M. (2007) STRs vs. SNPs: thoughts on the future forensic DNA testing.*Forensic Science Medical Pathology*, 3:200-205.
- 118-** Yükseloğlu H. (2003) Y Kromozomu STR polimorfizminin babalık tayini ve adli identifikasyonda kullanımı. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul
- 119-** Robetson J, Ross AM, Burgayne LA. (1990) DNA in Forensic Science: Theory, Techniques and Applications. London: Ellis Howard Ltd.
- 120-** Holmes HM, Resnick HS, Kilpatrick DG, Best CL. (1996) Rape-related pregnancy: Estimates and descriptive characteristics from a national sample of women. *Am J Obstet Gynecol*, 175:320-5
- 121-** Tüzüner Ö. (2013) Soybağının tespiti davasında genetik analize ilişkin hükümlerin değerlendirilmesi. *AÜHFD*, 62(4):1139-1166

- 122-** Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S. (1996) Male progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 93:705-708
- 123-** Schröder J, Thlikainen A, de la Chapelle A. (1974) Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. *Transplantation*, 17:134-43
- 124-** Hsieh TT, Pao CC, Hor JJ, Kao SM. (1993) Presence of fetal cells in maternal circulation after delivery. *Hum Genet*, 92:204-5
- 125-** Hamada H, Arinami T, Hamaguchi H, Kubo T. (1994) Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood after delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 170:1188-93
- 126-** [Lo YM](#), [Patel P](#), [Baigent CN](#), [Gillmer MD](#), [Chamberlain P](#), [Travi M](#), [Sampietro M](#), [Wainscoat JS](#), [Fleming KA](#). (1993) Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction. *Hum Genet*, Jan; 90(5):483-8
- 127-** Kayser M. et al. (2001) An extensive analysis of Y- chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. *Am J Hum Genet*, 68:990-1018
- 128-** Corach D., Risso LF., Marino M., Penacino ., Sala A. (2001) Routine Y-STR typing in forensic casework. *For. Sci. Int*, 118:131-135
- 129-** Kittler R., Erler A., Brauer S., Stoneking M. and Kayser M., (2003) Intrachromosomal Exchange on the human Y chromosome explained by population history. *European journal of Human Genetic*, 11:304-314.
- 130-** Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. (2005) Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*, Jan-Feb;11 (1):59-67
- 131-** Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. (2001) Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion*, Dec, 41(12): 1524-30
- 132-** Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM, Lo YM. (2003) Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem*, 49(4):678-80
- 133-** Horinek A, Korabecna M, Panczak A, Gallova ZU, Nouzova K, Calda P, Hancarova M. (2008) Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: Methodology issues and kinetics. *Fetal Diagn Ther*, 24:15-21

ÖZET

DNA'nın polimorfik özelliklerinin değerlendirilmesi ile soy bağı tespiti yapılması adli DNA analizlerin en önemli kullanım alanlarından biridir. Gebelikle sonuçlanan cinsel saldırı olguları doğum öncesi erken dönem babalık tayinini gerekli kılmaktadır. Günümüzde bu tespit amniyosentez ve CVS gibi invaziv girişimsel tekniklerle yapılabilmektedir. Neden oldukları maternal ve fetal riskler sebebi ile bu yöntemlere adli makamlar tarafından nadiren başvurulmaktadır.

Bu çalışmada; invaziv girişimsel olmayan bir teknikle doğum öncesi babalık tayini yapılması amaçlandı.

Gönüllü katılımcılardan aydınlatılmış onamları alınarak temin edilen kan ve tükürük örnekleri, DNA profilleme amacı ile incelendi. Çalışmanın laboratuvar kısmı, T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu'nun B.03.1.ATK.0.01.00.08/475 sayılı izni ile T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, hamile kadınların periferik kanlarında bulunan fetüse ait serbest fetal DNA'ların izolasyon, ultrafiltrasyon, kantifikasyon ve amplifikasyon basamakları için çeşitli ticari kitler kullanıldı. Miktar tayini aşamasında Real Time PCR tekniğinden yararlanıldı. PCR ürünlerinin tiplendirilmesinde kapiller elektroforez yöntemi kullanıldı. Elde edilen Y-STR profil sonuçları muhtemel babalarınkiler ile karşılaştırıldı.

Bu çalışmada 16. haftadan itibaren fetüse ait serbest fetal DNA'ların izolasyon ile erkek fetüslerde babalık tayini yapılabileceği gösterildi.

Çalışma ile maternal kandan serbest fetal DNA analizi yöntemiyle doğum öncesi babalık tayininin kullanılabilirliği belirlendi. Türkiye'de ilk kez uygulanan bu yöntemin adli sürecin hızlandırılmasına da katkıda bulunabileceği görüldü. Anne kanından fetüse ait DNA eldesi ile gerçekleştirilen testin rutinde uygulanabilirliği bu çalışma ile gösterildi.

SUMMARY

Evaluation of the polymorphic characteristics of the DNA in accordance to determine the family relations, is an important area of the forensic DNA analyses. Sexual assaults resulting pregnancy required prenatal paternity determination.

Today this determination can be made by invasive techniques like amniocentesis and CVS. Owing the maternal and fetal risks, these techniques are rarely used by judicial offices.

In this study, we aimed to make the prenatal paternity determination using a non invasive technique.

We took informed consents from volunteer participants for their blood and saliva samples examined according to DNA profiling. The laboratory part of the study is performed in Republic of Turkey Ministry of Justice Forensic Medicine Institution Biology Specialization Office Laboratory under the permission number B.03.1.ATK.0.01.00.08/475 of Education and Scientific Research Commission of Republic of Turkey Ministry of Justice.

We used various commercial tests for isolation, ultrafixation, quantification and amplification of the free fetal DNAs in maternal peripheral blood circulation. We used real Time PCR technique for the amount determination. We also used capillary electrophoresis in order to classify the PCR products. And we compared the Y-STR profile results with the probable father's results.

We showed that the determination of the paternity from isolation of the circulating free fetal DNA in mother's peripheral blood is applicable from 16th week.

The study stated the utilization of the prenatal paternity determination using fetal DNA analysis. This study is known to be the first in its field in Turkey, and it's also seen that this analysis can also accelerate the judicial process., With this study it has been shown that, using this test of determining the fetal DNA from maternal blood is applicable in routine laboratory.

EK (1)

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Bu form, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi, Biyolog Duygu AYHAN tarafından hazırlanan “Maternal Sirkülasyondaki Serbest Fetal DNA ile Prenatal Dönemde Babalık Tayini” konulu tez çalışması ile ilgilidir.

Bu araştırmada, gönüllü katılımcılardan gerekli materyaller alınıp laboratuvar ortamında DNA’ları izole edilerek, tiplendirme yapılacaktır. Gönüllü katılımcılardan alınan kan ve tükürük örnekleri T.C Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi Laboratuvarlarına getirilip, incelemeleri burada yapılacaktır. Laboratuvarlarda örneklerin DNA ekstraksiyonu, çeşitli ticari kitlerle miktar tayini ve amplifikasyonu yapıp elektroforezle tiplenmesi yapılacaktır.

Gebelikle sonuçlanan adli olaylarda mümkün olduğunca erken dönemde bebeğin babasının tespitini yapabilmek hem annenin sağlığı hem de adli sürecin hızlı şekilde işleyişini sağlamak açısından büyük önem taşır. Bu da ancak annenin, bebeğin ve muhtemel babanın DNA larında bulunan genetik şifrenin ortaya çıkarılması ve bu bilgilerin karşılaştırılmasıyla mümkün olabilir.

Çalışmanın amacı, hamile kadınların kanlarında bulunan, bebeğe ait serbest DNA ları kullanarak, erken dönemde ve girişimsel olmayan bir yöntemle babalık tayini yapabilmektir.

Çalışmaya katılacak gönüllü çift sayısı 5 (beş)’dir. Araştırmanın katılımcıya herhangi bir etkisi yoktur. Gönüllü, araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahiptir. Gönüllü, istediği anda araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilmek isteyebilir. Bu halde araştırmacı katılımcının örneklerini derhal imha edecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Gönüllü katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine bir ödeme yapılmayacaktır.

Gönüllü katılımcılardan alınacak numuneler, yalnızca adı geçen çalışmada, araştırmacı tarafından ve adı geçen yöntemler için kullanılacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri gizli tutulacaktır ve hiçbir surette kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgilerin kullanımında şifre kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir neden ile ayrılması durumunda; tüm kayıtları silinecektir. Çalışmanın sonuçları katılımcılara bildirilmeyecektir.

Biyolog Sayın Duygu AYHAN tarafından İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda yapacak olduğu ““Maternal Sirkülasyondaki Serbest Fetal DNA ile Prenatal Dönemde Babalık Tayini” konulu yüksek lisans tezi için yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam araştırmacı ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim).

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir maddi sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim.)

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun araştırmacı ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde ‘‘katılımcı’’ olarak yer alma kararımı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyad :

Yaş :

Adres :

Telefon :

Tarih :

İmza :

Araştırmacının

Adı-Soyad : Biy. Duygu AYHAN

İmza :

EK (2)

**T. C.
ADALET BAKANLIğI
Adli Tıp Kurumu Başkanlığı**

Sayı : B.03.1.ATK.0.01.00.08/ 475
Konu: Bilimsel Kurul

18/10/2011

Sayın, Bio. Duygu AYHAN

“Maternal Sirkülasyondaki Serbest Fetal DNA ile Prenatal Dönem Babalık Tayini” isimli tez öneriniz 18/10/2011 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu toplantısında görüşülmüş olup; çalışmanızda kullanılacak tüm sarf malzemenin tarafınızdan karşılanması koşulu ile uygun görülmüştür.
Bilginize rica ederim.

Doç. Dr. C. Haluk İNCE
BAŞKAN

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Duygu AYHAN

Doğum Tarihi : 21/07/1985

Doğum Yeri : Samsun

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü

(2009-bugün)

Üniversite : Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü

(2004-2009)

Lise : Arı Fen Lisesi

(2000-2003)