

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GEBELERDE SOLUK HAVASINDAN ELDE EDİLEN BİYOLOJİK MATERYALDE
FETAL DNA TAYİNİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERKAM DOLAPCI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. M. ÖZGÜR ÇOĞULU

İZMİR, 2025

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GEBELERDE SOLUK HAVASINDAN ELDE EDİLEN BİYOLOJİK MATERYALDE
FETAL DNA TAYİNİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ERKAM DOLAPCI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. M. ÖZGÜR ÇOĞULU

İZMİR, 2025

ÖNSÖZ

Tez sürecim boyunca fikirleri ve değerli katkılarıyla bana mentorluk yapan, deneyimlerini ve kıymetli vaktini benimle paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. M. Özgür Çoğulu'ya;

Uzmanlık eğitimim süresince çalıştığım her bölümde mesleki bilgi birikimlerinden faydalandığım, eğitim sürecimi en verimli şekilde geçirmeme katkı sağlayan ve bana aile şefkatiyle yaklaşan tüm Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları öğretim üyelerine;

Tez çalışmamın başından itibaren fikirleri ve tecrübeleriyle katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Aslı Tetik Vardarlı'ya ve laboratuvar çalışmalarında emeği geçen tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ekibine;

Olgulara ulaşma konusunda yardımcı olan ve desteğini her daim hissettiğim, başta Doç. Dr. İsmet Hortu olmak üzere tüm Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı doktor, hemşire ve personeline;

İstatistik bölümlerinde yardımını aldığım, her konuşmamızda beni motive eden Dr. Öğr. Üyesi Su Özgür'e;

Asistanlık sürecimin başından sonuna kadar yanımda olan, yaşadığım tüm zorluklarda beni ayağa kaldıran eş kıdemlerim başta olmak üzere, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları asistanı olarak yan yana çalıştığım tüm arkadaşlarıma;

Tüm hayatım boyunca evlatları olmaktan gurur duyduğum ve duyacağım, sevgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen babam Mustafa Dolapcı'ya, annem Zeliha Dolapcı'ya ve sevgili kardeşlerime;

Hayatıma girdiği günden beri pes etmeye yaklaştığım noktalarda beni ayağa kaldıran, bana olan inancını her zaman hissettiren, sevgisiyle hayatımı güzelleştiren ve tez sürecimin başından sonuna desteğiyle yanımda olan sevgili müstakbel eşim Ayşen Halis'e

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Erkam Dolapcı

İzmir, 2025

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prenatal Tanı ve Tarama.....	3
2.1.1. İnvaziv Prenatal Tanı Testleri.....	3
2.1.2. Non-invaziv Prenatal Tarama Testleri.....	4
2.2. Non-invaziv Prenatal Tanı.....	5
2.2.1. Maternal Plazmada Fetal Hücreler	6
2.2.2. Maternal Plazmada Hücre Dışı Serbest Fetal DNA	6
2.2.2.1. Hücre Dışı Serbest Fetal DNA'nın Klinik Kullanım Alanları	8
2.2.2.2. Hücre Dışı Serbest Fetal DNA ile Cinsiyet Tayini.....	11
2.2.3. Non-İnvaziv Prenatal Test Metotları	12
2.3.Soluk Havası.....	14
2.3.1. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası (EBC)	15
2.3.1.1. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası Elde Etme	15
2.3.1.2. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası Analizi ve Klinik Kullanımı.....	18
3.GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Hasta Seçimi	20
3.2. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası (EBC) Örneklerinin Toplanması	21
3.3. DNA İzolasyonu	22
3.4. Dijital Damlacık PCR (dd-PCR) ile SRY Analizleri.....	23
3.4.1. Dijital Damlacık PCR (dd-PCR) Çalışma Prensipleri.....	24
3.4.1.1. Damlacık Oluşturma.....	24
3.4.1.2. Damlacıkların PCR Amplifikasyonu.....	25

3.4.1.3. Damlacık Okuma.....	25
3.4.1.4. Sonuç Analizi	25
3.5. İstatistiksel Analizler	27
4.BULGULAR.....	28
5.TARTIŞMA.....	35
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	42
7.KAYNAKLAR.....	43
EKLER	58
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	58
Ek 2. Olgu Rapor Formu	60
Ek 3. Gönüllü Onam Formu	61
Ek 4. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	64

ÖZET

Giriş ve Amaç: Son yıllarda, teknolojik gelişmelerin etkisiyle prenatal tarama ve tanı testlerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş; anne ile fetüs arasındaki biyolojik geçişlerin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA'nın (cffDNA) gösterilmesi, non-invaziv prenatal testlerin (NIPT) gelişmesine olanak sağlamıştır. cffDNA'nın amniyotik sıvı ve idrar gibi farklı vücut sıvılarında da tespit edilebilmesi, alternatif örnekleme yöntemlerinin araştırılmasına zemin hazırlamıştır. Yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC), başta akciğer hastalıkları olmak üzere çeşitli klinik durumlarda kullanılan non-invaziv bir biyolojik örnekleme yöntemidir. Soluk havasında DNA ve RNA gibi genetik materyallerin saptanabiliyor olması, bu yöntemin gebelikte de potansiyel bir tanı aracı olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, gebelerin EBC örneklerinde fetal DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, tek merkezli ve prospektif bir tasarımla gerçekleştirilmiş olup, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda takip edilen ve ultrasonografide erkek fetüs taşıdığı saptanan 30 gebe değerlendirilmiştir. Etik kurul onayının ardından, katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınarak, Amerikan Toraks Derneği kılavuzlarına uygun şekilde yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC) örnekleri toplanmıştır. Elde edilen örneklerden DNA izolasyonu yapılmış; kalite ve miktar kontrolünün ardından, fetal DNA varlığının ve erkek cinsiyetin belirlenmesine yönelik olarak dijital damlacık PCR (dd-PCR) yöntemiyle SRY dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Erkek cinsiyet, SRY geninin dd-PCR ile saptanmasıyla doğrulanmıştır. Sonuçlar, tanımlayıcı istatistiklerle ve %95 güven aralığında değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen olguların ortalama yaşı $30,1 \pm 6,1$ yıl olarak belirlenmiştir. Örneklemenin yapıldığı esnada gestasyonel yaşlar 33 hafta ile 40 hafta arasında değişmekteydi. Olguların gebelik haftası ortalama 37 hafta olarak saptanmıştır. Örnekleme alımı ile eş zamanlı gerçekleştirilen ultrasonografilerde ortalama fetüs ağırlığı 3085 gram ölçülmüştür.

Elde edilen 30 EBC örneğine DNA izolasyonu uygulanmıştır. Elde edilen örneklerin ortalama DNA konsantrasyonu $17 \text{ ng}/\mu\text{l}$ olarak sonuçlanmıştır. Analiz edilen örneklerde DNA konsantrasyonu en düşük $3,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$, en yüksek ise $34,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ olarak belirlenmiştir. İzolasyonu

sağlanan tüm DNA örneklerinde, SRY dizilerinin varlığı dijital damlacık PCR (dd-PCR) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda toplam örneklerin 11'inde (11/30; %36,6) SRY dizisi pozitif olarak sonuçlanmıştır. Örnek alınarak çalışmaya dahil edilen tüm gebelerin bebeklerinin (30/30), doğum sonrası muayenede fenotipik olarak erkek cinsiyette olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu çalışma, EBC örneklerinde fetal DNA varlığını ortaya koyarak noninvaziv prenatal tanıda yeni bir yaklaşımın mümkün olabileceğini göstermiştir. SRY geninin %36,6 oranında tespit edilmesi, yöntemin uygulanabilirliğini desteklemektedir. Ancak, standardizasyon eksiklikleri ve teknik sınırlılıklar göz önüne alındığında, fetal genomun saptanmasında daha hassas yöntemlerin geliştirilmesine ve ileri düzey çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: prenatal tanı; cffDNA; yoğunlaştırılmış soluk havası; dd-PCR; SRY

ABSTRACT

Introduction and Objective: In recent years, prenatal screening and diagnostic tests have advanced rapidly with the impact of technological advances, and the assessment of biological transitions between mother and fetus has gained importance. The demonstration of cell free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma has led to the development of non-invasive prenatal tests (NIPT). The detection of cffDNA in other body fluids such as amniotic fluid and urine has led to alternative sampling methods. Exhaled breath condensate (EBC) is a non-invasive biological sampling method used in various clinical situations, especially in pulmonary diseases. The ability to detect genetic materials such as DNA and RNA in breath air suggests that this method can be used as a potential diagnostic tool in pregnancy. The aim of this study was to investigate the presence of fetal DNA in EBC samples of pregnant women.

Materials and Methods: This study, single-center, prospective was conducted in 30 pregnant women who were followed up in Ege University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology and were found to be carrying a male fetus on ultrasonography. After ethics committee approval, informed consent was obtained and EBC samples were collected from the participants in accordance with the American Thoracic Society guidelines. DNA was isolated from the samples, and after quality and quantity control, SRY sequence analysis was performed by digital droplet PCR (dd-PCR) to determine the presence of fetal DNA and male gender. Male sex was confirmed by detection of the SRY gene by dd-PCR. The results were evaluated with descriptive statistics and 95% confidence intervals.

Results: The mean age of the patients included in the study was 30.1 ± 6.1 years. Gestational ages ranged between 33 weeks and 40 weeks at the time of sampling. The mean gestational age was 37 weeks. The average fetal weight was 3085 grams in ultrasonography performed simultaneously with sampling.

DNA isolation was performed on 30 EBC samples obtained. The average DNA concentration of the samples obtained was 17 ng/ μ l. The lowest DNA concentration obtained from the samples was 3.3 ng/ μ l and the highest DNA concentration was 34.1 ng/ μ l. The presence of SRY sequences in all isolated DNA samples was evaluated using the dd-PCR method. As a result of the study, positive results were observed in 11 of the total samples (11/30;

36.6%). The babies (30/30) of all pregnant women included in the study were phenotypically male at postnatal examination.

Conclusion: This study demonstrated the feasibility of a new approach to noninvasive prenatal diagnosis by detecting fetal DNA in EBC samples. The detection of the SRY gene in 36.6% of the samples supports the applicability of the method. However, considering the lack of standardization and technical limitations, further studies and development of more sensitive methods are needed.

Keywords: prenatal diagnosis; cffDNA; exhaled breath condensate; dd-PCR; SRY



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Prenatal Tanı ve Tarama Testleri	4
Tablo 2. NIPT İçin Kullanılan Genetik Yöntemlerin Sınıflandırılması	13
Tablo 3. PCR Karışımı.....	25
Tablo 4. Katılımcıların Tanımlayıcı Özellikleri	28
Tablo 5. Olguların Klinik Verileri	29
Tablo 6. EBC Örneklerinden Elde Edilen DNA Konsantrasyonları ve dd-PCR ile SRY Sonuçları.....	31
Tablo 7. SRY pozitif ve SRY negatif görülen olguların çeşitli parametrelere göre karşılaştırılması.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hücre Dışı Serbest Fetal DNA'nın Maternal Dolaşıma Katılması	8
Şekil 2. İstenilen Kromozomda Fetal DNA'nın Aşırı Temsiliyle Anöplöidi Tayini	10
Şekil 3. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası Elde Etme Yöntemine Örnek Diyagram	16
Şekil 4. EBC Toplama Cihazları	17
Şekil 5. EBC Örneklerinin Toplanması	21
Şekil 6. EBC Toplama Video Örneği (QR Kod).....	22
Şekil 7. Dijital Damlacık PCR (dd-PCR) Çalışma Basamakları	26
Şekil 8. Olgu 1-10'a ait dd-PCR Analizlerinin Grafikleri.....	32
Şekil 9. Olgu 11-20'ye ait dd-PCR Analizlerinin Grafikleri.....	32
Şekil 10. Olgu 21-30'a ait dd-PCR Analizlerinin Grafikleri.....	33

KISALTMALAR LİSTESİ

μl	: Mikrolitre
β-hCG	: İnsan Koryonik Gonodotropin
AFP	: Alfa-fetoprotein
cfDNA	: Hücre dışı serbest DNA
cffDNA	: Hücre dışı serbest fetal DNA
CVS	: Koryon villüs örnekleme “Chorionic villus sampling”
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dd-PCR	: Dijital damlacık PCR
EBC	: Yoğunlaştırılmış Soluk Havası “Exhaled breath condensate”
MPS	: Masif Paralel Dizileme
ml	: Mililitre
miRNA	: mikro RNA
NGS	: Yeni nesil dizileme “Next Generation Sequencing”
NIPT	: Non-invaziv prenatal test
NM	: Nanometre
Rh	: Rhesus
RPM	: Dakika Devir Sayısı
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SRY	: Sex-determining region Y
VKİ	: Vücut kitle indeksi
VOC	: Uçucu organik bileşikler “Volatile organic compounds”

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tarama ve erken tanı testleri alanındaki çalışmalar, teknolojik gelişmelerin de katkısıyla yoğunlaşmış ve günümüz tıbbında önemli bir yer edinmiştir. Hastalıkların erken tanınması ve bu sayede sağlıklı bir toplumun oluşturulması, ana hedeflerden biri olmuştur. Gebelik sürecinde de bu amaçla prenatal tarama ve tanı testlerine sıklıkla başvurulmaktadır.

Prenatal tarama ve tanı testleri doğumdan önce bebek hakkında bilgi elde edilmesini sağlayan çeşitli yöntemleri içerir. 1950'lerde ilk kez amniyosentezle fetal cinsiyet tayini yapılmıştır (1). 1970'lerde anne kanında alfa-fetoprotein'in (AFP) düşük seviyelerde saptanması, fetal kromozomal anomalilerle ilişkilendirilmiştir (2). Bu çalışmalarla birlikte prenatal tanı ve tarama testleri alanında hızla yeni gelişmeler ortaya koyulmuştur. Amniyosentez ve koryon villüs örnekleme gibi invaziv bazı yöntemler zaman içinde kullanıma girmiştir (3). AFP, insan koryonik gonadotropin (β -hCG), ankonjuge östriol (uE3), gebelikle ilişkili plazma protein A (PAPP-A) ve inhibin A gibi biyobelirteçler ile prenatal tarama yöntemleri geliştirilmiştir (4).

Gebelikte anne ile fetüs arasında iki yönlü bir geçiş olduğu bilinmektedir. 1969 yılında Walknowska ve ark.ları tarafından, erkek fetüs taşıyan gebe kadınların plazmasında 46,XY karyotipine sahip fetal lenfositlerin varlığı gösterilmiştir (5). 1997 yılında Lo ve ark.ları tarafından, ilk kez maternal serum ve plazmada hücre dışı serbest fetal DNA (cffDNA) bulunduğu gösterilmiştir (6). Hücre dışı serbest fetal DNA temel alınarak yapılan çalışmalar giderek yaygınlaşan non-invaziv prenatal test (NIPT)'in geliştirilmesine olanak sağlamıştır (7).

Soluk havasının vücudun sağlığı ve fizyolojisi konusunda bilgi verdiği, antik tıp uygulamalarından bu yana bilinmektedir. Diyabet, böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda nefes kokusundaki değişiklikler fark edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, ilk kez 1980'lerde soluk havası ile ilgili çalışmalar başlamıştır (8). Soluk havasında azot, oksijen, karbondioksit (CO₂), nitrik oksit (NO) ve su buharı dışında pek çok organik ve inorganik uçucu bileşiğin bulunduğu bilinmektedir. Bu zamana kadar ekshale soluk havasında tespit edilen maddeler uçucu organik bileşik (VOC) türleri, hidrokarbonlar, alkoller, aldehytler, ketonlar, esterler, karboksilik asitler, sitokinler, DNA'lar, RNA'lar, proteinlerdir (9).

Yoğunlaştırılmış soluk havası (Exhaled Breath Condensate, EBC) verilen nefesin soğuk bir yüzeyle temas ettirilerek yoğuşması ve sıvı formda toplanmasıyla elde edilir (10). İçeriğinin büyük bir kısmını su buharı oluşturmaktadır. Solunum sisteminin bir yansıması olarak kabul edilen EBC, öncelikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), astım ve akciğer kanseri

gibi hastalıklarda kullanım alanı bulmuştur (11,12). Ayrıca diyabet, böbrek hastalıkları ve kalp yetmezliği gibi birçok farklı alanda da soluk havası çalışmaları mevcuttur (13–15).

Hücre dışı serbest fetal DNA (cffDNA) temelli çalışmalar çoğunlukla maternal plazma üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak amniyotik sıvı, maternal serebrospinal sıvı ve idrar gibi çeşitli vücut sıvılarında da cffDNA bulunduğuna yönelik yayınlar mevcuttur (16–18). Yoğunlaştırılmış soluk havasında DNA, RNA ve diğer nükleik asitlerin gösterilmesi, EBC'nin sadece akciğer hastalıklarıyla sınırlı kalmayan potansiyelini ortaya koymuştur. Bu bilgiler ve maternal plazma dışındaki vücut sıvılarında cffDNA tespit edilebilmesi, soluk havasında da cffDNA bulunabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Bu çalışma ile gebelerin yoğunlaştırılmış soluk havası örneklerinde fetal DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prenatal Tanı ve Tarama

Doğum öncesi tarama ve tanı yöntemleri, modern sağlık hizmetlerinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu testler, anne karnında gelişimini sürdüren fetüs hakkında değerli bilgiler sağlaması nedeniyle çok önemlidir. EUROCAT (Avrupa Konjenital Anomalilerin Gözetimi) tarafından yapılan 22 ülkede yürütülen ve yılda 1,5 milyon doğumu kapsayan bir incelemede, majör konjenital anomali oranı %2,39 olarak bildirilmiştir (19). Fetüslerde genetik bozukluklar ve konjenital anomaliler gibi, doğum sonrası mortalite ve morbidite riskini artırabilecek durumların erken dönemde saptanması; anne-baba adaylarına daha kapsamlı bir danışmanlık verilmesini sağlar. Ayrıca doğum sonrası erken değerlendirme ve bu sayede erken müdahale imkânlarının sağlanmasını mümkün kılar.

Prenatal test yöntemleri iki ana grupta incelenir; non-invaziv prenatal tarama testleri ve invaziv prenatal tanı testleri (20).

- İnvaziv testler; amniyosentez, koryon villüs örnekleme (CVS) ve kordosentez gibi yöntemlerden oluşur.
- Non-invaziv testler ise maternal plazmada biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi, fetüsün radyolojik görüntüleme teknikleri ile incelenmesi, maternal kan örneklerinde fetal DNA analizi gibi çok çeşitli yöntemleri içerir.

2.1.1. İnvaziv Prenatal Tanı Testleri

Amniyosentez, kordosentez ve koryon villus örnekleme (CVS) gibi invaziv prenatal tanı yöntemleri, fetüslerdeki kromozomal anomalileri ve genetik bozuklukları tespit etmek için uzun süredir altın standart olarak kabul edilmektedir.

Amniyosentez, annenin karın bölgesinden ince bir iğne yardımıyla amniyotik sıvı örneği alınarak fetüsün genetik yapısının analiz edilmesini sağlar. İlk olarak 1950'lerde fetal cinsiyet tayini amacıyla kullanılmış ve sonraki yıllarda kullanım alanları genişlemiştir (1). Genellikle gebeliğin 15-20. haftaları arasında uygulanır ve kromozomal hastalıkları (Down sendromu, Trizomi 18, vb.) tespit etmek için kullanılır (21).

Koryon villüs örnekleme (CVS) ise gebeliğin daha erken dönemlerinde, 10-13. haftalar arasında yapılan bir testtir. Bu yöntemde, annenin karın bölgesinden veya vajinal

yoldan plasentadan koryon villus dokusu örneği alınır (22). İnvaziv yöntemlerin en önemli dezavantajı düşük riskini artırmalarıdır. CVS, amniyosenteze kıyasla daha erken dönemde uygulanabilmesi açısından avantaj sağlasa da düşük riski açısından daha dikkatli değerlendirme gerektirir (23).

Tablo 1. Prenatal Tanı ve Tarama Testleri (20)

Non-invaziv Testler	İnvaziv Testler
Fetal Görüntüleme <ul style="list-style-type: none">• Fetal Ultrasonografi• Fetal Ekokardiyografi• Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)• Röntgenogram	Fetüs Görüntüleme <ul style="list-style-type: none">• Fetoskopi• Embriyoskopi
Biyokimyasal Testler <ul style="list-style-type: none">• İkili Tarama Testi<ul style="list-style-type: none">◦ PAP-A, β-hCG ve NT ölçümü• Üçlü Tarama Testi<ul style="list-style-type: none">◦ AFP, β-hCG, Östriol Ölçümü• Dörtlü Tarama Testi<ul style="list-style-type: none">◦ AFP, β-hCG, Östriol, inhibin A Ölçümü	Fetal Doku Örnekleriyle Genetik Testler <ul style="list-style-type: none">• Amniyosentez• Koryon Villüs Doku İncelemesi• Kordosentez• Kas, karaciğer, böbrek gibi organ biyopsileri
Maternal Kanda Fetal Hücre ve DNA Analizi	

PAPP-A: Gebelik İlişkili Plazma Protein A, **β -hCG:** İnsan Koryonik Gonodotropin, **NT:** Ense kalınlığı, **AFP:** Alfa fetoprotein

2.1.2. Non-invaziv Prenatal Tarama Testleri

1970'li yıllarda, anne kanında düşük alfa-fetoprotein (AFP) seviyelerinin fetal kromozomal anomalilerle ilişkilendirilmesi, non-invaziv prenatal tarama testleri alanında gelişmeleri başlatan kıvılcım olmuştur (2). Çalışmaların artmasıyla birlikte biyokimyasal belirteçlerin tarama testleri olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji

Derneği (American College of Obstetricians and Gynecologists- ACOG), tüm gebelere gebeliğin 20. haftasından önce tarama testlerinin yapılması ve gereklilik halinde tanı testlerinin uygulanmasını önermektedir (24).

İkili tarama testi, gebeliğin 11–14. haftaları arasında gerçekleştirilir ve gebelikle ilişkili plazma proteini-A (PAPP-A) ile insan koryonik gonadotropini (β -hCG) düzeylerinin ölçümünün yanı sıra ultrasonografi ile ense kalınlığı (NT) değerlendirilir. Üçlü tarama testi, 15–20. haftalar arasında yapılır ve alfa-fetoprotein (AFP), β -hCG ve östriol seviyeleri ile değerlendirilir. Dörtlü tarama testi ise üçlü testin kapsamını genişleterek inhibin-A biyobelirtecini ekler ve aynı haftalar arasında yapılır. Bu testler gebeliğin farklı dönemlerinde Down sendromu, Trizomi 18 ve nöral tüp defekti gibi genetik bozuklukların riskini değerlendirmeye olanak tanır (25).

Görüntüleme teknikleri, prenatal taramanın önemli bir bileşenidir. Özellikle ultrasonografi, fetüsün gelişimini izlemek, doğumsal anomalileri tespit etmek ve gebelik sürecini yönetmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Ultrasonografinin en yaygın kullanım alanlarından biri fetal anomalilerin (kardiyak anomaliler, beyin anomalileri) saptanmasıdır (26). Gebeliğin ikinci trimesterinde kullanılan fetal ense kalınlığı (NT) ölçümü, fetal anöploidilerin taramasında kullanılmaktadır. Ayrıca 3D ve 4D ultrasonografi yöntemleriyle fetüsün ayrıntılı anatomik değerlendirmesi yapılabilir. Fetal ekokardiyografi ile doğumsal kalp hastalıkları açısından tarama yapılabilir (27). Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ise özellikle beyin gelişimi ve karmaşık yapısal anomalilerin değerlendirilmesinde etkili bir yöntemdir (28).

Genel uygulama, invaziv olmayan prenatal testler ile tarama yapıldıktan sonra invaziv testler ile prenatal tanıya ulaşma şeklinde gerçekleşmektedir. İnvaziv testler yüksek doğruluk oranına sahiptir; fakat düşük, erken doğum gibi komplikasyonlar nedeniyle bu testlerin seçilmiş vakalarda kullanımı uygun görülmektedir. Bu sebeple, non-invaziv bir tanı yöntemi olan maternal kanda fetal DNA analizi temelli testler önem kazanmıştır.

2.2. Non-invaziv Prenatal Tanı

İnvaziv testlerin maliyet ve komplikasyon gibi dezavantajları, farklı prenatal tanı yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu doğrultuda, maternal kanda fetal hücreler ve serbest fetal DNA'ya dayalı yeni teknikler geliştirilmiştir (29).

2.2.1. Maternal Plazmada Fetal Hücreler

1893 yılında patolog Schmorl, eklampsi nedeniyle ölen gebelerin akciğerlerinde fetüs kaynaklı sinsityal trofoblastları göstermiştir (30). Bu, maternal dolaşımda fetal hücrelerin varlığını gösteren ilk çalışma olmuş; ancak uzun bir süre bu alanda yeni bir gelişme kaydedilememiştir. 1959 yılında Douglas ve ark.ları, uterin ven ile pulmoner arter arasındaki dolaşımda trofoblastları göstermiştir (31). 1969'da ise Walknowska ve ark.ları, erkek fetüs taşıyan gebe kadınların plazmasında 46, XY karyotipine sahip fetal lenfositlerin varlığını ortaya koymuştur (5).

Maternal dolaşımdaki fetal hücreler, genetik tanı için büyük potansiyel taşıyıcıdır. Bu hücrelerin çekirdeklerinde veya sitoplazmalarında yer alan genetik bilgi, özellikle anne veya babanın taşıdığı fetal genetik kusurları belirlemede faydalıdır. Çünkü fetal hücreler, ebeveynlerin hücreleriyle kolayca karıştırılmaz. Ancak, fetal hücrelerin dolaşımdaki sıklığı oldukça düşüktür. Bu nedenle, fetal hücrelerin etkili bir şekilde izole edilmesi, araştırma ve geliştirme gerektiren bir konu olmuştur (32).

Maternal kanda; lenfositler, trofoblastlar, eritroblastlar ve hematopoetik kök hücreler gibi çeşitli fetal hücre tipleri bulunmaktadır (33). Her bir hücre tipinin kendine özgü özellikleri olduğundan, bunların ayrıştırılması farklı zorluklar doğurabilir ve analizlerin doğruluğunu etkileyebilir. 2000'li yılların başından itibaren bu alandaki çalışmalar artmış; mikroakışkan hücre ayırma gibi yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Ancak hâlâ pratik ve yaygın şekilde kullanılacak ayrıştırma yöntemlerinin eksikliği, fetal hücre temelli prenatal tanının geri planda kalmasına neden olmuştur (32,34).

2.2.2. Maternal Plazmada Hücre Dışı Serbest Fetal DNA

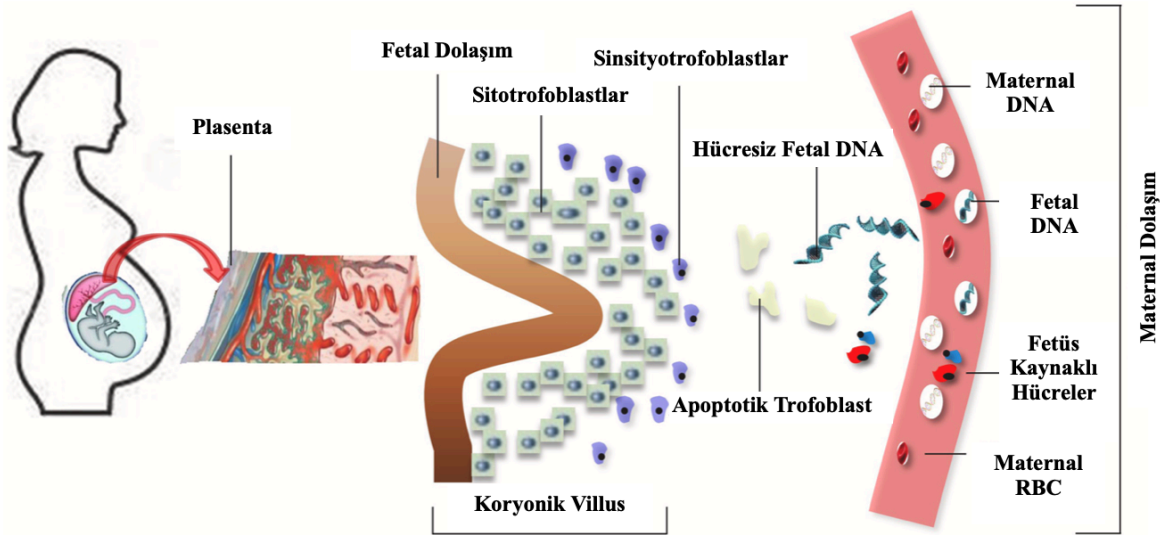
Kanda hücre dışı nükleik asitlerin varlığı ilk kez 1948 yılında bildirilmiştir (35). Bu keşfin ardından, hücre dışı serbest DNA'ya (cfDNA) dayalı testlerin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. 1970'lere gelindiğinde, kanser hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla cfDNA miktarlarında belirgin artış olduğu saptanmıştır. Özellikle metastatik olgularda cfDNA konsantrasyonunun anlamlı şekilde arttığı; tedavi sonrası ise bu seviyelerde belirgin düşüş yaşandığı görülmüştür (36,37).

Hücre dışı serbest DNA'nın kaynağı henüz tam olarak netlik kazanmamış olsa da iki ana görüş öne çıkmaktadır: İlki, hücre yıkımı sonucunda oluştuğu; ikincisi ise canlı hücrelerin aktif olarak DNA salgıladığı yönündedir. cfDNA salınımı; hücre nekrozu, apoptoz, piropitozis,

travma ve aktif salınım gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşebilir. Apoptozda DNA genellikle 160-180 baz çifti (bp) uzunluğunda küçük parçalara ayrılırken; piropitoziste farklı bir hücre ölüm mekanizması söz konusudur. cfDNA, eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimcikler gibi veziküller içerisinde de taşınabilir. Kanseri, sepsis, steril inflamasyon, yaş ve fiziksel aktivite gibi faktörler cfDNA seviyelerini etkileyebilir (38,39).

Kanser hastalarında cfDNA varlığının gösterilmesi, bu konudaki araştırmaların farklı alanlara yayılmasına neden olmuştur. 1997 yılına gelindiğinde Lo ve ark.ları buradan yola çıkarak gebelikteki benzer durumu inceleyen çalışmalarını yayınladı. Erkek fetüs taşıyan gebelerin plazma ve serum örneklerinde fetüs kaynaklı Y kromozomuna ait dizileri saptayarak, hücre dışı serbest fetal DNA'yı (cffDNA) tanımlamışlardır (6). Bu çalışmayı izleyen yıl, cffDNA'nın gebeliğin 7. haftası gibi erken bir dönemde dahi tespit edilebileceği; gebelik ilerledikçe maternal plazmadaki fetal DNA oranının arttığı rapor edilmiştir (erken dönemde %3,4; geç dönemde %6,2) (40). Bu bulgular, fetal DNA'nın maternal plazma ve serumda kolaylıkla tespit edilebileceğini ve non-invaziv prenatal tanı alanında değerli bir biyobelirteç olduğunu ortaya koymuştur.

Fetal DNA'nın kaynağı hâlâ tam olarak netleşmemiş olsa da mevcut fizyolojik ve klinik bilgiler, dolaşımdaki nükleik asitlerin çoğunun plasentadan türediğini; bir kısmının ise fetal hematopoetik sistemden geldiğini göstermektedir (41). Plasentanın fetüs kaynaklı bölümü olan trofoblastlar, apoptoz ve aponekrozis sonucu maternal dolaşıma fetal DNA salmaktadır. Ayrıca, amniyon sıvısında maternal plazmaya göre yaklaşık 200 kat daha fazla fetal DNA bulunması nedeniyle, buradan difüzyon yoluyla geçişin de fetal DNA kaynağı olabileceği öne sürülmüştür (42).



Şekil 1. Hücre Dışı Serbest Fetal DNA'nın Maternal Dolaşıma Katılması (43)

Gebelik haftası ilerledikçe, cffDNA konsantrasyonlarının da arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, fetal DNA oranının gebeliğin 10 ila 21. haftaları arasında her hafta yaklaşık %0,1; 21. haftadan sonra ise haftalık yaklaşık %1 oranında arttığı bildirilmiştir (44). Gebeliğin sonlanmasının ardından ise cffDNA'nın maternal dolaşımdan hızlı bir şekilde temizlendiği görülmüştür. Doğumdan sonraki ikinci saatte maternal plazmada fetal DNA'nın ölçülemez düzeylere indiği gösterilmiş; bu bulgular doğrultusunda cffDNA'nın yarı ömrünün yaklaşık 16,3 dakika olduğu belirlenmiştir (45). Bu gelişmeler, cffDNA'nın fetüse ait genetik bilgileri gebeliğin erken döneminde saptamaya olanak sağlayan, değişimleri dinamik olarak yansıtan ve invaziv tanı yöntemlerine duyulan ihtiyacı azaltabilecek yenilikçi bir prenatal tanı aracı olma potansiyelini ortaya koymuştur.

2.2.2.1. Hücre Dışı Serbest Fetal DNA'nın Klinik Kullanım Alanları

Hücre dışı serbest fetal DNA (cffDNA) alanındaki çalışmaların hız kazanmasıyla birlikte non-invaziv prenatal testler (NIPT) geliştirilmiştir. Bu testlerin ilk kullanım alanı fetal cinsiyet tayini olmuş; X'e bağlı kalıtılan hastalıklarda dişi fetüslerin hastalıktan etkilenmeyeceği göz önüne alındığında, invaziv testlere duyulan ihtiyaç yaklaşık %50 oranında azalmıştır (46). Ultrasonografi ile cinsiyet tayini yüksek doğruluk oranına sahip olsa da ancak 11. haftadan itibaren yapılabilirken, NIPT ile 7. haftadan itibaren fetal cinsiyet belirlenebilir. Ayrıca konjenital adrenal hiperplazi riski taşıyan gebeliklerde, dişi fetüslerde dış genital

organların virilizasyonunu önlemek amacıyla erken dönemde deksametazon tedavisi uygulanabilir (47,48).

Yenidoğanın alloimmün hemolitik hastalığı en sık Rh antijenine karşı gelişmektedir. Fetal Rh(D) genotipinin invaziv olmayan yöntemlerle tayini, özellikle Rh(D) duyarlı kadınlarda önemlidir. Eğer fetüs Rh(D) negatifse, ek tanı testlerine veya anti-D immün globulin tedavisine gerek kalmaz. Böylece gereksiz kan ürünü kullanımını önlenmiş olur (49,50).

Preeklampsi, yalnızca gebelere özgü multisistemik bir hastalık olup, gelişmiş ülkelerde maternal ve fetal ölüm ile morbiditenin en önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (51). Çeşitli çalışmalar, semptomatik preeklampsi gelişen kadınlarda fetal DNA seviyelerinin beş kat arttığını göstermiştir. Ayrıca bu seviyelerin preeklampsi gelişmesi muhtemel gebelerde de yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu durum, cffDNA'nın preeklampsi gelişimi için prediktif bir belirteç olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır (52,53).

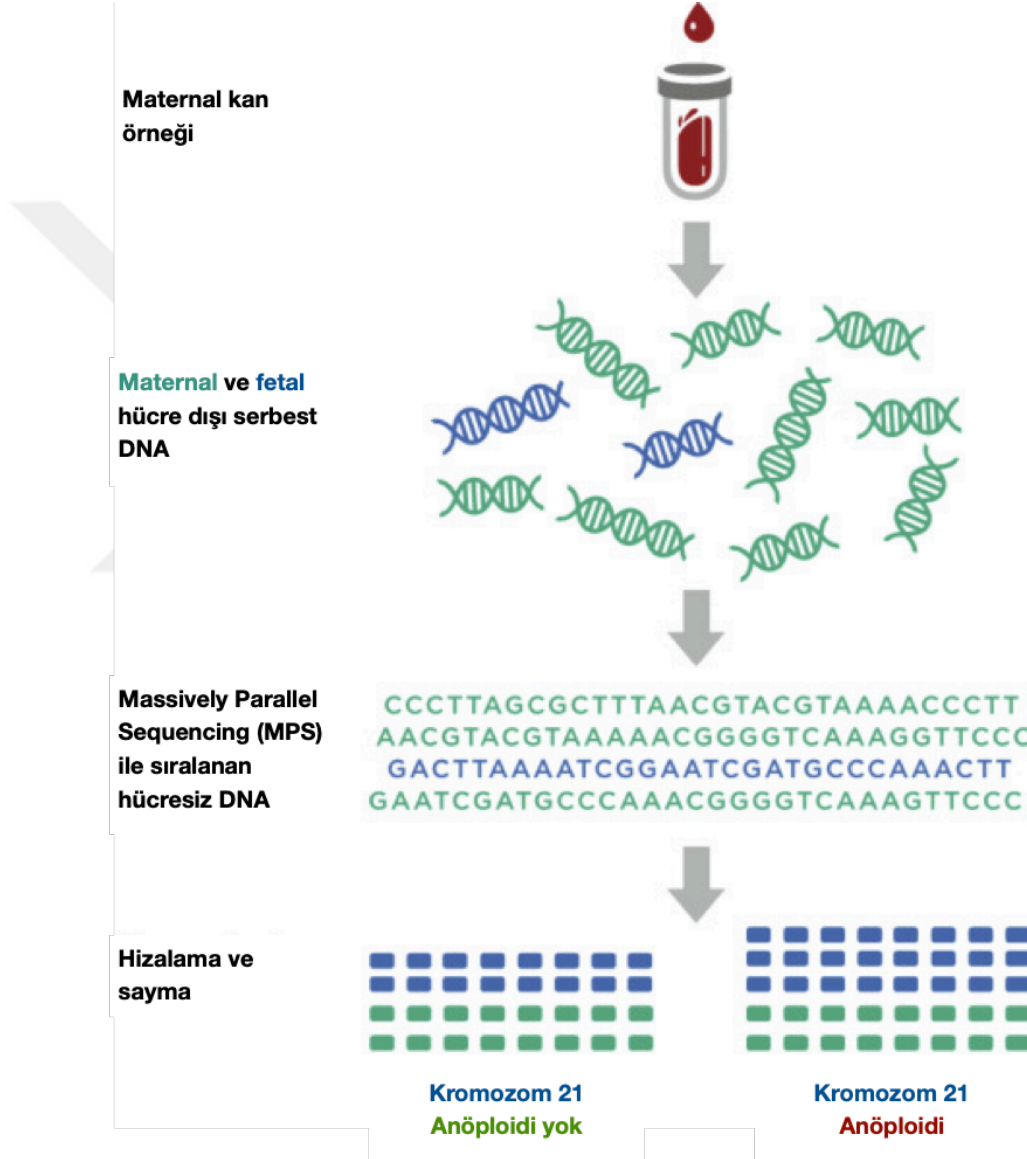
Maternal serumda cffDNA seviyelerindeki artışın, erken doğumun bir belirtisi olabileceği; ayrıca plasenta previa, hiperemesis gravidarum gibi durumlarda da bu artışın gözlenebileceği bildirilmiştir (41).

Monogenik hastalıklarda, özellikle de novo mutasyonlarla ortaya çıkan ya da otozomal dominant kalıtılan hastalıklarda NIPT kullanımı daha kolaydır. Kısa uzuvlu bir fetüste maternal plazmadan akondroplazi saptandığı; bir başka vakada ise cffDNA ile trinükleotid tekrarları içeren myotonik distrofi varlığının gösterildiği bildirilmiştir (54,55). Ayrıca kistik fibrozis, beta talasemi gibi hastalıklar için de maternal plazmada cffDNA analiziyle tanı konulabildiği raporlanmıştır (56,57).

Trizomi 21 (Down sendromu) olguları, yüksek morbidite oranı ve yaygınlığı nedeniyle prenatal tanıda önemli yer tutar. Trizomi 21'li fetüslerde maternal kanda fetal DNA düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (58). Tek değişkenli analizlerde bu testin tespit oranı %21 olarak belirlenmiştir. Ancak dördü tarama testi (AFP, östriol, β -hCG, inhibin A) ile fetal DNA analizinin birlikte kullanılması, Down sendromu tespit oranını %81'den %86'ya çıkarmıştır (59). Ayrıca trizomi 13 ve trizomi 18 ile ilgili de benzer çalışmalar yapılmış fakat sonuçlar trizomi 21'e kıyasla daha düşük kalmıştır.

Bu alanda çalışmalar devam etmiş ve 2008 yılına gelindiğinde fetal anöploidilerin non-invaziv tanısına yönelik yeni yayımlar bildirilmiştir (60). 2011 yılı itibarıyla non-invaziv prenatal test klinik kullanıma girmiş ve büyük çalışma gruplarını içeren yayınlar ortaya konmuştur (61). Fetal anöploidi tespitinde karşılaşılan temel zorluk, maternal plazmada hücre dışı serbest DNA'nın büyük çoğunluğunun anne kaynaklı olmasıdır. Bu nedenle anöploidi

tanısı, ilgili kromozomun hafif aşırı temsilinin hassas şekilde belirlenmesine dayanır (48) (Şekil 2). Bu alanda yapılan bir meta-analiz, tekil gebeliklerde trizomi 21'li fetüslerin %99'undan fazlasının, trizomi 18'lilerin %98'inin ve trizomi 13'lülerin %99'unun NIPT ile tespit edilebildiğini göstermiştir (62).



Şekil 2. İstenilen Kromozomda Fetal DNA'nın Aşırı Temsiliyle Anöploidi Tayini (48)

Konvensiyonel prenatal invaziv yöntemlerle NIPT arasında yüksek düzeyde uyum bulunmasına rağmen, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar görülebilmektedir. Bu hataların en sık nedeni sınırlı plasental mozaisizmdir (63). Ayrıca maternal plazmada analiz edilen hücre dışı serbest DNA'nın büyük bir kısmının anne kaynaklı olması da uyumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Bununla birlikte, maternal malignitelerin NIPT sonuçlarını etkileyebileceği bildirilmiş; bu durum, cfDNA'nın kanser taramasında da potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği düşüncesini doğurmuştur (64). Maternal obezite ve erken gebelik haftasıyla ilişkili olarak fetal DNA konsantrasyonunun düşük olması da yanlış negatif sonuçlara neden olabilecek diğer faktörlerdir (65,66).

Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Derneği (ACOG) ile Maternal-Fetal Tıp Derneği (SMFM), Ekim 2020'de yayımladıkları Uygulama Bülteni No. 226'da, hücre dışı serbest DNA temelli NIPT'in, yaygın fetal anöploidiler (trizomi 21, 13 ve 18) açısından en hassas ve en spesifik tarama testi olduğunu belirtmiştir. Ayrıca bu testin gebeliğin 9–10. haftasından itibaren herhangi bir zamanda yapılabileceği ve tüm gebelere —anne yaşı veya başlangıç riski fark etmeksizin— erken gebelik döneminde anlatılarak önerilmesi gerektiği vurgulanmıştır (67).

2.2.2.2. Hücre Dışı Serbest Fetal DNA ile Cinsiyet Tayini

Fetal cinsiyetin invaziv işlemler olmadan doğum öncesinde belirlenmesi, mevcut altın standart olan invaziv prenatal testlere önemli bir alternatif sunmakta ve belirsiz genital yapıların bulunduğu durumlar, X'e bağlı kalıtılan hastalıklar ile konjenital adrenal hiperplazi gibi tek gen bozukluklarında önemli klinik avantajlar sağlamaktadır (46). Koryon villus örnekleme ve amniyosentez gibi invaziv yöntemler, düşük riski taşıdığından, bu riskleri ortadan kaldıracabilecek güvenilir non-invaziv yaklaşımlar tercih sebebi hâline gelmiştir.

Fetal cinsiyet tayini, ultrasonografi ile 11. gebelik haftasından itibaren yapılabilir de bu yöntemin doğruluğu gebelik haftasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. 13. haftadan itibaren ise ultrasonografik değerlendirmelerde yüksek doğruluk oranları bildirilmiştir (68). Ancak, hücre dışı serbest fetal DNA'nın maternal plazmada gösterilmesiyle birlikte fetal cinsiyetin çok daha erken dönemde, güvenilir şekilde belirlenmesi mümkün hâle gelmiştir.

Y kromozomu, insan genomundaki 46 kromozomdan biri olup yalnızca erkeklerde bulunur ve erkek cinsiyetinin belirlenmesinde temel rol oynar. Dişi bireylerde bulunmayan bu kromozom, cinsiyete özgü bazı gen dizilerini içerir. Bunlar arasında tek kopyalı SRY (Sex Determining Region Y), DAZ (Deleted in Azoospermia) ailesi, çok kopyalı DYS14, AZF ve

ZFY gen dizileri yer alır (69). Bu diziler, gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), dijital damlacık PCR (dd-PCR) ve masif paralel dizileme (MPS) gibi moleküler yöntemlerle analiz edilebilir. Elde edilen sonuçlarda Y kromozomu dizilerinin pozitif tespiti, erkek fetüsü; negatif sonuç ise dişi fetüsü işaret eder. Bu yöntemle fetal cinsiyetin yüksek duyarlılık ve özgüllükle belirlenebileceği pek çok çalışmayla gösterilmiştir (70,71). Ayrıca SRY, DYS14 ve DAZ gen dizilerinin kombinasyonunun kullanıldığı bir çalışmada, fetal cinsiyetin %100 duyarlılık, %99,5 özgüllükle saptanabildiği bildirilmiştir (72).

2.2.3. Non-İnvaziv Prenatal Test Metotları

Non-invaziv prenatal testlerin gelişiminde kullanılan dizileme teknolojilerinin evrimi önemli bir rol oynamıştır. Geleneksel yöntemler arasında yer alan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve jel elektroforezi tabanlı Sanger ve Maxam-Gilbert dizileme teknikleri, yüksek maliyetleri, uzun işlem süreleri ve düşük verimlilikleri nedeniyle klinik uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmemektedir.

İnsan Genom Projesi sürecinde dizileme teknolojilerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve bu çalışmalar neticesinde Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) teknolojisinin temelleri atılmıştır. Pirosekanslama ve köprü amplifikasyonu gibi tekniklerin geliştirilmesiyle birlikte NGS, genetik analizlerde devrim niteliğinde bir değişim yaratmış ve non-invaziv prenatal testlerin uygulanabilirliğini büyük ölçüde artırmıştır (73,74).

Yeni Nesil Dizileme teknolojisine dayanan Masif Paralel Dizileme (Massively Parallel Sequencing, MPS), maternal plazmadaki fetal ve maternal kaynaklı DNA'yı birlikte dizileyerek, özellikle trizomi 21 gibi sayısal kromozomal anomalileri yüksek duyarlılık ve özgüllükle tespit edebilme imkânı sunar. MPS'in daha maliyet etkin ve hedefe yönelik bir versiyonu olan Hedeflenmiş Masif Paralel Dizileme (targeted MPS, t-MPS) ise yalnızca belirli kromozomal bölgelerin dizilenmesi sayesinde okuma sayısını azaltmakta ve analiz sürecini daha ekonomik hâle getirmektedir (75).

Bunlara ek olarak, Tek Nükleotid Polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) analizi, fetal ve maternal DNA profilleri arasındaki küçük farklılıkları değerlendirme esasına dayanır. Bu yöntem; triploidi, uniparental dizomi gibi karmaşık genetik anomalilerin prenatal tanısında da önemli avantajlar sunmaktadır (76).

Tablo 2. NIPT İçin Kullanılan Genetik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromozomal Anomaliler	Monogenik Bozukluklar
Masif Paralel Dizileme (Massively parallel shotgun sequencing , MPSS)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
Hedeflenmiş Masif Paralel Dizileme (Targeted massively parallel sequencing , t-MPS)	Yeni Nesil Dizileme (NGS)
Tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism , SNP)	Rölatif Mutasyon Dozu (RMD)

Non-invaziv prenatal tanıda kullanılan başlıca moleküler yöntemler arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) yer almaktadır. PCR, belirli genetik varyantlara veya mutasyonlara özgü hedeflemeyle yüksek doğruluk sağlayan bir yöntemdir; ancak yalnızca sınırlı sayıda mutasyonun analizine olanak tanması nedeniyle kapsamlı taramalarda yetersiz kalabilir. Özellikle cinsiyet tayini ve kromozomal anomalilerin belirlenmesinde kantitatif floresan PCR (QF-PCR) yönteminin kullanımı giderek artmış olup, bu yöntem yüksek özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği nedeniyle klinik olarak tercih edilmektedir (77).

Standart PCR tekniklerine kıyasla daha hassas olan dijital damlacık PCR (dd-PCR), son yıllarda ön plana çıkmaktadır. dd-PCR teknolojisi, örneği binlerce mikrodamlacığa bölerek her bir damlacıkta bağımsız PCR reaksiyonu gerçekleştirilmesine olanak tanır. Bu yöntem, düşük yoğunluktaki hedef DNA'nın yüksek hassasiyetle tespiti, doğrudan kopya sayımı yapılabilmesi, standart eğriye gerek duyulmaması ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi avantajlara sahiptir. Maternal plazmadaki hücre dışı serbest fetal DNA'nın düşük konsantrasyonda bulunması nedeniyle dd-PCR yöntemi bu alanda özellikle avantajlıdır (78,79).

NGS teknolojisi ise daha kapsamlı genetik analiz olanağı sunar. Tek bir analizle çok sayıda genetik varyantın eş zamanlı taranabilmesi, özellikle monogenik hastalıkların erken

dönemde saptanmasına olanak tanımaktadır. Yeni nesil dizilemenin işlem süresi kısalmış, maliyeti azalmış ve klinik erişilebilirliği artmıştır. NGS tabanlı analizlerin, prenatal tanıda giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlandığı gözlenmektedir (80).

İleri düzey moleküler tekniklerden Rölatif Mutasyon Dozu (RMD) ve Rölatif Haplotip Dozu (RHDO), özellikle X'e bağlı kalıtılan hastalıklar ve otozomal resesif bozukluklarda yüksek doğrulukla prenatal tanı yapılmasını mümkün kılmaktadır. Bu teknikler, anne ve baba haplotiplerinin ayrıştırılması yoluyla fetusteki spesifik genetik özelliklerin daha doğru şekilde saptanmasına olanak sağlar (81).

Son yıllarda, yapısal fetal anomalilerin saptandığı olgularda Tüm Ekzom Dizileme (Whole Exome Sequencing, WES) kullanılarak prenatal tanının derinleştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır. Maternal plazmadan elde edilen hücre dışı serbest fetal DNA örneklerinin bu tür ileri dizileme teknikleri ile analiz edilmesi, invaziv yöntemlere olan gereksinimi azaltmakta ve daha erken dönemde tanı olanaklarını genişletmektedir (82).

2.3.Soluk Havası

İnsan nefesinin hastalık tayininde kullanımı, tarihsel olarak oldukça eski dönemlere uzanmakta olup, ilk kayıtlara MÖ 5. yüzyılda Hipokrat tarafından rastlanmaktadır. Hipokrat'tan itibaren nefes kokusu, geleneksel tıpta bir teşhis aracı olarak değerlendirilmiş ve hepatik, üremik, aseton gibi tanımlamalarla sınıflandırılmıştır. Bu yaklaşım, hastalıklara özgü metabolitlerin nefes ile dış ortama atılabileceği fikrine dayanmaktadır (83). Orta Çağ'da İbn Sînâ (Avicenna), El-Kanun fi't-Tıbb adlı eserinde nefesin kokusunu ve karakterini tanı aracı olarak tanımlamış; 16. yüzyılda ise Paracelsus, hastalıkların kimyasal nedenleriyle ilgilenmiş ve vücuttan çıkan gazların analiz edilebileceğini öne sürerek modern metabolik tanı yaklaşımlarına öncülük etmiştir (83).

Atmosferik hava temel olarak azot (%78) ve oksijen (%21) gazlarından oluşur. Geriye kalan yaklaşık %1'lik kısmı ise karbondioksit (CO₂), su buharı ve eser miktarda bulunan diğer gazlar (argon, metan, helyum vb.) oluşturmaktadır. Soluk alıp verme süreci sırasında, akciğerler oksijen alımını ve karbondioksit atılımını sağlayarak gaz değişimini gerçekleştirir. Bu değişim, gazların kısmi basınç farkına bağlı olarak yüksek yoğunluktan düşük yoğunluğa doğru difüzyon yoluyla ilerlemesiyle gerçekleşir. Bu fizyolojik süreç, akciğerin en küçük yapı birimi olan alveoller ile bunları çevreleyen pulmoner kapiller damar ağı arasında gerçekleşir (84).

2.3.1. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası (EBC)

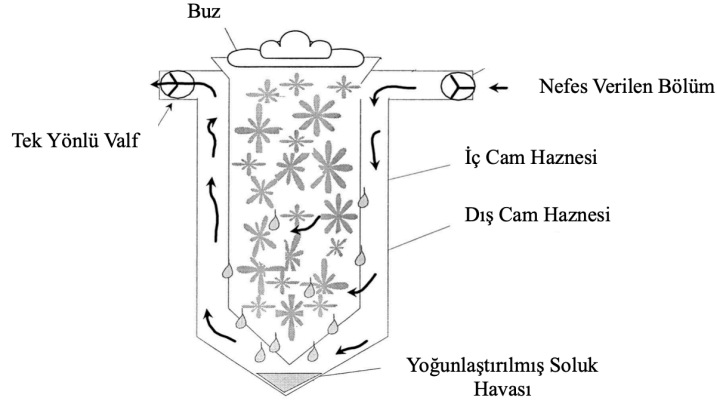
Alt solunum yollarından örnek elde etmek için kullanılan geleneksel yöntemler arasında balgam toplama, balgam indüksiyonu, bronkoalveolar lavaj (BAL) ve bronkoskopi yer alır. Ancak bronkoskopinin invaziv doğası, daha az invaziv alternatiflere olan ilgiyi artırmıştır. 1980’li yıllarda yapılan ilk çalışmalar, ekshale edilen soluk havasının sıvı formda toplanabileceğini ortaya koymuştur (8).

Yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC), ekshale edilen havanın soğutulup yoğuşturulmasıyla non-invaziv şekilde elde edilir. EBC’nin büyük kısmını (%99’dan fazlasını) su oluşturur. Bunun yanı sıra, hava yolu epitel hücrelerinden kaynaklanan sekresyonlar ve hava yolu yüzey sıvısının aerosolizasyonu sonucu oluşan partiküller de içerikte yer alır. Elde edilen kondensatın, periferalden ziyade merkezi hava yollarını daha çok yansıttığı bildirilmektedir (85,86).

EBC’nin büyük ölçüde sudan oluşmasına rağmen, içeriğinde bugüne kadar 3500’den fazla bileşik tespit edilmiştir; bu sayı her geçen gün yapılan yeni araştırmalarla artmaktadır (83). EBC bileşenleri arasında uçucu organik bileşikler (Volatile Organic Compounds, VOC), uçucu olmayan moleküller, mikroorganizmalar ve nükleik asitler yer alır. VOC’ler arasında hidrokarbonlar, alkoller, aldehytler, ketonlar, esterler, karboksilik asitler, furanlar, eterler ve hidrojen peroksit gibi maddeler bulunur. Uçucu olmayan bileşikler ise iyonlar, amino asitler, proteinler, yüzey aktif maddeler ve makromolekülleri içerir. Ayrıca, soluk havasında bakteriler, virüsler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmaların da saptanabildiği bildirilmiştir (9).

2.3.1.1. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası Elde Etme

Yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC) toplama işlemi, verilen soluk havasının soğuk bir yüzeye çarparak yoğuşması prensibine dayanır. Bu işlem sırasında damlacıklar yüzeyde birikerek sıvı formda toplanır (Şekil 3). Toplama sırasında tükürük kontaminasyonundan kaçınılmalıdır. Genellikle 15 dakikalık bir soluma süresi sonunda 1–2 mL EBC elde edilebilmektedir (87).



Şekil 3. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası Elde Etme Yöntemine Örnek Diyagram (87)

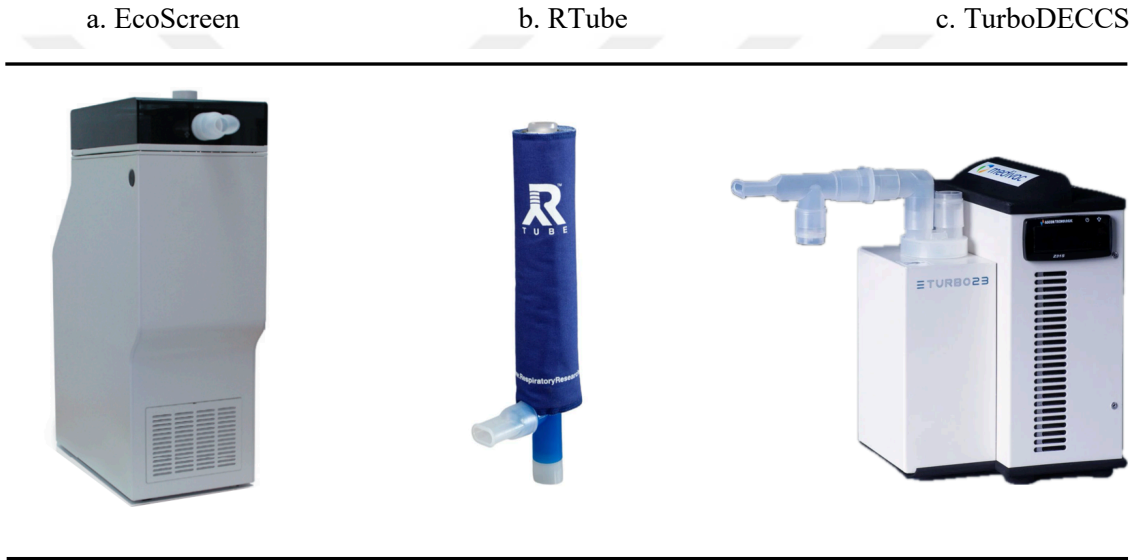
Normal soluk alışverişinde aerosol parçacık yoğunluğu $0,1-4$ parçacık/cm³ arasında değişmekte olup, ortalama çapları genellikle $0,3$ μm 'nin altındadır (88). Solunum yolundaki aerosol sayısı, havanın mevcut hızı ve hücre dışı astar sıvısının yüzey gerilimiyle ilişkilidir. Toplam soluk hacmi ve EBC hacmi arasında güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. Ancak EBC hacmi; FEV₁ (bir saniyelik zorlu ekspiratuar hacim) ve FVC (zorlu vital kapasite) gibi akciğer fonksiyon testleriyle doğrudan ilişkili değildir (89).

Bu yöntemin yaygınlaşmasındaki temel zorluklardan biri, standardizasyon eksikliğidir. Bu nedenle Amerikan Toraks Derneği (ATS) ve Avrupa Solunum Derneği (ERS), EBC toplanması ve analiziyle ilgili öneriler yayınlamıştır. Soluk hacmi, nefes paterni, hava sıcaklığı, nem oranı ve soluk verme yolu (ağız/burun) gibi faktörler, EBC içeriğini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle sabit bir soluma süresi yerine, toplamda yaklaşık 100 litre hava hacminin solunması önerilmektedir. Ayrıca, toplama işlemi oturur pozisyonda, burun klipsi kullanılarak yapılmalı; toplama süresi, sıcaklık gibi parametreler tutarlı biçimde kaydedilmelidir.

Yoğuşurma cihazlarında tükürük filtresi ve çift giriş-çıkışlı ağızlık bulunmalıdır. Örnekleme sırasında kullanılan cihaz tipi, yoğunlaşma yüzeyinin malzemesi, ölü hacim, toplam solunan hacim, süre ve sıcaklık gibi tüm detaylar kayıt altına alınmalıdır. Katılımcılara ait bilgiler; üst solunum yolu hastalıkları, sigara alışkanlıkları ve kullanılan ilaçlar gibi değişkenleri kapsamalıdır (90).

Ticari EBC toplama cihazları; farklı soğutma sistemleri, yoğunlaşma yüzeyi malzemeleri ve fraksiyonlu toplama seçenekleriyle çeşitlilik göstermektedir. Örneğin:

- a) EcoScreen: -20°C 'ye kadar soğutabilen, fraksiyonel toplama yapabilen bir sistemdir.
- b) RTube: Taşınabilir, tek kullanımlık bir cihaz olup soğutulmuş alüminyum yüzeyle çalışır.
- c) TurboDECCS: Peltier tipi elektrikli soğutma sistemine sahiptir.
- d) Anacon: Termoelektrik pompalı bir cihaz olup geniş sıcaklık aralığında yoğunlaşma sağlar (91).



Şekil 4. EBC Toplama Cihazları

Bu cihazların yüzeyleri, biyobelirteçlerle reaksiyona girmemesi için genellikle inert malzemelerden yapılır. Soğutma genellikle -20°C 'ye kadar yapılabilmektedir; ancak çok düşük sıcaklıklar, yüzeyde donma tabakası oluşturarak ısı transferini olumsuz etkileyebilir (92). Bu nedenle, cihaz kullanımında önceden belirlenmiş toplama hacmi, süresi ve sıcaklık gibi metodolojik faktörlerin dikkatle planlanması gerekir.

2.3.1.2. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası Analizi ve Klinik Kullanımı

Elde edilen EBC örneklerinde uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin analizinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. ELISA kitleri, düşük hassasiyet ve özgüllükleri nedeniyle sınırlı kalmakta; daha hassas sonuçlar elde edebilmek adına spektrofotometri, spektrofotometri, enzim bazlı analizler ve immünolojik testler (immunoassay) gibi yöntemlere başvurulmaktadır. Ancak bu tekniklerin geçerliliği, bileşiklerin kantitatif analizini mümkün kılan ileri düzey analitik yöntemler—örneğin kütle spektrometrisi (MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)—ile desteklenmelidir (93).

Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve kistik fibrozis (KF) gibi kronik solunum yolu hastalıklarında inflamatuvar biyobelirteçlerin tespitine yönelik birçok çalışma mevcuttur (90). Günümüzde ise araştırmalar, EBC'nin metabolomik, proteomik ve genomik içeriklerini incelemeye yönelmiş; bu sayede sadece solunum sistemi hastalıklarının değil, sistemik hastalıkların da erken tanısı hedeflenmiştir (94,95).

Astımlı bireylerde yapılan EBC analizleri önemli bulgular sunmaktadır. Örneğin, EBC pH değeri astım alevlenmesi sırasında düşerken, inhale kortikosteroid tedavisi ile yükselmektedir (96). Ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lökotrienler gibi oksidatif stres belirteçlerinin seviyelerinin astımlı bireylerde arttığı ve bu artışın hastalık şiddetiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (97).

KOAH hastalarında da benzer şekilde, H_2O_2 ve 8-izoprostan düzeyleri gibi oksidatif stres göstergeleri artış göstermektedir. Bu artış, hastalık klinik olarak stabilken dahi hava yolu inflamasyonunun varlığına işaret eder. Özellikle sigara içimi ve akut alevlenmeler sonrasında bu belirteçlerdeki yükselme, hastalık takibinde biyobelirteç kullanımının potansiyelini göstermektedir (98).

Kistik fibrozis hastalarında ise H_2O_2 seviyelerinde sağlıklı bireylere göre anlamlı bir fark saptanmamış; ancak nitrit ve 8-izoprostan düzeylerinde belirgin artış gözlenmiştir. Bu durum, oksidatif stresin erken göstergeleri olarak değerlendirilmiştir (99).

Akciğer kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda, EBC'de saptanan biyobelirteçlerin hastalığın erken tanısı, prognozu ve tedavi takibinde değerli bilgiler sağladığı ortaya konmuştur. H_2O_2 , İnterlökin-6 (IL-6), TNF- α ve VEGF gibi bileşiklerin düzeylerinin, hastalığın evresi ve tedaviye yanıt ile korele olduğu gösterilmiştir (93). Ayrıca EBC'den elde edilen DNA analizleriyle TP53, KRAS, EGFR gibi gen mutasyonları ve mikrosatellit instabilitesi gibi önemli genetik değişiklikler saptanabilmektedir (100).

Solunum sistemi dışındaki bazı hastalıklarda da EBC kullanımı araştırılmıştır. Örneğin, kronik böbrek hastalarında sistemik inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili olarak EBC'de pH, nitrit ve nitrat düzeylerinde artış gözlemlenmiştir. Bu düzeylerin hemodiyaliz sonrası azaldığı da raporlanmıştır (101). Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastalarında EBC'de IL-6, IL-8 ve IL-10 düzeylerinde artış tespit edilmiş ve bu artışın hastalık aktivitesiyle korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (102). Ayrıca, EBC'de glukoz ve metabolit düzeylerinin analizi ile diyabetin erken tanısı ve tedavi sürecinin izlenmesine yönelik çalışmalar da umut vaat etmektedir (103).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, tek merkezli ve prospektif bir çalışma olarak planlanmıştır. Çalışma kapsamında, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda izlem altında bulunan gebeler değerlendirilmiştir. Rutin uygulanan fetal ultrasonografide fetüsün erkek cinsiyette olduğu belirlenen gebeler çalışmaya dahil edilecektir. Literatür taraması yapılarak diğer çalışmalardan elde edilen veriler göz önünde bulundurulmuş ve optimal örneklem büyüklüğü 30 olgu olarak belirlenmiştir. 30 olguya ulaşıldığında çalışma sonlandırılmıştır.

Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 11.07.2024 tarihli, 24-7T/75 numaralı etik kurul onayının alınmasının ardından başlatılmıştır. Çalışma sürecinde hastaların tanı ve tedavi süreçlerine herhangi bir müdahale yapılmamıştır. Demografik ve klinik veriler, hasta dosyalarından temin edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden olgulardan, bilgilendirilmiş onam formu alındıktan sonra yoğunlaştırılmış soluk havası örneği alınmıştır.

3.1. Hasta Seçimi

Araştırmada yer alan bireylerin/olguların seçilme ve dahil edilme kriterleri:

- Gebe olmak (20 hafta ve üzeri),
- Tekil gebelik,
- Fetal ultrasonografide fetüsün erkek cinsiyette olduğunun belirlenmesi,
- 18 yaş üzerinde olmak,
- Soluk havası toplamaya engel sağlık sorunlarının olmaması,
- Organ nakli, son 6 ayda kan transfüzyonu gibi Y kromozomu bulaşına neden olabilecek durumların olmaması.

Araştırmada yer alan bireylerin/olguların dışlanma kriterleri:

- Yeterli yoğunlaştırılmış soluk havası materyali elde edememe,
- Doğum sonrası bebeğin dişi fenotipte görülmesi,
- Çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmayı isteyen katılımcılar.

3.2. Yoğunlaştırılmış Soluk Havası (EBC) Örneklerinin Toplanması

Örnekler, Avrupa Solunum Derneği ve Amerikan Toraks Derneği tarafından oluşturulan EBC toplama kılavuzuna uygun olarak toplanmıştır. Katılımcılardan, işlem öncesinde son bir saat içinde yemek yememiş olmaları ve işleme başlamadan önce steril su ile ağızlarını çalkalamaları istenmiştir. Ayrıca, son bir saat içinde yüksek fiziksel efor sarf eden katılımcılardan örnek alınması ertelenmiştir. Y kromozomu bulaşını önlemek amacıyla, örnek toplama esnasında erkek personelin odada bulunmasına izin verilmemiştir.

EBC örnekleri, test tüpünü soğutmak amacıyla Pilot Çalışma Seti 22 (Pilot Study Kit 22) kullanılarak toplanmıştır. Bu set, harici bir soğutma kaynağı ve etrafına geçirilen yalıtım kabuğundan oluşmaktadır. Örnek toplama işlemi, TurboDECCS sisteminde de kullanılan standart tek kullanımlık aparatlar ile gerçekleştirilmiştir (104) (Şekil 5). Soğutma kaynağı -20 °C derecede muhafaza edilmiş ve işlem başlamadan hemen önce çıkarılmıştır. Örnek, tek kullanımlık toplama kitinin ağızlık kısmına nefes verilerek toplanmıştır. Katılımcılardan bu esnada zorlu soluklar oluşturmaması, normal tidal volümde soluk alıp vermesi istenmiştir. 20-30 dakika arasında süren işlem sonucu yaklaşık 1-3 ml arasında EBC toplanmıştır. Elde edilen EBC örnekleri, bir sonraki aşamaya kadar saklanmak üzere hızlı bir şekilde -20 °C dolaplara transfer edilmiştir.



Şekil 5. EBC Örneklerinin Toplanması (104)

Solda merkezimizde EBC örneği toplanırken çekilmiş bir fotoğraf, sağda Pilot Çalışma Seti 22 (PSK22)



Şekil 6. EBC Toplama Video Örneği (QR Kod)

EBC örneklerinin alınma sürecini gösteren videoya yukarıdaki QR kod ile ulaşabilirsiniz. Lütfen QR kodu mobil cihazınızla tarayarak videoyu izleyiniz. İnternet bağlantısı gereklidir.

3.3. DNA İzolasyonu

Olgulardan alınan EBC örnekleri Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında çalışılmıştır. DNA izolasyonları, PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo) kullanılarak, kit maneline göre gerçekleştirilmiştir (105).

Elde edilen EBC örneklerinden DNA izolasyon basamakları:

1. Termal blok 55°C sıcaklığa ayarlanmıştır.
2. Her bir EBC örneğinin 400 µl'si steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
3. Örnek içeren her bir mikrosantrifüj tüpüne, 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNase A ilave edilmiştir. Kısa süreli vortekleme işleminden sonra tüpler, oda sıcaklığında yaklaşık 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sürecinin tamamlanmasının ardından, her bir örneğe 400 µl Lysis/Binding Buffer ilave edilmiştir. Ardından, homojen bir çözelti oluşması amacıyla tüpler vorteksenerek iyice karıştırılmıştır.
5. Örnekler, önceden 55°C sıcaklığa ayarlanan termal blokta 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
6. Termal bloktan alınan her bir lizata 400 µl %96-100 etanol eklenmiş ve vorteksenerek karıştırılmıştır.
7. Elde edilen her bir lizattan 640 µl spin kolon tüplerine alınmıştır. Örnekler oda sıcaklığında, 10.000 × g'de, bir dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır.
8. Santrifüjden sonra tüpün altında toplanan sıvı kısım atılmıştır.

9. Lizatın tamamı bitene kadar 7 ve 8. basamaklar tekrar edilmiştir.
10. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen spin kolon üzerine etanol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 1 eklenmiştir. Ardından oda sıcaklığında bir dakika boyunca $10.000 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonrası toplama tüpü içinde toplanan sıvı kısımla beraber atılmıştır. Spin kolonlar temiz birer toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
12. Her bir spin kolona, etanol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 2 eklenmiştir. Oda sıcaklığında, $10.000 \times g$ 'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
13. Yıkamaların ardından toplama tüpleri atılıp her bir spin kolon 1,5 ml hacimli steril bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
14. Her bir spin kolona 25 µl Elution Buffer ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, kolonlar yine oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüjlenerek DNA elüsyonu gerçekleştirilmiştir.
15. Daha fazla DNA elde etmek için, tekrar 25 µl Elution Buffer kullanılarak ikinci bir elüsyon adımı gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyonun ardından, örnekler 13.000 rpm'de 1,5 dakika süreyle santrifüjlenerek elüsyon tamamlanmıştır.
16. Sonuçta mikro santrifüj tüpü içinde saflaştırılmış DNA elde edilmiştir.

DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri, Nanodrop spektrofotometresi (Thermo Scientific) kullanılarak 230/260 nm ve 260/280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleriyle belirlenmiştir. İzolasyonu tamamlanarak elde edilen DNA'ların saflığı, 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans oranları esas alınarak değerlendirilmiş; A_{260}/A_{280} ve A_{230}/A_{260} oranları 2,0'nin üzerinde olan ve konsantrasyonu ≥ 1 ng/µl olan örnekler, kaliteli ve saf DNA olarak kabul edilerek çalışmaya dâhil edilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri, dijital damlacık PCR (dd-PCR) ile SRY analizleri yapılana kadar -20°C 'de saklanmıştır.

3.4. Dijital Damlacık PCR (dd-PCR) ile SRY Analizleri

Çalışmaya dahil edilen 30 olgudan izole edilen DNA örneklerinde fetal DNA'nın varlığını tespit etmek amacıyla SRY dizi analizleri dd-PCR yöntemiyle yapılmıştır. Dijital damlacık PCR teknolojisi, PCR numunelerini yağ içinde su damlacıklarına bölmek için mikroakışkanlar ve tescilli yüzey aktif madde kimyalarının bir kombinasyonunu kullanır (79). Damlacıklar, içerdikleri şablon moleküllerin PCR amplifikasyonunu destekler ve çoğu standart

TaqMan prob tabanlı test için kullanılanlara benzer reaktifler ve iş akışları kullanır. PCR'ı takiben, orijinal numunedeki PCR-pozitif damlacıkların fraksiyonunu belirlemek için her damlacık analiz edilir veya okunur. Bu veriler daha sonra orijinal numunedeki hedef DNA şablonu konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Poisson dağılımına dayalı istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edilir.

3.4.1. Dijital Damlacık PCR (dd-PCR) Çalışma Prensipleri

3.4.1.1. Damlacık Oluşturma

Damlacık oluşumundan önce, nükleik asit numuneleri (DNA) herhangi bir gerçek zamanlı deney için olduğu gibi hazırlanmıştır: PCR karışımı (damlacık üretimi için özel olarak geliştirilmiştir), SRY bölgesine özgü tarafımızdan tasarlanan primerler, spesifik floresan problemler (FAM ve HEX veya VIC'li TaqMan problemleri). Numuneler daha sonra 20.000 nanolitre boyutlu damlacıklara bölmek için tescilli reaktifler ve mikroakışkanlar kullanan QX200 Damlacık Üreticisine yerleştirilmiştir. QX200 Damlacık Oluşturucu tarafından oluşturulan damlacıklar, boyut ve hacim olarak aynıdır.

PCR karışımının hazırlanma aşamaları:

PCR karışımı, LightCycler® TaqMan® Master kiti kullanılarak kit manüeline göre hazırlanmıştır.

1. İlk olarak kullanılacak bütün reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir. Kısa bir vorteks işleminin ardından spin yapılmıştır.
2. Kullanılacak Master Mix (5x kons.) hazırlanmıştır: Soğuk blok üzerinde enzim içeren vial 1a'den 10 µl alınıp reaksiyon karışımını içeren vial 1b'ye pipetlenmiştir. Yavaşça pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanmıştır.
3. SRY forward ve reverse primerler ve hidroliz probu (Probe 71) içeren solüsyon 10x konsantre halde olacak şekilde hazırlanmıştır.
4. Soğuk blok üzerinde 200 µl'lik bir reaksiyon tüpüne örnek sayısına göre Tablo 3'te belirtilen şekilde karışım hazırlanmıştır.
5. PCR'ın gerçekleşeceği dd-PCR için özel olarak üretilmiş çiplere her bir örnek için 75 µl yağ [Generation Oil for Probes (RainSure®)] pipetlenmiştir.

Tablo 3. PCR Karışımı (Bir Reaksiyon için)

Karışım içeriği	Miktar
Su	9 µl
Primer-Prob karışımı (10x konsantre)	2 µl
Master mix (5x konsantre)	4 µl
Son hacim	15 µl

6. Çiplerdeki PCR reaksiyonunun gerçekleşeceği kuyucuklara, hazırlanan PCR karışımından her bir örnek için 15'er µl pipetlenmiştir.
7. Çip üzerindeki PCR karışımı içeren her bir kuyucuğa 5 µl DNA örneği eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
8. Her bir çip, çipler için özel olarak üretilmiş kapaklarla kapatılmıştır.

3.4.1.2. Damlacıkların PCR Amplifikasyonu

Çipler, herhangi bir uyumlu termal döngüleyicide PCR amplifikasyonu için toplamda 16 kuyucuğa sahip 4 çip kapasiteli plakaya yerleştirilmiştir. Primer sıcaklıklarına göre PCR gerçekleştirilmiştir.

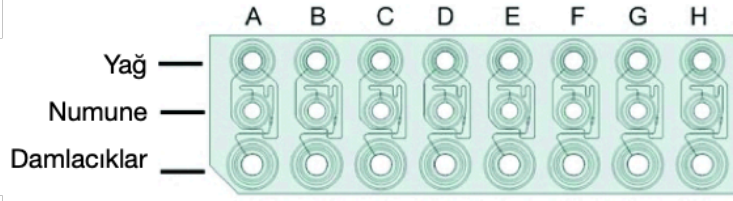
3.4.1.3. Damlacık Okuma

Damlacıklardaki nükleik asit hedefinin PCR amplifikasyonunu takiben, numuneler, iki renkli bir algılama sistemi (FAM ve HEX veya VIC'i saptamak üzere ayarlanmış) kullanarak her bir damlacığı ayrı ayrı analiz eden QX200 Damlacık Okuyucusuna yerleştirilmiştir. Aynı örnekte farklı hedefler analiz edilmiştir. Damlacık okuyucu ve beraberindeki QuantaSoft™ yazılımı ile, PCR pozitif (+) ve PCR negatif (-) damlacıklar sayılmıştır.

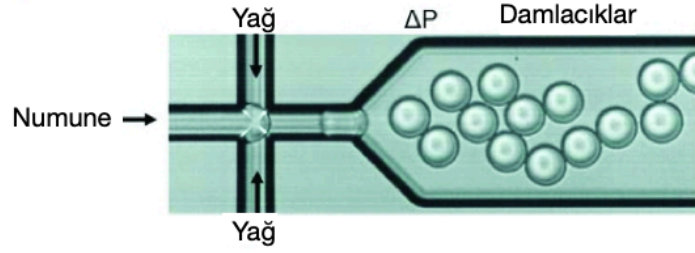
3.4.1.4. Sonuç Analizi

Hedef DNA'ya ait en az bir kopya içeren pozitif damlacıklar, negatif damlacıklara kıyasla daha yüksek floresan sinyali göstermektedir. Dijital damlacık PCR (dd-PCR) analizinde, QuantaSoft™ yazılımı numunelerde her bir florofor (örneğin HEX ve FAM) için negatif ve pozitif damlacıkların sayımını gerçekleştirerek veri analizini mümkün kılar. Pozitif damlacıkların fraksiyonu daha sonra kopya/µl birimlerinde girdi reaksiyon karışımındaki hedef DNA molekülünün mutlak ilk kopya sayısını belirlemek için bir Poisson dağılımına uyarlanır.

● Numunelerin ve yağın tek kullanımlık damlacık jeneratörü kartuşuna yüklenmesi



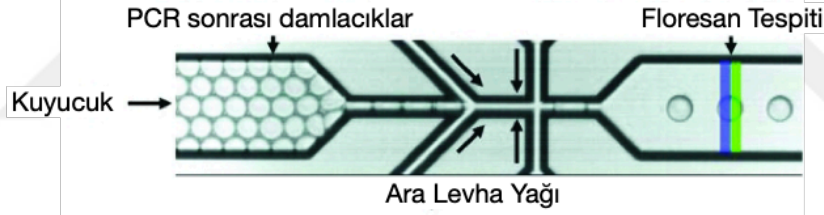
● Damlacıkların oluşturulması



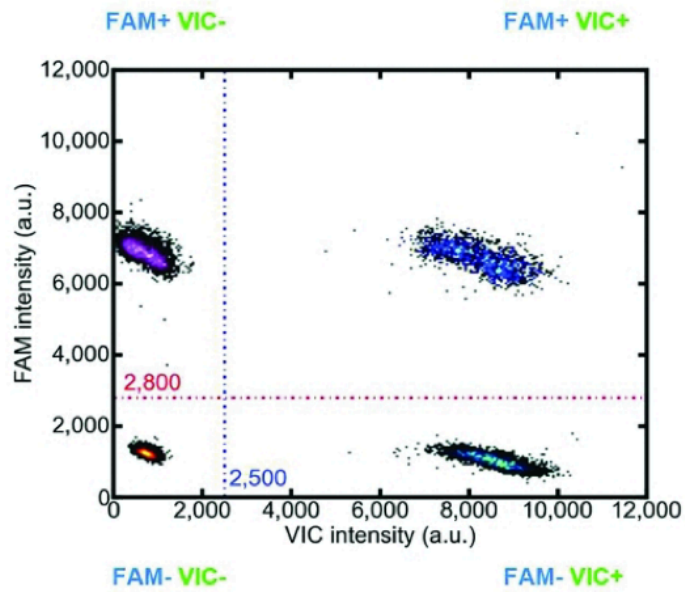
● Damlacıkların 96 kuyucuklu PCR plakasına aktarılması

● Termal döngüden son noktaya

● Damlacık floresansının okunması



● Amplitüd eşiklerinin uygulanması ve konsantrasyonların hesaplanması



Şekil 7. Dijital Damlacık PCR (dd-PCR) Çalışma Basamakları (79)

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen verilerin analizleri RStudio yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı istatistiklerde, sürekli değişkenler (örneğin yaş) için ortalama \pm standart sapma ya da medyan [minimum-maksimum] değerleri kullanılmıştır, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde dağılımları sunulmuştur. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde ki kare analizi veya Fisher'in kesin testi kullanılmıştır. EBC'de hücre dışı serbest fetal DNA'nın varlığı, duyarlılık, seçicilik, pozitif prediktif değer (PPV), negatif prediktif değer (NPV) ve %95 güven aralığı (GA) ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre yapılmıştır.



4.BULGULAR

Çalışmamıza, fetal ultrasonografi ile erkek fetüs taşıdığı tespit edilen toplam 33 gebe dahil edilmiştir. Tüm gebelerden yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC) örnekleri alınmıştır. Ancak, toplanan EBC miktarının yetersiz olması nedeniyle 3 olgu çalışma dışı bırakılmış ve toplam 30 gebeden elde edilen örnekler dijital damlacık PCR (dd-PCR) yöntemi ile analiz edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen olguların ortalama yaşı $30,1 \pm 6,1$ yıl olarak belirlenmiştir. Örnekleme yapıldığı dönemde gestasyonel yaşlar 33 ile 40 hafta arasında değişmekteydi. Olguların gebelik haftası ortalaması 37 hafta olarak saptanmıştır. Gebelerin altısı nullipar, 24'ü ise multipardır. Örneklem alımı ile eş zamanlı gerçekleştirilen ultrasonografilerde ortalama tahmini fetüs ağırlığı 3085 gram olarak ölçülmüştür.

Örneklerin 11'i doğumhane yatışı esnasında, 19'u ise poliklinik kontrollerinde alınmıştır. Eşlik eden hastalıklara bakıldığında; 4 olguda gestasyonel diyabet, 5 olguda hipotiroidi, 3 olguda Rh uyuşmazlığı, 1 olguda over kisti ve 1 olguda bruselloz mevcuttu. Olguların 16'sı normal spontan vajinal doğumla sonuçlanırken, 14'ünde sezaryen doğum gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. Katılımcıların Tanımlayıcı Özellikleri

	Ortalama \pm SS	Medyan	Minimum değer	Maksimum değer
Yaş (yıl)	30,13 \pm 6,16	29	20	44
Gebelik Haftası	37,03 \pm 1,85	37	33	40
Fetüs Ağırlığı (gram)	3085,57 \pm 529,9	3105	2227	4280
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	30,12 \pm 6,6	29,65	20,4	47,5

SS: standart sapma

Tablo 5. Olguların Klinik Verileri

Olgu No	Anne Yaşı (yıl)	Parite	VKİ (kg/m²)	Örnekleme Esnasında Gebelik Haftası	Örnekleme Esnasında Fetüs Ağırlığı (gr)	Örnek Alım Yeri	Doğum Yöntemi
1	30	G3P1	33,7	37	2620	Doğumhane	C/S
2	44	G2P1	39	37	2580	Doğumhane	C/S
3	40	G5P3	32,4	38	3420	Doğumhane	C/S
4	25	G2P0	40,3	38	3110	Doğumhane	C/S
5	23	G2P1	34	38	3668	Poliklinik	NSVD
6	29	G1P0	20,6	40	3650	Doğumhane	NSVD
7	39	G5P3	31,1	39	3630	Doğumhane	NSVD
8	27	G2P0	26,4	39	3360	Poliklinik	NSVD
9	24	G3P2	28	37	3310	Doğumhane	NSVD
10	39	G4P1	32	36	2850	Poliklinik	C/S
11	32	G1P0	31,7	39	4280	Doğumhane	C/S
12	26	G2P1	30,4	35	2642	Poliklinik	NSVD
13	20	G1P0	21	40	3770	Doğumhane	C/S
14	35	G2P1	39,2	38	3960	Doğumhane	C/S
15	28	G3P1	22,3	34	2355	Poliklinik	NSVD
16	32	G3P2	20,4	37	3100	Poliklinik	C/S
17	28	G3P2	47,5	37	3300	Poliklinik	NSVD
18	42	G5P4	32	37	3282	Poliklinik	NSVD
19	26	G2P1	23,3	36	2729	Poliklinik	NSVD
20	32	G3P2	26,3	36	3700	Poliklinik	NSVD
21	30	G3P1	36,3	37	2986	Poliklinik	C/S
22	28	G4P3	24,2	36	2760	Poliklinik	C/S
23	34	G1P0	29,7	35	2608	Poliklinik	C/S
24	22	G1P0	25,2	34	2328	Poliklinik	NSVD
25	23	G2P1	29,6	33	2227	Poliklinik	NSVD
26	31	G3P2	28,1	35	2425	Poliklinik	C/S
27	29	G1P0	26,5	38	3222	Poliklinik	NSVD
28	25	G3P1	26,6	39	3240	Poliklinik	NSVD
29	26	G2P0	40	36	2565	Poliklinik	NSVD
30	35	G2P1	25,9	40	2890	Doğumhane	C/S

VKİ: Vücut kitle indeksi; G: gravida; P: parite; C/S: sezaryen doğum; NSVD: normal spontan vajinal doğum

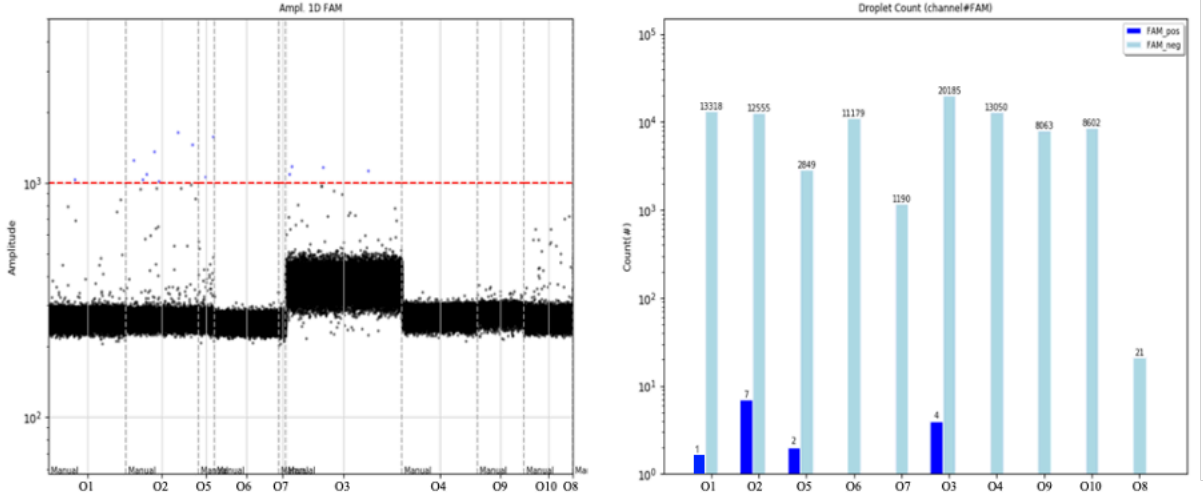
Elde edilen 30 EBC örneğine DNA izolasyonu uygulanmıştır. Örneklerin ortalama DNA konsantrasyonu 17 ng/µl olarak belirlenmiştir. Tespit edilen DNA konsantrasyonları en düşük 3,3 ng/µl, en yüksek ise 34,1 ng/µl olarak ölçülmüştür. İzolasyonu sağlanan tüm DNA örneklerinde SRY dizilerinin mevcudiyeti, dijital damlacık PCR (dd-PCR) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda toplam örneklerin 11'inde (11/30; %36,6) pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Örnek alınarak çalışmaya dahil edilen tüm gebelerin bebeklerinin (30/30), doğum sonrası muayenede fenotipik olarak erkek cinsiyette olduğu tespit edilmiştir.



Tablo 6. EBC Örneklerinden Elde Edilen DNA Konsantrasyonları ve dd-PCR ile SRY Sonuçları

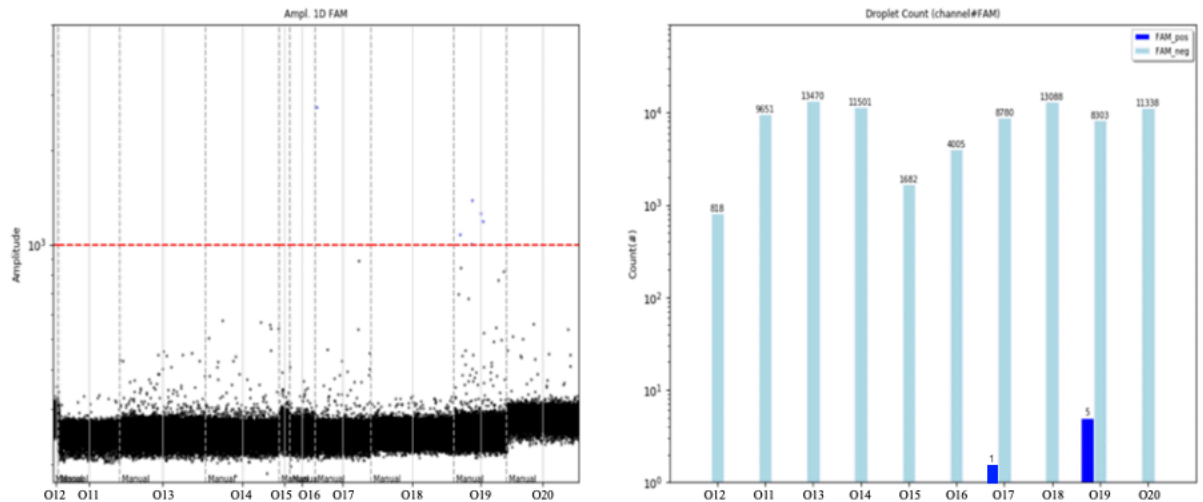
Olgu No	Anne Yaşı (yıl)	Örneklem Esnasında Gebelik Haftası	Örneklem Esnasında Tahmini Fetüs Ağırlığı (gr)	VKİ (kg/m²)	DNA konsantrasyonu (ng/μl)	dd-PCR SRY kopya sayısı
Pozitif Sonuçlanan Olgular						
1	30	37	2620	33,7	14,7	1
2	44	37	2580	39	13,7	7
3	40	38	3420	32,4	25,4	4
5	23	38	3668	34	15,8	2
17	28	37	3300	47,5	30,2	1
19	26	36	2729	23,3	7,7	5
25	23	33	2227	29,6	3,3	1
26	31	35	2425	28,1	16,6	3
27	29	38	3222	26,5	31,5	3
29	26	36	2565	40	6	6
30	35	40	2890	25,9	7,5	3
Negatif Sonuçlanan Olgular						
4	25	38	3110	40,3	18,2	-
6	29	40	3650	20,6	17,7	-
7	39	39	3630	31,1	12,6	-
8	27	39	3360	26,4	8,3	-
9	24	37	3310	28	12,5	-
10	39	36	2850	32	15,9	-
11	32	39	4280	31,7	17,6	-
12	26	35	2642	30,4	33,6	-
13	20	40	3770	21	27,8	-
14	35	38	3960	39,2	13,3	-
15	28	34	2355	22,3	15	-
16	32	37	3100	20,4	18,5	-
18	42	37	3282	32	34,1	-
20	32	36	3700	26,3	17,8	-
21	30	37	2986	36,3	21,2	-
22	28	36	2760	24,2	15,9	-
23	34	35	2608	29,7	14,7	-
24	22	34	2328	25,2	8,1	-
28	25	39	3240	26,6	15,2	-

dd-PCR: Dijital damlacık PCR; “-”: negatif



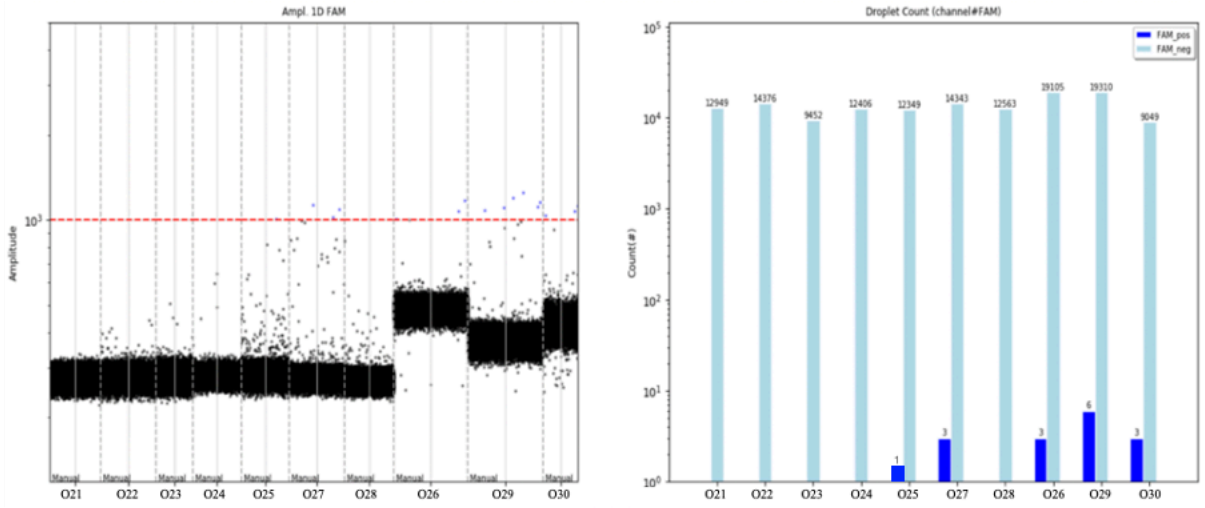
Şekil 8. Olgu 1-10'a ait dd-PCR Analizlerinin Grafikleri

Her iki grafikte de olgular, soldan sağa doğru sırasıyla Olgu 1, Olgu 2, Olgu 5, Olgu 6, Olgu 7, Olgu 3, Olgu 4, Olgu 9, Olgu 10 ve Olgu 8 şeklinde dizilmiştir. Şekil 7, şekil 8 ve şekil 9'da solda dijital damlacık PCR sonuçlarının dağılım grafiği görülmektedir. Eşik değer kırmızı kesikli çizgi olarak ifade edilmektedir (Eşik değer 1000 olarak belirlenmiştir). Eşik değerinin üstünde kalan mavi noktalar artmış floresan gösteren PCR (+) damlacıkları, eşik değerinin altında kalan siyah noktalar ise PCR (-) damlacıkları göstermektedir. Şekil 7, şekil 8 ve şekil 9'da sağda yer alan grafikler dd-PCR analizlerinin sütun grafiği şeklinde sonuçlarını içermektedir. Koyu mavi sütunlar PCR (+) damlacık sayısını, açık mavi sütunlar ise PCR (-) damlacık sayısını göstermektedir.



Şekil 9. Olgu 11-20'ye ait dd-PCR Analizlerinin Grafikleri

Her iki grafikte de olgular, soldan sağa doğru sırasıyla Olgu 12, Olgu 11, Olgu 13, Olgu 14, Olgu 15, Olgu 16, Olgu 17, Olgu 18, Olgu 19, Olgu 20 şeklinde dizilmiştir.



Şekil 10. Olgu 21-30'a ait dd-PCR Analizlerinin Grafikleri

Her iki grafikte de olgular, soldan sağa doğru sırasıyla Olgu 21, Olgu 22, Olgu 23, Olgu 24, Olgu 25, Olgu 27, Olgu 28, Olgu 26, Olgu 29, Olgu 30 şeklinde dizilmiştir.

Tablo 7. SRY pozitif ve SRY negatif görülen olguların çeşitli parametrelere göre karşılaştırılması

	SRY	Ortalama ± SS	Medyan [min-maks]	Test istatistiği; p değeri
Yaş (yıl)	Negatif	29.95±5.98	29 [20-42]	t=-0.214
	Pozitif	30.45±6.74	29 [23-44]	p=0.832
Gebelik Haftası	Negatif	37.16±1.89	37 [34-40]	t=0.479
	Pozitif	36.82±1.83	37 [33-40]	p=0.636
Fetüs Ağırlığı (gram)	Negatif	3206.37±540.98	3240 [2328-4280]	t=1.693
	Pozitif	2876.91±460.32	2729 [2227-3668]	p=0.102
Maternal Kilo (kg)	Negatif	76.21±17.21	73 [55-115]	t=-0.739
	Pozitif	80.73±14.01	78 [64-100]	p=0.466
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	Negatif	28.62±5.9	28 [20.4-40.3]	t=-1.697
	Pozitif	32.73±7.2	32.4 [23.3-47.5]	p=0.101
DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	Negatif	17.79±7.14	15.9 [8.1-34.1]	U=78.5
	Pozitif	15.67±9.69	14.7 [3.3-31.5]	p=0.263

Anne Yaşı: SRY negatif grubun ortalama yaşı $29.95 \pm 5,98$ yıl, pozitif grubun ise $30.45 \pm 6,74$ yıldır. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($t=-0.214$, $p=0.832$).

Gebelik Haftası: SRY negatif grupta $37.16 \pm 1,89$ hafta, pozitif grupta $36.82 \pm 1,83$ hafta olarak bulunmuş; fark anlamlı değildir ($t=-0.479$, $p=0.636$).

Fetüs Ağırlığı: Negatif grupta ortalama $3206.37 \pm 540,98$ gram pozitif grupta $2876.91 \pm 460,32$ gram olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($t=-1.693$, $p=0.102$).

Maternal Kilo: Negatif grubun medyan kilosu 73 kg [55–115], pozitif grubun ise 78 kg [64–100] olarak bulunmuştur ($t=0.739$, $p=0.466$).

Vücut Kitle İndeksi (VKİ): Negatif grubun ortalaması 28.62 ± 5.9 , pozitif grubun ise 32.73 ± 7.2 olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($t=-1.697$, $p=0.101$).

DNA Konsantrasyonu: Negatif grupta medyan DNA konsantrasyonu 15.9 ng/ μ l [1.8–34.1], pozitif grupta ise 14.7 ng/ μ l [3.3–31.5] olarak bulunmuştur ($U=78.5$, $p=0.263$).

5.TARTIŞMA

Günümüzde tıbbi alanda yaşanan teknolojik ilerlemeler ve bilimsel araştırmaların artışı, erken tanı ve tarama testlerinin önemini artırmıştır. Her alanda olduğu gibi prenatal tanı alanında da yeni gelişmeler olmuş, gebelik sürecinde fetüse ait genetik bilgilerin daha güvenli, erken ve doğru bir şekilde elde edilmesi mümkün hale gelmiştir. Hücre dışı serbest fetal DNA (cffDNA) temelli non-invaziv prenatal test (NIPT), son yıllarda klinik uygulamalarda yerini almış ve giderek daha yaygın kullanılan bir tarama yöntemi haline gelmiştir. Hücre dışı serbest fetal DNA'nın anne kanından çalışılması invaziv işlemlere olan ihtiyacı azaltarak komplikasyon risklerini ortadan kaldırmaktadır (106).

İlk olarak akciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde kullanılan yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC) yöntemi, yeni gelişmelere açık bir alan olarak dikkat çekmektedir. EBC, non-invaziv olması nedeniyle hasta konforunu artırmakta ve tekrarlanabilirliği ile klinik uygulamalarda avantaj sağlamaktadır. Sistemik hastalıklarda da EBC çalışmaları yapılmış ve birçok biyobelirteç tanımlanmıştır. Kanser hastalarında hücre dışı serbest DNA (cfDNA) artışı olduğu gösterilmiştir. Özellikle akciğer kanserinde EBC örneklerinin tanı ve takipte kullanılabileceğine yönelik yayınlar mevcuttur (107).

Maternal plazma dışında amniyotik sıvı, maternal idrar gibi çeşitli vücut sıvılarında da cffDNA varlığının gösterilmesi bu alanda farklı çalışmaları akla getirmiştir. EBC örneklerinde hücre dışı serbest DNA'ların mevcudiyeti, prenatal dönemde fetüse ait cffDNA varlığı açısından da değerlendirme yapılmasının anlamlı olabileceğini düşündürmüştür. Ancak literatür incelendiğinde, EBC içerisinde cffDNA varlığına dair yapılmış çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğu, hatta yalnızca bir yayının bu konuda bilgi sunduğu görülmektedir. Bu durum, konunun bilimsel açıdan oldukça yenilikçi ve araştırmaya açık bir alan olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda yapılacak kapsamlı çalışmaları, hem EBC'nin potansiyelini daha iyi anlamamıza olanak sağlayacak hem de prenatal tanıda yeni bir non-invaziv alternatif yöntem geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Prenatal dönemde maternal plazmada cffDNA temelli ilk çalışmaları cinsiyet tayinine yönelik olmuştur. Anne kanında bulunmayan Y kromozomu dizilerinin amplifikasyonu fetüsün erkek cinsiyette olduğuna işaret eder. Bu yöntem, özellikle X'e bağlı hastalıkların taranmasında klinik değer taşır. Bunun yanı sıra parmak ucundan alınan örneklerde cffDNA çalışılarak fetal cinsiyet tayini hizmeti sunan bazı ticari testlerin olduğu da bilinmektedir (71). Fetal cinsiyet tayini, olgu sayısının kısa sürede toplanabilmesi, analiz sürecinin görece kolay olması nedeniyle ilk olarak uygulanmıştır. Benzer şekilde düşünülüğünde, plazmada yürütülen cffDNA

çalışmalarının ilk adımlarında olduğu gibi, EBC örneklerinde yapılacak cffDNA analizlerinde de cinsiyet tayini ile başlanması bilimsel açıdan uygun ve uygulanabilir görülmektedir. Bu yaklaşım, hem EBC içerisinde cffDNA'nın varlığının kanıtlanması açısından ilk doğrulayıcı adım olabilir hem de daha ileri genetik analizlerin önünü açabilecek bir temel teşkil eder.

Bu çalışmada, gebelerin soluk havasında (EBC) cffDNA varlığı kanıtlanmıştır. Ultrasonografik olarak erkek fetüs taşıdığı belirlenen 30 gebenin EBC örneklerinde yapılan SRY gen amplifikasyonu sonucunda, tespit oranı %36,6 (11/30) olarak bulunmuştur. Tıplamaz ve ark.ları (108) tarafından yapılan ve literatür taramalarında bu alanda yapılmış bulabildiğimiz tek çalışmada tespit oranı %18,8 olarak bildirilmiştir. Tespit oranımızın daha yüksek olmasında, çalışmaya dahil edilen olgu sayısının fazla olması etkili olabilir.

Gebelikte genetik tarama amacıyla yoğunlaştırılmış soluk havasının kullanımı, invaziv yöntemlere alternatif oluşturan yenilikçi ve umut verici bir yaklaşımdır. Amniyosentez ve koryon villus örnekleme gibi geleneksel yöntemler düşük riski taşımasına rağmen yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşın EBC analizi hem anne hem de fetüse ait biyobelirteçleri içermesi sayesinde, fetal sağlığa dair önemli bilgiler sunabilir. Bu çalışmada EBC'de SRY dizisinin tespit edilmesi, fetal cinsiyet belirlemede bu yöntemin potansiyelini ortaya koymakta ve invaziv olmayan prenatal testlere yönelik yeni bir perspektif sunmaktadır.

Fernández-Martínez ve ark.ları (72) tarafından maternal plazmada yapılan çalışmalarda SRY, DYS14 ve DAZ gibi Y kromozomuna özgü dizilerin kombine olarak çalışılması ile tespit oranlarının arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada yalnızca SRY dizilerinin amplifikasyonunu kullanılmıştır. Y kromozomuna özgü diğer dizilerin kombine kullanımı ile yoğunlaştırılmış soluk havasında da daha yüksek tespit oranları elde edilebileceği düşünülmüştür.

Non-invaziv prenatal test yöntemlerinde yanlış negatif sonuçların önlenmesinde, maternal plazmadaki fetal DNA oranı önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir ve bu oran "fetal fraksiyon" olarak adlandırılmaktadır. Literatürde, fetal fraksiyonu etkileyen çeşitli faktörler üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Hou ve ark.ları (109) tarafından yürütülen bir çalışmada, maternal yaş ile fetal fraksiyon arasında negatif bir korelasyon bildirilmiştir. Buna karşılık, Hestand ve ark.ları (110) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise maternal yaşın fetal fraksiyon üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur. Mevcut çalışmamızda, SRY negatif grubun ortalama yaşı $29,95 \pm 5,98$ yıl, SRY pozitif grubun ise $30,45 \pm 6,74$ yıl olarak belirlenmiş; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgular doğrultusunda, maternal yaşın fetal fraksiyon üzerindeki etkisinin daha kapsamlı ve kontrollü çalışmalarda incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Hou ve ark.ları (109) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, gebelik haftası ile fetal fraksiyon arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Çalışmamızda, SRY negatif grubun ortalama gebelik haftası $37,16 \pm 1,89$ hafta, SRY pozitif grubun ise $36,82 \pm 1,83$ hafta olarak belirlenmiş; bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmaya dahil edilen olguların gebelik haftalarının 33 ile 40 hafta arasında sınırlı bir dağılım göstermesi nedeniyle, gruplar arasındaki farkın anlamlı düzeye ulaşmadığı düşünülmektedir. Fetal DNA konsantrasyonundaki değişimlerin daha geniş bir zaman diliminde ve farklı trimesterları kapsayacak şekilde izlenmesi, yöntemin hangi gebelik haftasında en yüksek verimle uygulanabileceğini ortaya koymak açısından önem taşımaktadır.

Literatürde, fetal fraksiyon düzeyleri ile maternal kilo ve vücut kitle indeksi (VKİ) arasında negatif bir korelasyon olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (109–111). Bu durumun altında yatan mekanizma, VKİ'si yüksek olan gebelerde plazma hacminin artmasına rağmen cffDNA miktarının sabit kalması şeklinde açıklanmaktadır. Ayrıca, adipoz dokusu fazla olan bireylerde inflamasyon ve doku nekrozuna bağlı olarak maternal dolaşımında artmış hücre dışı serbest DNA düzeyleri gözlenmekte, bu da fetal fraksiyonun düşmesine neden olabilmektedir. Mevcut çalışmada, SRY negatif grubun medyan kilosu 73 kg [55–115], pozitif grubun ise 78 kg [64–100] olarak bulunmuştur. VKİ açısından değerlendirildiğinde, SRY negatif grubun ortalaması $28,62 \pm 5,9$ iken, pozitif grubun ortalaması $32,73 \pm 7,2$ olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç örneklem büyüklüğü ve dağılım aralığı gibi faktörlerle ilişkili olabilir.

Qiao ve ark.ları (112) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, toplam cfDNA konsantrasyonunun fetal fraksiyon ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, daha kısa cfDNA parçalarının analiz edilmesinin fetal fraksiyonu artırdığı vurgulanmıştır. Bu bulgular, yüksek cfDNA düzeylerinin maternal kaynaklı DNA oranını artırarak fetal DNA oranını seyreltme potansiyeline işaret etmektedir. Çalışmamızda, SRY negatif grupta medyan DNA konsantrasyonu $15,9 \text{ ng}/\mu\text{l}$ [1,8–34,1], SRY pozitif grupta ise $14,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$ [3,3–31,5] olarak saptanmıştır. Gruplar arasında DNA konsantrasyonu açısından anlamlı bir fark gözlenmemekle birlikte, bu parametrenin fetal fraksiyon üzerindeki olası etkilerinin daha büyük örneklerle ve ileri analiz yöntemleriyle değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Maternal yaş, maternal kilo, VKİ ve DNA konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlerin fetal fraksiyon üzerindeki etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak yoğunlaştırılmış soluk havasındaki cffDNA varlığı ve kaynağına ilişkin literatürde yeterli veri bulunmamaktadır. Mevcut bilgiler doğrultusunda, bu ortamdaki cffDNA'nın sistemik dolaşımdan geçiş yoluyla oluştuğu olası bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir (113).

Bununla birlikte, yoğunlaştırılmış soluk havasında fetal DNA varlığını ortaya koyan herhangi bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle, çalışmamızda elde edilen bulgular yalnızca maternal plazmadaki fetal fraksiyon ile karşılaştırılmalı olarak tartışılmıştır.

Maternal plazma, hücre dışı serbest DNA açısından daha yüksek konsantrasyon ve moleküler stabiliteye sahipken; EBC'nin yapısı daha seyreltik olup, genellikle daha küçük boyutlu ve parçalanmış DNA fragmentleri içermektedir. Ayrıca EBC'deki DNA'lar, solunum yollarından, epitel hücrelerden veya sistemik dolaşımdan difüze olan moleküllerden kaynaklanabilir. Bu yapısal farklar, DNA izolasyon verimini ve elde edilen verilerin kalitesini doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla, EBC'de fetal DNA tayini için daha hassas analitik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Maternal plazmadaki cfDNA ile yoğunlaştırılmış soluk havasındaki fetal DNA arasında bir ilişki bulunması muhtemeldir; ancak bu ilişkinin derecesi ve doğrusal bir orantı içinde olup olmadığı henüz bilimsel olarak kesinlik kazanmamıştır. Bu nedenle, iki ortam arasında fetal DNA oranlarının doğrudan benzer düzeylerde olduğunu söylemek şu aşamada mümkün değildir. Çalışmamızdaki verilerle fetal fraksiyonu etkilediği bilinen faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı bir benzerlik göstermemesi, bu belirsizliğin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma, yoğunlaştırılmış soluk havasındaki fetal DNA analizine ilişkin literatürde öncü nitelikte olup, konunun daha iyi anlaşılabilmesi için örneklem büyüklüğünün artırılması ve ileri yöntemlerin kullanıldığı ek araştırmaların yapılması gerekliliği ortaya konmuştur.

Yoğunlaştırılmış soluk havasında genetik materyal tespiti, özellikle DNA, miRNA ve diğer nükleik asitlerin varlığı, çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu materyallerin, sistemik dolaşıma karışan hücre dışı serbest DNA'lar veya hücrelerden salınan ekstraselüler veziküller (örneğin ekzozomlar) aracılığıyla akciğerlere ulaştığı düşünülmektedir. Literatürde genel kabul gören görüşe göre, bu yapılar akciğer kapillerinden alveollere geçiş yaparak alveoler astar sıvısına karışmakta ve daha sonra ekshale edilen havayla dış ortama atılmaktadır (114). Akciğerlerde büyük bir kapiller ağ olması bu görüşü desteklemektedir. Bu bulgular, solunum havasının kanser hastalarında biyopsi amacıyla, gebelerde prenatal taramada kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır.

Gebelikte, özellikle gestasyonel diyabet gibi komplikasyonlarda, maternal plazmada belirli mikroRNA (miRNA) düzeylerinin anlamlı şekilde değiştiği ve bu değişimlerin gebeliğin erken dönemlerinden itibaren gözlenebildiği gösterilmiştir(115). Bu miRNA'lar, sadece metabolik düzenlemelerle değil, aynı zamanda inflamasyon ve hücrel stres yanıtlarıyla da ilişkilidir. Literatürde, bazı miRNA'ların EBC gibi non-invaziv örneklerde de tespit

edilebildiğine dair ön veriler bulunmaktadır (116). Bu bulgular, sistemik dolaşımında artan bazı küçük ve stabil moleküllerin, solunum epitel bariyerini aşarak EBC'de de izlenebilir olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, gestasyonel diyabetle ilişkili olarak maternal plazmada düzeyleri artan miRNA'ların EBC örneklerinde de araştırılması, hastalığın erken tanı ve takibinde yenilikçi bir non-invaziv yaklaşımın temelini oluşturabilir. Ayrıca, bu tür moleküllerin EBC'deki varlığının gösterilmesi, sistemik metabolik durumların solunum biyobelirteçleriyle ne ölçüde yansıtılabildiğine dair önemli fizyopatolojik bilgiler sağlayabilir.

Gebelikte yaygın olarak kullanılan β -hCG, PAPP-A ve AFP gibi biyobelirteçler, yüksek moleküler ağırlıkları nedeniyle EBC örneklerinde tespit edilemeyebilir. Ancak bu biyobelirteçlerin EBC'de bulunabilirliğine yönelik doğrudan bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu durum, EBC'nin yalnızca uçucu ve düşük molekül ağırlıklı bileşenleri taşıyabildiği hipotezini desteklemekle birlikte, konunun deneysel verilerle doğrulanması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, preeklampsi gibi oksidatif stresin belirgin olduğu gebelik komplikasyonlarında, plazmada hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 8-izoprostan gibi oksidatif stres belirteçlerinin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (117). Bu bağlamda, oksidatif stresle ilişkili düşük moleküllü belirteçlerin EBC örneklerinde araştırılması, hem non-invaziv tanı olanaklarının geliştirilmesi hem de gebelikteki fizyopatolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır.

Elektronik burun, farklı gazlara duyarlı sensör dizileri ve bu sensörlerden elde edilen yanıtları işleyen yapay zekâ algoritmalarını kullanan bir cihazdır. Yoğunlaştırılmış soluk havasında bulunan uçucu organik bileşikler (VOC), bireyin metabolik ve fizyolojik durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. VOC profili; inflamasyon, sistemik hastalıklar ve hormonal değişiklikler gibi birçok durumdan etkilenmektedir. Bikov ve ark.ları tarafından 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada, elektronik burun teknolojisi kullanılarak gebelik sırasında soluk havasının kimyasal bileşiminde anlamlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, 78 gebe ve 52 gebe olmayan kadının soluk havası örnekleri analiz edilmiş; gebelik süresince VOC paternlerinde özgün değişimler gözlemlenmiştir (118).

Fetal DNA'nın anne solunum sistemine geçiş mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da gebeliğe özgü VOC paternleri ile EBC'deki fetal DNA düzeyi arasında potansiyel bir ilişki olabileceği hipotezi dikkate değerdir. Özellikle fetal-maternal alışveriş ya da plasental fonksiyon ile ilişkili belirli VOC'lerin tanımlanması durumunda, elektronik burun gibi non-invaziv teknolojiler fetal DNA'nın varlığına veya miktarına dair dolaylı göstergeler sunabilir. Bu yaklaşım, fetal DNA analizlerinin ön tarama aşamasında ya da kalite kontrol süreçlerinde tamamlayıcı bir araç olarak elektronik burun kullanımının mümkün

olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, EBC tabanlı analizlerde elektronik burun teknolojisinin entegrasyonu, yöntemin hem duyarlılığını hem de klinik uygulanabilirliğini artırabilecek multidisipliner bir araştırma alanı sunmaktadır.

EBC örneklerinin elde edilmesinde çeşitli sistemler kullanılmaktadır. EcoScreen, RTube, TurboDECCS ve Anacon gibi farklı ticari cihazlar bulunsa da bu sistemler temel olarak bir soğutma ünitesi ve toplama tüplerinden oluşmaktadır. Her bir sistemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bu çalışmada EBC toplama amacıyla Pilot Çalışma Seti 22 tercih edilmiş; TurboDECCS sisteminde kullanılan tek kullanımlık aparatlar ile örnekleme gerçekleştirilmiştir. Önümüzdeki yıllarda yoğunlaştırılmış soluk havası analizlerine yönelik çalışmaların artacağı ve bu yöntemin klinik uygulamalarda da yer bulacağı öngörülmektedir. Bu doğrultuda, EBC toplamak için tekrarlanabilir, mobil ve düşük maliyetli sistemlerin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Merkezimizde bu ihtiyaca yönelik olarak mobil ve tek kullanımlık bir cihaz geliştirme çalışmaları sürdürülmekte olup, ilgili patent başvuru süreci devam etmektedir.

Yoğunlaştırılmış soluk havası ile çalışmaların artmasına karşın bu yöntemin klinik uygulamaya geçebilmesi için bazı önemli kısıtlılıkların giderilmesi gerekmektedir. Bunların başında, EBC örneklerinin alım sürecine ilişkin bir standardizasyonun henüz sağlanamamış olması gelmektedir. Numune toplama cihazları, soluk süresi, çevresel koşullar ve depolama protokolleri gibi birçok değişken, analiz edilen DNA miktarını ve kalitesini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, bu alandaki metodolojik farklılıklar çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırılabilirliğini azaltmakta ve güvenilirliğini sınırlamaktadır. Gelecekte bu tekniklerin optimize edilmesi, örnekleme protokollerinin uluslararası düzeyde standardize edilmesi ve daha hassas analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ile fetal DNA tespitinde daha tutarlı ve doğru sonuçlar elde edilmesi mümkün olacaktır (90,119).

Çalışmamızın kısıtlılıklarından biri, yalnızca erkek fetüs taşıyan gebelerde çalışma yapılmış olmasıdır. Kız fetüs taşıyan gebelerde EBC analizlerinin yapılması ve SRY geninin negatif olarak gösterilmesi, analizlerimizin güvenilirliğini artıracaktır. Ayrıca fetal ultrasonografi ile erkek olarak değerlendirilen fetüslerin doğum sonrası erkek cinsiyette olduğu yalnızca fenotipik olarak doğrulanmıştır. Ancak cinsiyet gelişim bozuklukları gibi durumlar göz önünde bulundurulduğunda bu doğrulama yeterli olmayabilir. Doğum esnasında kordon kanı ya da doğum sonrasında bebeklerden plazma örnekleri alınarak Y kromozomunun saptanması elde edilen sonuçların doğruluğunu güçlendirecektir.

Non-invaziv genetik testlerin daha kolay, erişilebilir ve erken dönemde yapılabilir hale gelmesi, beraberinde bazı etik soruları da gündeme getirmektedir. Özellikle fetal cinsiyetin çok

erken dönemde belirlenmesi, bazı toplumsal baskılar ve etik dışı uygulamaları teşvik edebilir. Bu nedenle, EBC gibi örnekleme yöntemleriyle yapılan fetal DNA analizlerinin etik boyutu dikkatle değerlendirilmelidir. Testin amacı, zamanlaması ve bilgilendirilmiş onam süreçleri, bu teknolojilerin etik ve sorumlu bir şekilde uygulanmasını sağlayacak şekilde yapılandırılmalıdır (120).

Elde edilen bulgular cesaret verici olmakla birlikte, EBC'nin klinik kullanımı için bazı teknik engellerin aşılması gerekmektedir. Özellikle maternal nefeste fetal DNA'nın düşük yoğunlukta bulunması, dijital PCR ve yeni nesil dizileme (NGS) gibi yüksek hassasiyetli teknikleri zorunlu kılmaktadır. Ancak, mevcut teknolojinin sınırlamaları göz önünde bulundurulduğunda, gelecekte geliştirilecek daha ileri düzey PCR tabanlı sistemler ile bu hassasiyetin daha da artırılması mümkün olacaktır.

Alınan EBC örneklerinde hem maternal hem fetal DNA'nın bulunması, ayırt edilebilirliği zorlaştırmaktadır. Bu bağlamda DNA ekstraksiyon ve analiz yöntemlerinin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir. SRY dizilerinin tespit edilmesi önemli bir ilerleme olmakla birlikte, EBC'nin kromozomal anormallikler ve kalıtsal hastalıklar gibi diğer genetik bozuklukların saptanmasında da kullanılabilmesi için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu teknoloji daha da geliştirilip doğrulanırsa, erken ve güvenli prenatal tanıda devrim niteliğinde katkılar sağlayabilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada, gebelerin yoğunlaştırılmış soluk havası (EBC) örneklerinde hücre dışı serbest fetal DNA'nın (cffDNA) varlığı araştırılmış ve erkek fetüs taşıyan olguların %36,6'sında SRY geni başarıyla tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, EBC'nin fetal cinsiyet tayininde potansiyel bir non-invaziv örnekleme yöntemi olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.
- Maternal yaş, kilo, VKİ, gebelik haftası ve DNA konsantrasyonu gibi faktörlerin fetal fraksiyonu etkilediği bilinmekle birlikte, çalışmadaki veriler bu faktörlerle EBC'deki cffDNA tespiti arasında anlamlı ilişki göstermemiştir.
- Ancak EBC örneklerinin alımında standardizasyonun olmaması, DNA miktarının düşük olması ve maternal-fetal DNA ayırımının zorlukları, yöntemin klinik kullanımı önünde önemli engeller oluşturmaktadır.
- Kız fetüs taşıyan gebelerde EBC analizleri yapılarak negatif kontrol grubu oluşturulmalı, böylece testlerin özgüllüğü artırılmalıdır.
- Doğum sonrası bebeklerden plazma örnekleri alınarak genetik doğrulamalar yapılmalı, böylece prenatal tespitlerin güvenilirliği artırılmalıdır.
- EBC yöntemi ile kromozomal anormallikler ve genetik hastalıkların non-invaziv tanısına yönelik kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.
- Gelecekte yapılacak çalışmaların; örnekleme ve analiz protokollerinin standardize edilmesi, Y kromozomuna özgü farklı dizilerin kombine kullanımı ve daha hassas teknolojilerin entegrasyonu yönünde ilerlemesi önerilmektedir.
- Sonuç olarak, bu öncü çalışma soluk havası örneklerinin yalnızca solunum sistemi hastalıklarının tanısında değil, prenatal genetik tarama gibi disiplinler arası alanlarda da kullanılabilceğini göstermekte ve geleceğin tanısal yaklaşımlarına yönelik yeni ufuklar açmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Sachs L, Serr DM, Danon M. Analysis of Amniotic Fluid Cells for Diagnosis of Foetal Sex. *Br Med J* [Internet]. 1956 Oct 6 [cited 2025 Jan 27];2(4996):795. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2035329/>
2. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1984 Apr 1 [cited 2025 Jan 27];148(7):886–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6201071/>
3. Olney R, Moore C, Khoury M, ... JEM, 1995 undefined. Chorionic villus sampling and amniocentesis: recommendations for prenatal counseling. *cdc.gov* RS Olney, CA Moore, MJ Khoury, JD Erickson, LD Edmonds, LD Botto, HK Atrash MMWR: Recommendations and Reports, 1995•cdc.gov [Internet]. [cited 2025 Jan 28]; Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00038393.htm?pagewanted=all>
4. Levy B, Stosic M. Traditional Prenatal Diagnosis: Past to Present. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2019 [cited 2025 Jan 27];1885:3–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506187/>
5. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* [Internet]. 1969 [cited 2025 Jan 28];1(7606):1119–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4181601/>
6. Dennis Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* [Internet]. 1997 Aug 16 [cited 2025 Jan 28];350(9076):485–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274585/>
7. Beaudet AL. Using fetal cells for prenatal diagnosis: History and recent progress. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Jan 28];172(2):123–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27133782/>
8. Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI. [Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function)]. *Ter Arkh* [Internet]. 1980 Jan 1 [cited 2025 Jan 28];52(3):65–8. Available from: <https://europepmc.org/article/med/6892965>

9. Kubáň P, Foret F. Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal Chim Acta*. 2013 Dec 17;805:1–18.
10. Hunt J. Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2002 [cited 2025 Jan 28];110(1):28–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12110814/>
11. Horváth I, Lázár Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur Respir J* [Internet]. 2009 Jul [cited 2025 Jan 28];34(1):261–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19567608/>
12. Hunt J. Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2002 [cited 2025 Jan 28];110(1):28–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12110814/>
13. Dixit K, Fardindoost S, Ravishankara A, Tasnim N, Hoorfar M. Exhaled Breath Analysis for Diabetes Diagnosis and Monitoring: Relevance, Challenges and Possibilities. *Biosensors (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Jan 29];11(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34940233/>
14. Krishnan ST, Devadhasan JP, Kim S. Recent analytical approaches to detect exhaled breath ammonia with special reference to renal patients. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2025 Jan 29];409(1):21–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27595582/>
15. Marcondes-Braga FG, Batista GL, Bacal F, Gutz I. Exhaled Breath Analysis in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Jan 29];13(4):166–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27287200/>
16. Hui L, Bianchi DW. Cell-free fetal nucleic acids in amniotic fluid. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2011 May [cited 2025 Jan 29];17(3):362–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20923874/>
17. Majer S, Bauer M, Magnet E, Strele A, Giegerl E, Eder M, et al. Maternal urine for prenatal diagnosis--an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenat Diagn* [Internet]. 2007 Dec [cited 2025 Jan 29];27(13):1219–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17968856/>

18. Angert RM, LeShane ES, Yarnell RW, Johnson KL, Bianchi DW. Cell-free fetal DNA in the cerebrospinal fluid of women during the peripartum period. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Apr 1;190(4):1087–90.
19. Dolk H, Loane M, Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2010 [cited 2025 Feb 17];686:349–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20824455/>
20. Diagnosis P, Yüreğir ÖÖ, Büyükkurt S, Koç F, Pazarbaşı A, Numune A, et al. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi Archives Medical Review Journal Prenatal (Doğum Öncesi) Tanı. *Archives Medical Review Journal*. 2012;21(1):80–94.
21. Tchirikov M, Arnold C, Oshovskyy V, Heinrich UR, Thäle V. Three years' experience of using a 29-gauge atraumatic needle for amniocentesis. *J Perinat Med* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2025 Feb 17];40(4):413–7. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jpm-2011-0224/html>
22. Marton U, Kurjak A, Stanojević M. Chorionic Villus Sampling. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* [Internet]. 2022 Dec 11 [cited 2025 Feb 17];18(1):45–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563301/>
23. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics and gynecology* [Internet]. 2007 Sep [cited 2025 Feb 17];110(3):687–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17766619/>
24. Palomaki GE, Knight GJ, Ashwood ER, Best RG, Haddow JE. Screening for down syndrome in the United States: results of surveys in 2011 and 2012. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2013 Jul [cited 2025 Feb 17];137(7):921–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23808464/>
25. WALD NJ, CUCKLE HS, DENSEM JW, KENNARD A, SMITH D. Maternal serum screening for Down's syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight. *BJOG* [Internet]. 1992 Feb 1 [cited 2025 Feb 17];99(2):144–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-0528.1992.tb14474.x>
26. Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2025 Feb 18];37(1):116–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20842655/>

27. Li Y, Hua Y, Fang J, Wang C, Qiao L, Wan C, et al. Performance of different scan protocols of fetal echocardiography in the diagnosis of fetal congenital heart disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jun 4 [cited 2025 Feb 19];8(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23750263/>
28. Falip C, Hornoy P, Millischer Bellaïche AE, Merzoug V, Adamsbaum C. [Fetal cerebral magnetic resonance imaging (MRI). Indications, normal and pathological patterns]. *Rev Neurol (Paris)* [Internet]. 2009 Nov [cited 2025 Feb 19];165(11):875–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19298991/>
29. Gadsbøll K, Petersen OB, Gatinois V, Strange H, Jacobsson B, Wapner R, et al. Current use of noninvasive prenatal testing in Europe, Australia and the USA: A graphical presentation. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2025 Feb 25];99(6):722–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aogs.13841>
30. Lapaire O, Holzgreve W, Oosterwijk JC, Brinkhaus R, Bianchi DW. Georg Schmorl on Trophoblasts in the Maternal Circulation. *Placenta*. 2007 Jan 1;28(1):1–5.
31. DOUGLAS GW, THOMAS L, CARR M, CULLEN NM, MORRIS R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1959 Nov 1 [cited 2025 Feb 19];78(5):960–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13817823/>
32. Cheng WL, Hsiao CH, Tseng HW, Lee TP. Noninvasive prenatal diagnosis. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2025 Feb 19];54(4):343–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384048/>
33. Huang Z, Fong CY, Gauthaman K, Sukumar P, Choolani M, Bongso A. Novel approaches to manipulating foetal cells in the maternal circulation for non-invasive prenatal diagnosis of the unborn child. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2025 Feb 19];112(6):1475–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.23084>
34. Singh R, Hatt L, Ravn K, Vogel I, Petersen OB, Uldbjerg N, et al. Fetal Cells in Maternal Blood For Prenatal Diagnosis: A Love Story Rekindled. *Biomark Med* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2025 Feb 19];11(9):705–10. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2217/bmm-2017-0055>
35. MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 Feb 1;142(3–4):241–3.

36. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* [Internet]. 1977 [cited 2025 Feb 19];37(3):646–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/837366/>
37. Dennis Lo YM. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: An Overview. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2025 Feb 19];945(1):1–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03858.x>
38. Van Der Vaart M, Pretorius PJ. The Origin of Circulating Free DNA. *Clin Chem* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2025 Feb 19];53(12):2215–2215. Available from: <https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.092734>
39. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*. 2001 Nov 1;313(1–2):139–42.
40. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1998 [cited 2025 Feb 22];62(4):768. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1377040/>
41. Bianchi DW. Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential—A Review. *Placenta*. 2004 Apr 1;25(SUPPL. A):S93–101.
42. Bianchi D, LeShane E, Chemistry JCC, 2001 undefined. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *academic.oup.com*DW Bianchi, ES LeShane, JM Cowan *Clinical Chemistry*, 2001•*academic.oup.com* [Internet]. [cited 2025 Feb 22]; Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/47/10/1867/5639308>
43. Rather RA, Saha SC. Reappraisal of evolving methods in non-invasive prenatal screening: Discovery, biology and clinical utility. *Heliyon* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Feb 27];9(3):e13923. Available from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S2405844023011301>
44. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Wiley Online Library*E Wang, A Batey, C Struble, T Musci, K Song, A Oliphant *Prenatal diagnosis*, 2013•*Wiley Online Library* [Internet]. 2013 Jul [cited 2025 Feb 22];33(7):662–6. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pd.4119>

45. Dennis Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Magnus Hjelm N. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1999 [cited 2025 Feb 22];64(1):218–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9915961/>
46. Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, et al. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn* [Internet]. 2005 Dec 15 [cited 2025 Feb 22];25(12):1111–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.1284>
47. Chitty L, Chatelain P, ... KWJ of P, 2012 undefined. Prenatal management of disorders of sex development. Elsevier [Internet]. [cited 2025 Feb 22]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1477513112002483?casa_token=80Tyi0on99kAAAAA:qrNkCrtsQSSbdjZj8EHra1NZaJ2BxxL3eYWZ8tz8xzS-d0UfCDXH80r_KtNt8OhwejjUthLtxHo
48. Drury S, Hill M, Chitty LS. Cell-Free Fetal DNA Testing for Prenatal Diagnosis. *Adv Clin Chem*. 2016 Jan 1;76:1–35.
49. Chan V, Lau K, Yip B, Sin S, ... MC prenatal, 1998 undefined. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *thelancet.com* V Chan, K Lau, B Yip, SY Sin, MC Cheung, YW Kan prenatal diagnosis, 1998•*thelancet.com* [Internet]. [cited 2025 Feb 22]; Available from: <https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140673605605351.pdf>
50. Finning K, Martin P, Soothill P, Transfusion NA, 2002 undefined. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. Wiley Online Library KM Finning, PG Martin, PW Soothill, ND Avent Transfusion, 2002•Wiley Online Library [Internet]. 2002 [cited 2025 Feb 22];42(8):1079–85. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1537-2995.2002.00165.x?casa_token=46oTy7J7I-8AAAAA:K3i7bWawcYhd8H_zLlb6cgdcH20yu1jPJMRKHsXsS8z-YyFQCUTa4x2zcdufdVaSygMdBSYucNucCoY
51. Redman CWG. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* [Internet]. 1991 [cited 2025 Feb 22];12(4):301–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1946241/>

52. Lo Y, Leung T, Tein M, ... ISC, 1999 undefined. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *academic.oup.com* YMD Lo, TN Leung, MSC Tein, IL Sargent, J Zhang, TK Lau, CJ Haines, CWG Redman *Clinical chemistry*, 1999•*academic.oup.com* [Internet]. [cited 2025 Feb 22]; Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/45/2/184/5642816>
53. Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2025 Feb 22];8(6):501–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/humupd/8.6.501>
54. Chitty LS, Griffin DR, Meaney C, Barrett A, Khalil A, Pajkrt E, et al. New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2025 Feb 23];37(3):283–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/uog.8893>
55. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal Diagnosis of Myotonic Dystrophy Using Fetal DNA Obtained from Maternal Plasma. *Clin Chem* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2025 Feb 23];46(2):301–2. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/clinchem/46.2.301>
56. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez De Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2025 Feb 23];22(10):946–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.439>
57. Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DHK, Dennis Lo YM. Prenatal exclusion of β thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* [Internet]. 2002 Sep 28 [cited 2025 Feb 23];360(9338):998–1000. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673602110865/fulltext>
58. Zhong XY, Èrk MRB, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. [cited 2025 Feb 23]; Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0223>
59. Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, et al. Evaluation of Cell-free Fetal DNA as a Second-Trimester Maternal Serum Marker of

- Down Syndrome Pregnancy. *Clin Chem* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2025 Feb 23];49(2):239–42. Available from: <https://dx.doi.org/10.1373/49.2.239>
60. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Oct 21 [cited 2025 Feb 23];105(42):16266–71. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0808319105>
 61. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2025 Feb 23];45(5):530–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/uog.14792>
 62. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2025 Feb 23];50(3):302–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/uog.17484>
 63. Futch T, Spinoso J, Bhatt S, de Feo E, Rava RP, Sehnert AJ. Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2025 Feb 23];33(6):569–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4123>
 64. Dharajiya NG, Grosu DS, Farkas DH, McCullough RM, Almasri E, Sun Y, et al. Incidental Detection of Maternal Neoplasia in Noninvasive Prenatal Testing. *Clin Chem* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2025 Feb 23];64(2):329–35. Available from: <https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2017.277517>
 65. Vora NL, Johnson KL, Basu S, Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S, Bianchi DW. A multi-factorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Sep [cited 2025 Feb 23];32(9):912. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3432738/>
 66. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, van den Boom D, Ehrich M, Deciu C, et al. Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2025 Feb 23];35(3):289–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4541>

67. İnvaziv Olmayan Doğum Öncesi Test | ACOG [Internet]. [cited 2025 Feb 23]. Available from: https://www.acog.org/advocacy/policy-priorities/non-invasive-prenatal-testing?utm_source=chatgpt.com
68. Odeh M, Grinin V, Kais M, Ophir E, Bornstein J. Sonographie fetal sex determination. *Obstet Gynecol Surv* [Internet]. 2009 Jan [cited 2025 Mar 7];64(1):50–7. Available from: https://journals.lww.com/obgynsurvey/fulltext/2009/01000/sonographic_fetal_sex_determination.22.aspx
69. Hughes JF, Page DC. The biology and evolution of the human Y chromosome. *Annu Rev Genet*. 2015;507–27.
70. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn* [Internet]. 2001 [cited 2025 Mar 7];21(12):1070–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11746166/>
71. Wright CF, Wei Y, Higgins JP, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes* [Internet]. 2012 [cited 2025 Mar 7];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22937795/>
72. Fernández-Martínez FJ, Galindo A, Garcia-Burguillo A, Vargas-Gallego C, Nogués N, Moreno-García M, et al. Noninvasive fetal sex determination in maternal plasma: a prospective feasibility study. *Genetics in Medicine* 2012 14:1 [Internet]. 2012 Jan 5 [cited 2025 Mar 7];14(1):101–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/gim20118>
73. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today’s biology. *Nature Methods* 2008 5:1 [Internet]. 2007 Dec 19 [cited 2025 Feb 25];5(1):16–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth1156>
74. Jayashankar SS, Nasaruddin ML, Hassan MF, Dasrilsyah RA, Shafiee MN, Ismail NAS, et al. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT): Reliability, Challenges, and Future Directions. *Diagnostics* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Feb 25];13(15):2570. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10417786/>
75. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008

- Dec 23 [cited 2025 Feb 25];105(51):20458–63. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073917/>
76. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, et al. Non-invasive prenatal aneuploidy testing at chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* [Internet]. 2012 Dec [cited 2025 Feb 25];32(13):1233. Available from:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3548605/>
 77. Çitli Ş, Köksal B, Kurtulgan H, Akkuş N, Özdemir Ö, Sezgin İ. Prenatal dönemde multiplex kantitatif fluoresan pcr (QF-PCR) tekniği ile yaygın kromozomal anoploidilerin tespiti: Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi deneyimi. *Cumhuriyet Medical Journal* [Internet]. 2011 Apr 25 [cited 2025 Feb 27];33(4):389–95. Available from: <http://cmj.cumhuriyet.edu.tr/en/pub/cmj/issue/4219/55978>
 78. Lench N, Barrett A, Fielding S, McKay F, Hill M, Jenkins L, et al. The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2025 Feb 27];33(6):555–62. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4124>
 79. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem* [Internet]. 2011 Nov 15 [cited 2025 Mar 8];83(22):8604. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3216358/>
 80. Jenkins LA, Deans ZC, Lewis C, Allen S. Delivering an accredited non-invasive prenatal diagnosis service for monogenic disorders and recommendations for best practice. *Prenat Diagn* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2025 Feb 25];38(1):44–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.5197>
 81. Alberry MS, Aziz E, Ahmed SR, Abdel-fattah S. Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2021 Mar 1;258:424–9.
 82. Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *The Lancet* [Internet]. 2019 Feb 23 [cited 2025 Feb 26];393(10173):747–57. Available from:
<https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S0140673618319408>

83. Popov TA. Human exhaled breath analysis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2011 Jun 1;106(6):451–6.
84. Yıldırım N. Solunum Sistemi Klinik Fizyolojisi. *Toraks Cerrahisi Bülteni* [Internet]. 2017 [cited 2025 Mar 1]; Available from: https://toraks.org.tr/site/sf/books/pre_migration/f067f94facbf084c01a29889c7385c4f1e7a14a760705e79e68dae1bfc535d34.pdf
85. Kita K, Gawinowska M, Chełmińska M, Niedożytko M. The Role of Exhaled Breath Condensate in Chronic Inflammatory and Neoplastic Diseases of the Respiratory Tract. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Jul 1 [cited 2025 Mar 1];25(13):7395. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11242091/>
86. Bondesson E, Jansson LT, Bengtsson T, Wollmer P. Exhaled breath condensate—site and mechanisms of formation. *J Breath Res* [Internet]. 2009 Mar 12 [cited 2025 Mar 1];3(1):016005. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7155/3/1/016005>
87. Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, et al. Combined Use of Exhaled Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Monitoring Asthma. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.15849710091> [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2025 Mar 1];158(4):1042–6. Available from: www.atsjournals.org
88. Fairchild CI, Stampfer JF. Particle Concentration in Exhaled Breath. *Am Ind Hyg Assoc J* [Internet]. 1987 [cited 2025 Mar 1];48(11):948–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15298668791385868>
89. Gessner C, Kuhn H, Seyfarth HJ, Pankau H, Winkler J, Schauer J, et al. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* [Internet]. 2001 [cited 2025 Mar 2];55(9):414–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11536064/>
90. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* [Internet]. 2005 Sep [cited 2025 Jan 28];26(3):523–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16135737/>
91. Połomska J, Bar K, Sozańska B. Exhaled Breath Condensate—A Non-Invasive Approach for Diagnostic Methods in Asthma. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2025 Mar 2];10(12):2697. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8235112/>

92. Zamuruyev KO, Borrás E, Pettit DR, Aksenov AA, Simmons JD, Weimer BC, et al. Effect of temperature control on the metabolite content in exhaled breath condensate. *Anal Chim Acta*. 2018 May 2;1006:49–60.
93. Konstantinidi EM, Lappas AS, Tzortzi AS, Behrakis PK. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *The Scientific World Journal* [Internet]. 2015 [cited 2025 Mar 3];2015:435160. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4461795/>
94. Piotrowski WJ, Antczak A, Marczak J, Nawrocka A, Kurmanowska Z, Górski P. Eicosanoids in Exhaled Breath Condensate and BAL Fluid of Patients With Sarcoidosis. *Chest*. 2007 Aug 1;132(2):589–96.
95. Sinues PML, Zenobi R, Kohler M. Analysis of the Exhalome: A Diagnostic Tool of the Future. *Chest*. 2013 Sep 1;144(3):746–9.
96. Antus B, Barta I, Kullmann T, Lazar Z, Valyon M, Horvath I, et al. Assessment of Exhaled Breath Condensate pH in Exacerbations of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0451OC> [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2025 Mar 3];182(12):1492–7. Available from: www.atsjournals.org
97. Teng Y, Sun P, Zhang J, Yu R, Bai J, Yao X, et al. Hydrogen Peroxide in Exhaled Breath Condensate in Patients with Asthma: A Promising Biomarker? *Chest*. 2011 Jul 1;140(1):108–16.
98. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and Analysis of Exhaled Breath Condensate in Humans. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.16452101032> [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2025 Mar 3];164(5):731–7. Available from: www.atsjournals.org
99. Cunningham S, McColm JR, Ho LP, Greening AP, Marshall TG. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2025 Mar 3];15(5):955–7. Available from: <https://publications.ersnet.org/content/erj/15/5/955>
100. Campanella A, De Summa S, Tommasi S. Exhaled breath condensate biomarkers for lung cancer. *J Breath Res* [Internet]. 2019 Aug 20 [cited 2025 Mar 3];13(4):044002. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7163/ab2f9f>
101. Rolla G, Bruno M, Bommarito L, Heffler E, Ferrero N, Petrarulo M, et al. Breath analysis in patients with end-stage renal disease: effect of haemodialysis. *Eur J Clin*

- Invest [Internet]. 2008 Oct [cited 2025 Mar 5];38(10):728–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18837798/>
102. Nielepkowicz-Goździńska A, Fendler W, Robak E, Kulczycka-Siennicka L, Górski P, Pietras T, et al. Exhaled IL-8 in systemic lupus erythematosus with and without pulmonary fibrosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2014 [cited 2025 Mar 5];62(3):231–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24492930/>
 103. Desai A, Tankasala D, Ng GP, Thakkar P, Hoilett OS, Mather KJ, et al. Selective Collection of Exhaled Breath Condensate for Noninvasive Screening of Breath Glucose. *J Diabetes Sci Technol* [Internet]. 2025 Jan 1 [cited 2025 Mar 5];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37401788/>
 104. Pilot Study Kit 22 for EBC Sampling | Medivac [Internet]. [cited 2025 Mar 8]. Available from: <https://www.medivac.it/pilot-study-kit-22-for-ebc-sampling/>
 105. Tetik Vardarli A, Pelit L, Aldag C, Korba K, Celebi C, Dizdas TN, et al. *Concordance in molecular genetic analysis of tumour tissue, plasma, and exhaled breath condensate samples from lung cancer patients. *J Breath Res* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2025 Mar 8];14(3):036001. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7163/ab739b>
 106. Yang S, He Y, Lv J, Li R, Fu X. The evolution of cell-free fetal DNA testing: expanded non-invasive prenatal testing and its effect on target populations. *Front Med (Lausanne)*. 2025 Jan 21;12:1522680.
 107. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:6 [Internet]. 2011 May 12 [cited 2025 May 15];11(6):426–37. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3066>
 108. Tıplamaz S, Eyüboğlu İP, Ünal C, Soyer Ö, Beksaç MS, Akkiprik M. Presence of fetal DNA in maternal exhaled breath condensate. *Prenat Diagn*. 2023 Jan 1;43(1):28–35.
 109. Hou Y, Yang J, Qi Y, Guo F, Peng H, Wang D, et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction: statistical analysis of 13,661 maternal plasmas for non-invasive prenatal screening. *Hum Genomics* [Internet]. 2019 Dec 4 [cited 2025 May 23];13(1):62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31801621/>
 110. Hestand MS, Bessem M, van Rijn P, de Menezes RX, Sie D, Bakker I, et al. Fetal fraction evaluation in non-invasive prenatal screening (NIPS). *European Journal of*

- Human Genetics [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2025 May 23];27(2):198–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30254213/>
111. Kinnings SL, Geis JA, Almasri E, Wang H, Guan X, Mccullough RM, et al. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2025 May 23];35(8):816–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26013964/>
 112. Qiao L, Yu B, Liang Y, Zhang C, Wu X, Xue Y, et al. Sequencing shorter cfDNA fragments improves the fetal DNA fraction in noninvasive prenatal testing. *Am J Obstet Gynecol*. 2019 Oct 1;221(4):345.e1-345.e11.
 113. Hui L, Maron JL, Gahan PB. Other body fluids as non-invasive sources of cell-free DNA/RNA. *Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine* [Internet]. 2015 [cited 2025 May 23];5:295–323. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-9168-7_11
 114. Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1 [Internet]. 2020 Aug 3 [cited 2025 May 27];5(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00258-9>
 115. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, et al. Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus. *PLoS One* [Internet]. 2011 Aug 24 [cited 2025 May 28];6(8):e23925. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3161072/>
 116. Pattnaik B, PB S, Bhatraju N, Mittal S, Arava S, Jain D, et al. Utility of microRNA analysis in exhaled breath condensate of sarcoidosis and mediastinal tuberculosis patients: a pilot study. *ERJ Open Res* [Internet]. 2024 Sep 29 [cited 2025 May 28];10(5):00078–2024. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11440382/>
 117. Lucca L de, Gallarreta FMP, Gonçalves T de L. Oxidative Stress Markers in Pregnant Women with Preeclampsia. *American Journal of Medical and Biological Research*, Vol 3, 2015, Pages 68-73 [Internet]. 2015 Jun 3 [cited 2025 May 28];3(3):68–73. Available from: <https://pubs.sciepub.com/ajmbr/3/3/1/index.html>
 118. Bikov A, Pako J, Kovacs D, Tamasi L, Lazar Z, Rigo J, et al. Exhaled breath volatile alterations in pregnancy assessed with electronic nose. *Biomarkers* [Internet]. 2011 Sep

[cited 2025 May 27];16(6):476–84. Available from:

<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/1354750X.2011.598562>

119. Horváth I, Barnes PJ, Loukides S, Sterk PJ, Högman M, Olin AC, et al. A european respiratory society technical standard: Exhaled biomarkers in lung disease. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2025 May 20];49(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28446552/>
120. De Jong A, Dondorp WJ, De Die-Smulders CEM, Frints SGM, De Wert GMWR. Non-invasive prenatal testing: ethical issues explored. *European Journal of Human Genetics* [Internet]. 2009 Mar [cited 2025 May 28];18(3):272. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2987207/>



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi (2 Sayfa)



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel : 0 232 390 2134 e-mail: egetaek@gmail.com

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gebelerde Soluk Havasından Elde Edilen Biyolojik Materyalde Fetal DNA Tayini
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. MUHSİN ÖZGÜR ÇOĞULU
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Dr. Öğr. Üyesi SU ÖZGÜR Prof. Dr. CUMHUR GÜNDÜZ Doc. Dr. ASLI TETİK VARDARLI Dr. ERKAM DOLAPCI Doc. Dr. İSMET HORTU Doc. Dr. MUSTAFA NURİ DENİZ Uz. Dr. TÜRKAN TAN Dr. Öğr. Üyesi ASUMAN SARGIN Doc. Dr. TAHİR ATİK Doc. Dr. ESRA İŞİK
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
DESTEKLEYİCİ	BAP
ARAŞTIRMA TİPİ	Niceliksel Analitik Kohort

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 24-7T/75	Tarih: 11.07.2024
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna toplantıya katılan etik kurul üyelerince Oy birliği ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyî Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ceyda Kabaroğlu					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doc. Dr. Fatma Sert Başkan	Radyasyon Onkolojisi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Ceyda Kabaroğlu Başkan	Tıbbi Biyokimya	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Yasemin Yıldırım Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. Aysun Ekşioğlu Raportör	Ebelik A.D.	Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Anabilim Dalı	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Ceyda Kabaroğlu		Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05		



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel : 0 232 390 2134 e-mail: egetaek@gmail.com

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Prof. Dr. Aliye Mandracioğlu Üye	Halk Sağlığı A.D.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Mehmet Çağdaş Eker Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Cengiz Çavuşoğlu Üye	Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	Hayır	Hayır	İzinli (Görevli)
Prof. Dr. Oya Türkoğlu Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji A.D.	K	Hayır	Hayır	Katılmadı
Prof. Dr. Şafak Dağhan Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği A.D.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Yasemin Eraç Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Gülbin Rudarlı Üye	Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD.	K	Hayır	Hayır	İzinli (Görevli)
Doc. Dr. Serhad Nalçacı Üye	Göz Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	Hayır	Hayır	İzinli (Görevli)
Doc. Dr. Tahir Atik Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.D.	E	Hayır	Hayır	Katılmadı
Doc. Dr. Fatih Oltulu Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	E	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. Nur Soyer Üye	Hematoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. Zümrüt Şahbudak Bal Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalı	Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalı	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. ALİ TEKİN Üye	Çocuk Cerrahisi/Çocuk Ürolojisi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi A.D.	E	Hayır	Evet	Online Katıldı

Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Ceyda Kabaroglu	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05
---	----------------------------------	------------------	---------------------------------------

Ek 2. Olgu Rapor Formu

Gebelerde Soluk Havasından Elde Edilen Biyolojik Materyalde Fetal DNA Tayini

Tarih:

OLGU RAPOR FORMU

1) Yaş:

2) Bebek Cinsiyet:

Kız

Erkek

3) Gebelik Haftası:

4) Doğum Şekli:

NSVY

C/S

5) Annenin Ek Hastalığı:

Yok

Var

.....

6) İkili test:

Yok

Var

.....

Üçlü test:

Yok

Var

.....

7) Prenatal genetik tanı:

Yok

Var

.....

8) Amniyosentez:

Yok

Var

.....

9) Koryon Villus Örnekleme:

Yok

Var

.....

10) Soluk havasından elde edilen materyal miktarı (cc):

11) İzole edilen DNA miktarı:

12) Yapılan Genetik Değerlendirme:

- QF-PCR
- Sanger Dizi Analizi
- NGS
- dd-PCR

13) Değerlendirme Sonucu:

Ek 3. Gönüllü Onam Formu (3 Sayfa)

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU	
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!	
Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.	
Bu çalışmanın adı ne?	Gebelerde Soluk Havasından Elde Edilen Biyolojik Materyalde Fetal DNA Tayini
Bu çalışmanın amacı ne?	Gebelerin soluk havasında, anne karnındaki bebeğe ait bazı genetik materyaller olduğu düşünülmektedir. Gebelerin soluk havasından sıvı halde örnek elde edilecektir. Bu sıvı örnekten yapılacak tetkiklerle, gebelerin soluk havasında anne karnındaki bebeğe ait genetik materyal varlığı tayin edilmeye çalışılacaktır. Bu sayede doğum öncesinde bebeğe ait genetik tetkiklerin çalışılabileceği yeni bir yöntem geliştirilmesine temel oluşturmak amaçlanmıştır.
Size nasıl bir uygulama yapılacak?	Dışı buzla kaplı örnek toplama kabı içerisine bir hat vasıtasıyla nefesinizi vermeniz yeterli olacaktır. Bu esnada verdiğiniz soluk havasının yoğunlaşması ve sıvı bir materyal elde edilmesi sağlanacaktır.
Farklı tedaviler için araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı nedir?	Tedavinizi etkileyecek bir uygulama yapılmayacaktır.
Ne kadar zamanınızı alacak?	15 dakika
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı kaçtır?	30
Sizden alınacak biyolojik materyallere (kan, idrar ve doku örnekleriniz) ne olacak ve analizler nerede yapılacak? (Analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceği açıklanmalı),	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı
Sizden beklenen nedir? Sizin sorumluluklarınız nelerdir?	Teminini sağladığımız örnek toplama kabına uzanan bir hat vasıtasıyla, 15 dk süresince kap içerisine nefes vermek. Bu sayede soluk havasından örnek elde edilmesine yardımcı olmak. Herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır.
Çalışmaya katılmak size ne yarar sağlayacak?	Çalışma esnasında size bir yarar sağlamayacaktır. Bu çalışmanın bilime katkısı sayesinde, sonraki gebeliklerinizde bebeğinizde genetik hastalık şüphesi gelişmesi durumunda herhangi bir girişimsel işleme gerek duyulmaksızın doğacak bebeğinize genetik değerlendirme yapılma imkanı ortaya çıkabilecektir.
Araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar nelerdir?	Yoktur
Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar verebilir mi?	Hayır, tanı ve tedavi sürecinde herhangi bir farklılık olmayacak.
Eğer katılmak istemezseniz ne olur?	Çalışmaya katılmak istemezseniz veya çalışmaya katılmanız halinde, çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmak isterseniz, ceza almayacaksınız, hiçbir hukuki yaptırımla karşılaşmayacaksınız veya çalışmaya başlamadan önce sahip olduğunuz haklarınızı kaybetmeyeceksiniz. Verileriniz kullanılmayacaktır.
Size uygulanabilecek olan alternatif yöntemler nelerdir?	Tanı ve tedavi sürecinde herhangi bir farklılık olmayacak.

Bu çalışmaya katıldığım için bana herhangi bir ücret ödenecek mi?

Hayır

Bu çalışmaya katıldığım için ben herhangi bir ücret ödeyecek miyim?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Bu çalışmada size ait hangi kişisel veriler ve kişisel sağlık verileri kullanılacaktır?

Bu çalışmada sizin yaşınız, doğacak bebeğinizin cinsiyeti, doğum haftası, doğum şekli, ikili/üçlü test yapılıp yapılmadığı, bebeğiniz anne karnında iken yapıldıysa genetik tetkik sonuçları kullanılacaktır.

Bilgilerin gizliliği:

Tüm kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli kalacak, sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır. Kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır. Araştırma kapsamında toplanacak kişisel verilerin, 6698 sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu'na uygun toplanıp işlenecek, toplama/işleme amacından başka bir amaç için kullanılmayacak ve paylaşılmayacak, gönüllünün oluru geri çekmesi, araştırmanın sonlanması veya kişisel verilerin işlenmesinin son bulmasıyla veriler imha edilecek ve toplanan kişisel verilerin destekleyici, sözleşmeli araştırma kuruluşları ve iştirakleri ile paylaşılmayacak, söz konusu hizmet, Kişisel Sağlık Verileri Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu ve yürürlükteki mevzuata uygun yürütülecektir.

Bu çalışmanın sorumlusunun iletişim bilgileri

1- Adı, soyadı:

MUHSİN ÖZGÜR ÇOĞULU

2- Ulaşılabilir telefon numarası:

■■■■■■■■■■

3- Görev yeri:

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Klinik araştırma kapsamında elde edilen tüm kişisel verilerim ile tüm kişisel sağlık verilerimin, bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. "Bilgilerin gizliliği" başlığı altında belirtilen koşulları kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.


Bilgilendirilmiş gönüllü olurunun imzalı ve tarihli bir kopyasının bana verileceğini biliyorum.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TELEFON		
TARİH		

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TELEFON		
TARİH		


Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TELEFON		
TARİH		


Ek 4. Tez Çalışması Orijinallik Raporu (5 Sayfa)


 Sayfa 1 of 52 - Kapak Sayfası Gönderi Kimliği trn:oid::1:3257131309

Erkam DOLAPÇI

Gebelerde Soluk Havaşından Elde Edilen Biyolojik Materyalde Fetal DNA Tayini


 Özofagus Replasmanında Açık ve Kapalı (Laparoskopik veya Robotik) Gastrik Transpozisyon Sonuçlarının Karşılaştırılması

 UZMANLIK TEZLERİ

 Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3257131309	47 Sayfa
Gönderi Tarihi 22 May 2025 11:21 GMT+3	9.071 Sözcük
İndirme Tarihi 22 May 2025 11:39 GMT+3	61.126 Karakter
Dosya Adı Erkam_Dolapci_Tez_benzenes_im.docx	
Dosya Boyutu 528.5 KB	




 Sayfa 1 of 52 - Kapak Sayfası Gönderi Kimliği trn:oid::1:3257131309

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

7% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 5%  İnternet kaynakları
- 4%  Yayınlar
- 3%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları




İnceleme için 0 Bütünlük Bayrağı

Herhangi bir şüpheli metin manipülasyonu belirlenmedi.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark ederseniz incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 5%  İnternet kaynakları
- 4%  Yayınlar
- 3%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Ön Sıradaki Kaynaklar

Gönderi içinde en yüksek eşleşme sayısına sahip kaynaklar. Çakışan kaynaklar görüntülenmeyecektir.

1	Öğrenci makaleleri	Ege Üniversitesi	<1%
2	İnternet	acikbilim.yok.gov.tr	<1%
3	Yayın	Kivançlı, İçten. "24-28. Gebelik Haftalarında Doppler Akım Değişiklikleri ile Mater...	<1%
4	Öğrenci makaleleri	Marmara University	<1%
5	İnternet	www.researchgate.net	<1%
6	İnternet	dergipark.org.tr	<1%
7	İnternet	www.doktortakvimi.com	<1%
8	Öğrenci makaleleri	University of Cape Town	<1%
9	İnternet	clinlabint.com	<1%
10	İnternet	www.utsakcongress.com	<1%
11	Öğrenci makaleleri	Bülent Ecevit Üniversitesi	<1%

12	Yayın	Doruk Cevdi KATLAN, Feride SÖYLEMEZ. "Cell-Free Fetal DNA in Prenatal Screenin...	<1%
13	Öğrenci makaleleri	Baskent University	<1%
14	İnternet	tahek.esfam.org	<1%
15	İnternet	uroturk.org.tr	<1%
16	İnternet	www.rusmedreview.com	<1%
17	İnternet	dspace.ankara.edu.tr	<1%
18	İnternet	pdfs.semanticscholar.org	<1%
19	Yayın	Aral, Cenk. "Mitokondriyal DNA degisimlerinin Kanseri İle İlişkinin Arastirilmesi..."	<1%
20	İnternet	behcetuzdergisi.com	<1%
21	Yayın	Yılmaz, Demet. "MTNR1B Geni Nükleotit Polimorfizmlerinin Nonalkolik Yağlı Kara..."	<1%
22	İnternet	avesis.ankara.edu.tr	<1%
23	İnternet	jawoo.com	<1%
24	İnternet	www.egitimajansi.com	<1%
25	Yayın	Alexander K. Hafez, Amber J. Zimmerman, Grigorios Papageorgiou, Jayapriya Cha...	<1%

26	Yayın	Ataca, Evrim. "Ras Mutant Metastatik Kolorektal Kanserli Hastaların Retrospektif ...	<1%
27	İnternet	koreascience.or.kr	<1%
28	İnternet	kuey.net	<1%
29	İnternet	www.ndsl.kr	<1%
30	Yayın	Kaplan, Ayşe. "Gümüş Nitrat, Titanyum Oksit Ve Demirli Bileşikler İle Nanopartikül ...	<1%
31	Yayın	L. Curiel. "1.5-D high intensity focused ultrasound array for non-invasive prostate ...	<1%
32	İnternet	acikerisim.aku.edu.tr	<1%
33	İnternet	docplayer.biz.tr	<1%
34	Yayın	"EUROANAESTHESIA 2006: Annual Meeting of the European Society of Anaesthesi ...	<1%