



**T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TARAMA TESTLERİ İLE GEBELİKTE ANÖPLOİDİ
RİSKİNİN BELİRLENMESİ VE KANTİTATİF FLORESAN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
PRENATAL TANISI**

Dr. Zeliha Özen GÜÇLÜTÜRK

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK

ADANA- 2011



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TARAMA TESTLERİ İLE GEBELİKTE ANÖPLOİDİ
RİSKİNİN BELİRLENMESİ VE KANTİTATİF FLORESAN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
PRENATAL TANISI**

Dr. Zeliha Özen GÜÇLÜTÜRK

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK

**TF2009LTP25
ADANA-2011**

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve eğitimim sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, hoşgörüsüyle bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her konuda bana destek olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten DİKMEN, Prof. Dr. Kıymet AKSOY, Prof. Dr. Abdullah TULİ ve Prof. Dr. Levent KAYRIN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Prof. Dr. Refik BURGUT'a teşekkür ederim.

Tezime desteklerinden dolayı Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarındaki eğitim sürem boyunca ve tez çalışmalarımda bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Uz. Dr. Ertuğrul KAHRAMAN ve tüm merkez laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri, asistanları ve tüm personeline örneklerin temini konusunda katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitimimdeki değerli katkılarından dolayı, Doç. Dr. Tamer C. İNAL'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşlarım, Dr. Gülçin DAĞLIOĞLU, Dr. Asuman ERASLAN, Dr. Murat TAHİROĞLU, Dr. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ ve Arş. Gör. Duygu DÜZGÜNCE BOĞA'ya teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı asistan, teknisyen ve tüm personeline teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman yanımda olan çok sevdiğim annem, babam ve kardeşime; her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan eşime sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı, TF2009LTP25 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Dr. Zeliha Özen GÜÇLÜTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kromozom Düzensizlikleri.....	3
2.1.1. Kromozomlardaki Sayısal Düzensizlikler.....	3
2.1.1.1. Otozomal Trizomiler.....	4
2.1.1.1.1. Trizomi 21.....	4
2.1.1.1.2. Trizomi 18.....	6
2.1.1.1.3. Trizomi 13.....	6
2.1.1.2. Seks Kromozom Anomalileri.....	7
2.1.2. Kromozomlardaki Yapısal Düzensizlikler.....	7
2.2. Prenatal Tarama.....	7
2.2.1. Prenatal Taramanın Tarihçesi.....	9
2.2.2. Ortancanın Katları.....	10
2.2.3. İkinci Trimester Tarama Testleri.....	11
2.2.3.1. Alfa-Fetoprotein.....	13
2.2.3.2. Koryonik Gonadotropin.....	14
2.2.3.3. Unkonjuge Östriol.....	14
2.2.3.4. İnhibin-A.....	15
2.2.4. Birinci Trimester Tarama Testleri.....	15
2.2.4.1. Gebelikle İlişkili Plazma Proteini-A.....	17
2.2.4.2. Koryonik Gonadotropin.....	17
2.2.4.3. Ultrason Belirteçleri.....	18
2.2.4.3.1. Nukal Translusensi Kalınlığı.....	18
2.2.4.3.2. Diğer Belirteçler.....	19
2.2.5. Alternatif Birinci ve İkinci Trimester Tarama Stratejileri.....	20
2.2.5.1. Entegre Tarama.....	20
2.2.5.2. Bağımsız Ardışık Tarama.....	20
2.2.5.3. Basamaklı Ardışık Tarama.....	20
2.2.5.4. Olasılıklı Tarama.....	21
2.2.5.5. Tekrarlanan Ölçüm Taraması.....	21
2.2.6. Halen Geliştirilmekte Olan Diğer Tarama Testleri ve Belirteçler.....	22
2.2.6.1. Maternal Kanda Fetal Hücreler ve Serbest Fetal DNA.....	22
2.2.6.2. ADAM 12.....	23
2.2.6.3. İnsan Plasental Laktojeni.....	23

2.3. Prenatal Tanı	24
2.3.1. İnvaziv Prenatal Tanı Teknikleri	24
2.3.1.1. Koryonik Villüs Örneklemeesi.....	24
2.3.1.2. Amniyosentez	25
2.3.1.3. Kordosentez (Perkutan Umbilikal Kan Örneklemeesi)	25
2.3.2. Prenatal Tanıda Altın Standart: Fetal Karyotip Analizi	25
2.3.3. Floresan in situ Hibridizasyon	26
2.3.4. Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	27
2.3.4.1. Prensip.....	28
2.3.4.2. Analiz	28
2.3.4.3. Sonuçların Yorumlanması.....	31
2.3.4.4. Avantajları	32
2.3.4.5. Dezavantajları	33
2.3.4.6. Güvenilirliği	33
2.3.5. Multipleks Ligasyon Prop Amplifikasyonu	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Serum hPL Düzeyi Ölçümü	37
3.1.1. hPL Kitinin İçerdiği Gereç ve Solüsyonlar.....	37
3.1.2. Test Protokolü	37
3.2. QF-PCR Analizi	38
3.2.1. DNA İzolasyonu	38
3.2.1.1. Amniyon Sıvısından DNA İzolasyonu	38
3.2.1.2. CVS'ten DNA İzolasyonu.....	39
3.2.1.3. Kordon Kanından DNA İzolasyonu	39
3.2.2. Aneufast QF-PCR Kiti ile Amplifiye Edilen Belirteçler	40
3.2.3. PCR Protokolü.....	40
3.2.4. Örneklerin Yürütülmesi	42
3.3. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Maternal Serum hPL Düzeyleri.....	43
4.2. QF-PCR Analizi	53
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ.....	83

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İkinci trimester tarama test performansları	12
Tablo 2. Down sendromlu vakalarda ikinci trimester belirteçlerinin MoM değerleri	12
Tablo 3. İkinci trimester tarama testlerinin hCG'nin farklı formları ile tespit edilen % 5 FPR ile saptama oranları	15
Tablo 4. Birinci trimester kombine tarama prospektif çalışma sonuçları	26
Tablo 5. Birinci trimester tarama testlerinin hCG'nin farklı formları ile tespit edilen % 5 FPR ile saptama oranları	18
Tablo 6. Anöploidilerin tamsında kullanılan bazı STR belirteçleri	30
Tablo 7. QF-PCR ile anöploidilerin prenatal tamsına ilişkin çalışmaların sonuçları	34
Tablo 8. Aneuplast QF-PCR kitinde bulunan 6 setin içerdiği belirteçler	41
Tablo 9. PCR karışımı	41
Tablo 10. PCR programı	41
Tablo 11. Birinci trimester tarama grubundaki gebelere ait demografik veriler	43
Tablo 12. İkinci trimester tarama grubundaki gebelere ait demografik veriler.....	44
Tablo 13. Birinci trimester hPL MoM düzeylerinin dağılımı	49
Tablo 14. İkinci trimester hPL MoM düzeylerinin dağılımı	49
Tablo 15. Birinci trimester hPL MoM düzeyleri ile diğer belirteçlerin korelasyon analizi	51
Tablo 16. İkinci trimester hPL MoM düzeyleri ile diğer belirteçlerin korelasyon analizi	51
Tablo 17. Dialelik örneklerdeki pik alanı oranları	60
Tablo 18. QF-PCR analizinde kullanılan belirteçlerin heterozigotlukları	61
Tablo 19. Çeşitli ülkelerde STR belirteçlerinin heterozigotluk oranları	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 1. Trizomi 21 ve diğer anöplidilerin anne yaşı ile ilişkileri	5
Şekil 2. Trizomi 21 ve diğer anöplidilerin gebelik yaşı ile ilişkileri	6
Şekil 3. STR belirteçleri kullanarak QF-PCR analizi ile trizomilerin tespiti.....	29
Şekil 4. Birinci trimester hPL ve log hPL değerlerinin normal olasılık grafikleri	45
Şekil 5. İkinci trimester hPL ve log hPL değerlerinin normal olasılık grafikleri.....	46
Şekil 6. Birinci trimester hPL değerlerinin (n=85) regresyon doğrusu ve saçılım grafiği	47
Şekil 7. Birinci trimester hPL düzeylerinin gebelik haftalarına göre medyan değerleri	47
Şekil 8. İkinci trimester hPL değerlerinin (n=84) regresyon doğrusu ve saçılım grafiği	48
Şekil 9. İkinci trimester hPL düzeylerinin gebelik haftalarına göre medyan değerleri	48
Şekil 10. Birinci trimesterde düşük ve yüksek risk ayrımı yapılmasında hPL MoM için ROC analizi	50
Şekil 11. İkinci trimesterde düşük ve yüksek risk ayrımı yapılmasında hPL MoM için ROC analizi	50
Şekil 12. Birinci trimester yüksek riskli olarak tespit edilen olgularda takip sonuçları	52
Şekil 13. İkinci trimester yüksek riskli olarak tespit edilen olgularda takip sonuçları.....	53
Şekil 14. 46,XX’li bir olgunun QF-PCR analizi görüntüsü	55
Şekil 15. 46,XY’li bir olgunun QF-PCR analizi görüntüsü	56
Şekil 16. Olgu 1’in QF-PCR analizi görüntüsü (47,XX+21).....	57
Şekil 17. Olgu 2’nin QF-PCR analizi görüntüsü (47,XX+21).....	58
Şekil 18. Olgu 3’ün QF-PCR analizi görüntüsü (46,XX).....	59

KISALTMA LİSTESİ

ADAM-12	A Disintegrin And Metalloprotease 12-S
AFP	Alfa-Fetoprotein
BPD	Biparietal Diameter
BUN	Biochemistry, Ultrasound, Nuchal Translucency
CCD	Charge Couple Device
CRL	Crown Rump Length
CVS	Chorionic Villus Sampling
ÇÜTF	Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
DHEAS	Dehidroepiandrosteron Sülfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DR	Detection Rate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FASTER	First And Second Trimester Evaluation of Risk
FISH	Flourescent In Situ Hibridization
FMF	Fetal Medicine Foundation
FPR	False Positive Rate
FSH	Folikül Stimülan Hormon
GH	Growth Hormone
hCG	Human Chorionic Gonadotrophin
hPL	Human Placental Lactogen
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IGF-BP	The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein
LH	Lüteinizan Hormon
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Prop Amplification
MoM	Multiple of the Median
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NT	Nokal Translusensi
NTD	Nöral tüp defekti
OSCAR	One Stop Clinic to Assessment of Risk
PAPP-A	Pregnancy-Associated Plasma Protein A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLGF	Placental Growth Factor
QF-PCR	Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction
ProMBP	Proform of Eosinophil Major Basic Protein
ROC	Receiver Operating Curve
Rpm	Revolutions per minute
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SP1	Pregnancy-Specific Glycoprotein 1
STR	Short Tandem Repeat
SURUSS	Serum Urine and Ultrasound Screening Study
TRACE	Time Resolved Amplified Cryptate Emission
TSH	Tiroid Stimülan Hormon
uE₃	Unconjugated Oestriol

ÖZET

Tarama Testleri İle Gebelikte Anöploidi Riskinin Belirlenmesi Ve Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Prenatal Tanısı

İnsan plasental laktojeni (hPL), plasenta tarafından sentezlenen ve maternal serumda bulunan bir polipeptiddir. Down sendromlu plasentalarda sentezinin azaldığı gösterilmiştir. Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR), son yıllarda anöploidilerin hızlı tanısında kullanılan yöntemlerdendir. Bu çalışmanın amacı fetal anöploidiler için hPL'nin maternal serum belirteci olarak potansiyelinin ve QF-PCR'ın tanıdaki etkinliğinin araştırılmasıdır.

Merkez Laboratuvarına başvuran birinci trimester için 85 düşük ve 23 yüksek riskli, ikinci trimester için 84 düşük ve 51 yüksek riskli gebenin serum hPL düzeyleri ölçüldü. Düşük riskli gebelerin hPL düzeyleri ile her gebelik günü için medyan değerleri belirlenerek gebelik yaşına uygun MoM değerleri hesaplandı. Prenatal Tanı Ünitesi'ne hemoglobinopatiler yönünden prenatal tanı amacıyla başvuran 26 gebe ile yüksek riskli olgulardan invaziv prenatal işlem yapılan 2 gebeye QF-PCR analizi yapıldı.

Birinci trimester yüksek riskli grupta Down sendromlu olduğu tespit edilen olgunun hPL MoM değeri 0,77, ikinci trimester yüksek riskli grupta Down sendromlu olduğu tespit edilen olgunun hPL MoM değeri 1,50 olarak belirlendi. Bu iki olguya yapılan QF-PCR analizi ile karyotipleri 47,XX+21 olarak belirlendi. Normal karyotipe sahip olduğu belirlenen 26 örneğin birinde ise QF-PCR sonucu 46,XX olarak belirlenmesine rağmen olgunun yapılan sitogenetik analizinde fetusun karyotipinin 46,XX-92,XXXX mozaik tetraploidi olduğu saptandı. QF-PCR yönteminin duyarlılığı % 66,6, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri % 100 ve negatif prediktif değeri % 96 olarak hesaplandı.

Sonuç olarak; hPL birinci trimesterde anöploidi taramasında mevcut testlere ek olarak kullanılabilir, ancak potansiyelinin değerlendirmesi için geniş prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla beraber QF-PCR, yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları ile anöploidilerin hızlı tanısı için güvenilir bir yöntemdir.

Anahtar Sözcükler: anöploidi, hPL, prenatal tanı, QF-PCR

ABSTRACT

Determination Of The Risk Of Aneuploidy By Screening Tests And Prenatal Diagnosis By Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction

Human placental lactogen (hPL) is synthesised by placenta and found in maternal serum. In Down syndrome affected placentas, hPL synthesis is reduced. Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) is used for rapid diagnosis of aneuploidies in recent years. The aim of this study is to investigate potential of hPL as maternal serum marker for fetal aneuploidies and efficacy of QF-PCR in diagnosis.

Serum levels of hPL were measured in first trimester 85 low-risk, 23 high-risk pregnancies and in second trimester 84 low-risk, 51 high-risk pregnancies. Medians for each day were determined with hPL levels of low-risk pregnant. MoM values appropriate gestational age were calculated. QF-PCR was performed in 26 pregnant admitted for hemoglobinopathy to Prenatal Diagnosis Unit and in 2 high-risk pregnant undergone invasive prenatal testing.

hPL MoM values of Down syndrome pregnancies in first and second trimester high-risk groups were identified respectively as 0,77 and 1,50. Karyotypes of these two cases were determined as 47,XX+21 by QF-PCR. In one of 26 cases with normal karyotype by QF-PCR, karyotype of fetus was determined as 46,XX-92,XXXX mosaic tetraploid by cytogenetic analysis. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of QF-PCR was calculated respectively as 66.6 %, 100 %, 100 % and 96 %.

Consequently, hPL can be used in addition to the current first-trimester screening tests, however large prospective studies are required for the assessment of the potential of hPL. Nevertheless, QF-PCR is a reliable method for rapid diagnosis of aneuploidies with high sensitivity and specificity rates.

Key words: aneuploidy, hPL, prenatal diagnosis, QF-PCR

1. GİRİŞ

Kromozomal anomaliler perinatal ölüm ve çocukluk çağı özürlülerinin en önemli nedenidir. Kromozom anomalilerinin saptanması invaziv prenatal tanı için en sık endikasyondur. Ancak amniyosentez, CVS veya kordosentez şeklinde yapılan invaziv işlemler ile yaklaşık % 1 düşük riski bulunmaktadır. Bu nedenle bu testler sadece kromozomal anomaliler için yüksek riskli olduğu düşünülen gebelere uygulanmalıdır.¹ Tarama programları başlıca çoğunluğu terme kadar yaşayabilen ve ağır fenotipik özellikler gösteren bozuklukları hedef alır. Bunlar arasında Down sendromu prenatal tanı ve terapötik abortus olmadan 1-2:1000 prevalansı ile en sık görülendir ve uzun süreli morbidite ile önemli derecede ilişkilidir.^{2,3}

Gebelikte yapılan tarama testlerinin hedefi anomalili fetusları mümkün olduğu kadar erken dönemde saptamak ve aileyi bilgilendirmektir.⁴ Önceleri mevcut tek tarama testi anne yaşı olup 35 yaş ve üzerindeki gebeliklerde Down sendromunu saptayabilmek için genetik danışmanlık ve amniyosentez veya CVS önerilmekteydi. Down sendromu için 35 yaş altındaki kadınlarda biyokimyasal serum taraması 1984 yılında Merkatz tarafından düşük maternal serum AFP düzeyleri ve Down sendromu arasındaki ilişkinin gösterilmesiyle başlamıştır.⁵ Günümüzde tarama testleri maternal yaşa bakılmaksızın rutin olarak tüm gebelere önerilmektedir. Biyokimyasal ve ultrasonografik yöntemleri kullanarak yüksek saptama oranları elde edilen çeşitli tarama stratejileri mevcuttur. İkinci trimester maternal serum taraması iki dekattan fazladır uygulanmaktadır. Yakın geçmişte ilk trimester testleri fetal anöploidiler için erken tarama ve erken tanı imkanı sunmuştur.⁶

Tarama testlerinin performans ve etkinliğini geliştirmek için farklı fikirler öne sürülmüştür. Bunlar; ilk trimester taramasının ikinci trimester taraması ile kombine edildiği entegre tarama modeli, ilk testin sonraki test için gerekliliğini belirleyen ilk ve ikinci trimester şartlı ve ardışık tarama modeli ve aynı belirteçlerin tekrarlayan kullanımınıdır.⁷ Tarama performansının artırılmasının bir yolu ise ilave belirteçlerin dahil edilmesidir. Nazal kemik ve triküspit regürjitasyonu gibi ultrason belirteçlerinin yanısıra SP1, ProMBP, PLGF, hPL ve ADAM 12 gibi biyokimyasal belirteçler öne sürülmüş ve test edilmiştir.⁸

Maternal yaşı, anormal serum biyokimyasal belirteçleri veya anormal ultrason bulguları nedeniyle kromozomal anomalili fetus taşıma riski yüksek bulunan gebelere amniyosentez, CVS veya kordosentez uygulanır ve elde edilen fetal hücrelerden standart karyotipleme ile kromozom analizi yapılır. Bu geleneksel sitogenetik analiz kromozom anomalilerinin prenatal tanısında altın standarttır. Ancak bu yöntemde hücre kültürü için gerekli olan süre en az 10 gün (optimum 21 gün) olup sonuç almak için beklenen bu süre ailelerde anksiyeteye neden olmaktadır. Son yıllarda 24-48 saat içinde sonuç vermeyi sağlayan diyagnostik yöntemler geliştirilmiştir. FISH, QF-PCR ve MLPA bu yöntemler arasında en sık kullanılanlardır.⁹

Bu çalışmada hPL'nin fetal trizomiler için birinci ve ikinci trimesterde maternal serum belirteci olarak etkinliğinin belirlenmesi ve QF-PCR analizinin anöploidi tanısındaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kromozom Düzensizlikleri

Kromozom düzensizlikleri sayısal ve yapısal olmak üzere iki grupta incelenirler.¹⁰⁻¹² Sayısal kromozom anomalileri yapısal kromozom anomalilerinden daha yaygındır ve tüm kromozom anomalilerinin % 95'inden fazlasını oluşturmaktadır.¹²

2.1.1. Kromozomlardaki Sayısal Düzensizlikler

Sayısal değişiklikler iki şekilde ortaya çıkar. Kromozom sayısındaki artış ya da azalışlar, temel kromozom sayılarının katları kadar oluyorsa buna öploidi, temel kromozom sayısının katları kadar olmuyorsa buna da anöploidi denir.^{10,11,13}

Öploidi: Temel kusur; hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır. Hücrelerdeki kromozom sayısı o organizma türü için temel gametik sayının tam katı kadar artmıştır. Yaşamla bağdaşmaz. Öploidik kromozom yapısına daha çok insan tümör dokusu kültürlerinde ve spontan düşük materyallerinde rastlanmaktadır.^{10,12,13}

Anöploidi: Kromozom bozuklukları arasında en sık görüleni ve en önemli olanıdır.^{10,12} Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere denir. Homolog kromozomlardan birinin eksikliğinde o kromozomun monozomisi, bir kromozomun fazlalığında ise o kromozomun trizomisi söz konusu olur.¹⁰

Anöploidi oluşumunda iki temel mekanizma söz konusudur:

Kromozom ayrılamaması (nondisjunction): 1. veya 2. mayotik bölünme sırasında iki ayrı hücreye gitmesi gereken bir kromozom çiftinin her iki üyesinin birbirinden ayrılmayıp birlikte bir tek hücreye gitmesi olayıdır.¹⁰ Kromozomların çoğunda maternal mayoz I hataları mayoz II hatalarından daha siktir, ancak kromozomlara spesifik değişiklikler izlenebilmektedir. Örneğin trizomi 21'de maternal mayoz I hataları baskınken, trizomi 18 karakteristik olarak maternal mayoz II hataları içerir.¹⁴

Anafaz gecikmesi (lagging): Kromozomların anafazda kutuplara göçü sırasında oluşan bir hata sonucu kromozomlardan bir tanesi geri kalır. Geç kalan bu kromozom ya eşinin bulunduğu yavru hücreye katılır ya da bölünme sırasında ortadan kaybolur.

Eğer eşinin bulunduğu hücrede kalacak olursa, bir hücrede aynı kromozomdan iki tane bulunurken, diğer hücrede hiç bulunmaz. Eğer sitoplazma bölünmesi sırasında kaybolacak olursa, hücrelerden biri normal kromozom sayısına sahip olurken diğerinde bir kromozom eksik olacaktır.¹⁰

2.1.1.1. Otozomal Trizomiler

İnsan kromozomlarından herhangi birinin bir çift yerine 3 tane bulunması trizomi olarak tanımlanmaktadır. Otozomal trizomilerde dismorfik görünüm, zihinsel özür ve gelişme geriliği karakteristik bulgular olup yaşam süreleri sağlıklı insanlara göre daha kısadır.¹² Trizomi insidansı düşükle sonlanan gebeliklerde % 50, ölü doğumlarda % 4 ve canlı doğumlarda % 0,3 olarak belirlenmiştir.¹¹

2.1.1.1.1. Trizomi 21

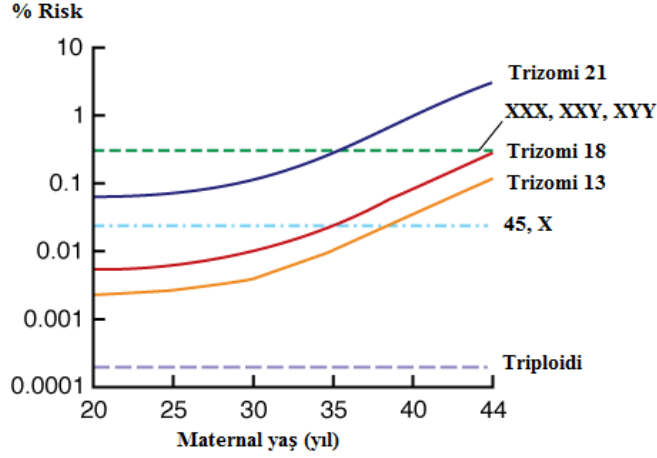
Trizomi 21 halen üzerinde en çok çalışılan anöploid durumdur. Trizomi 21’li gebeliklerin % 80’inin spontan abortusla sonlanmasına rağmen terme kadar ulaşan az sayıdaki otozomal trizomiden birisidir. Down Sendromu yaklaşık 600 ile 1000 canlı doğumda bir görülmektedir. Görülme sıklığı nedeniyle bu sendrom zeka geriliğinin en sık saptanan formu ve doğum defektlerinin önde gelen bir nedenidir.¹⁵

1866’da John Langdon Down ileride kendi ismiyle tanımlanacak olan benzer fiziksel özelliklere sahip bireyleri tanımladığı klasik makalesini yayımlamıştır. Down Sendromu’nun ayırıcı özellikleri zeka geriliği, hipotoni ve yüz, el ve ayaklardaki anomalilerdir. Diğer fenotipik bileşenleri konjenital kalp defektleri, sindirim sistemi anomalileri, konjenital katarakt ve lösemiye içerir. Sitogenetik karyotiplemenin gelişmesi ile 1959 yılında Lejeune ve ark. tarafından Down Sendromu’nun etyolojisinin fazladan bir 21. kromozomun varlığı olduğu belirlenmiştir.¹⁵

Down sendromundaki bu ekstra 21. kromozom % 95 sıklıkla maternal mayotik nondisjunction ve yaklaşık % 4 vakada Robertsonyan translokasyon sonucu dengesiz ayrılmaya bağlıdır. Yaklaşık % 1 vakada ise mozaizm vardır ve bu bireyler daha hafif bir fenotip sergilerler.^{15,16}

Anöploidilerin ilk tanımlandığı günden itibaren maternal nondisjunction için predispozan faktörler araştırılmıştır.¹⁴ Down sendromlu bir fetusun konsepsiyon anındaki anne yaşı, kromozom 21’deki mayotik nondisjunction için en önemli risk

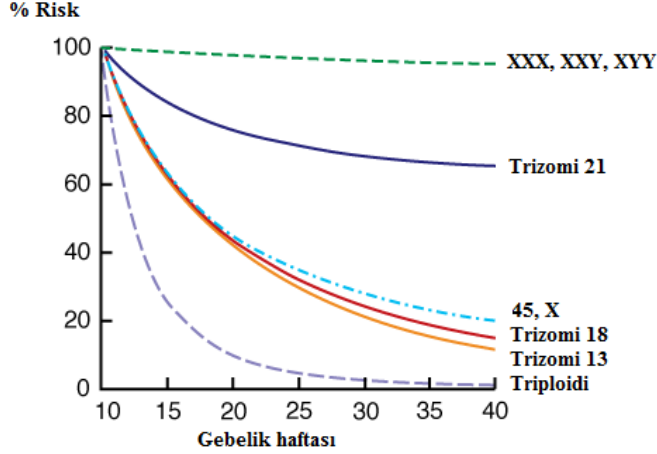
faktörüdür.¹⁵ İleri maternal yaş ile artmış Down Sendromu oranı arasındaki ilişki ilk defa 1933'te Penrose tarafından gösterilmiştir.^{15,16} Trizomi 21 ve diğer anöploidilerin anne yaşı ile ilişkileri şekil 1'de gösterilmiştir.¹¹



Şekil 1. Trizomi 21 ve diğer anöploidilerin anne yaşı ile ilişkileri¹¹

Risk anne yaşına bağlı olarak artarken gebelik yaşına bağlı olarak azalır (şekil 2); çünkü etkilenmiş olan fetüslerin %31'i 10. gebelik haftasından terme kadar, %18'i ise 16. gebelik haftasından terme kadar geçen süre içinde kaybedilmektedir. Benzer ilişki diğer trizomiler ve poliploidilerde de vardır.⁴

Trizomili bir bebek doğurmuş annenin bir sonraki gebeliğinde trizomili bebek sahibi olma riskinin artmış olduğu bilinmektedir. Bu risk artışı ilk etkilenen gebeliğin olduğu yaşla ilgilidir ve 35 yaşından genç kadınlarda daha yüksektir.^{4,17}



Şekil 2. Trizomi 21 ve diğer anöploidilerin gebelik yaşı ile ilişkileri¹¹

2.1.1.1.2. Trizomi 18

Edwards Sendromu olarak da bilinen Trizomi 18'in görülme sıklığı 8000 doğumda bir olup kızlarda 3-4 kat fazla görülmektedir.¹¹ Yaşayan yenidoğan bebekler arasında Trizomi 21'den sonra en sık görülen ikinci otozomal trizomidir. Oluşan gebeliklerin % 95'i embriyonik ya da fetal hayatta ölümle sonuçlanırken, etkilenmiş çocukların sadece % 5-10'u bir yıldan fazla yaşarlar.¹⁸

Trizomi 18'li fetüslerin çoğunda gelişme geriliği vardır. Belirgin oksiput, malforme kulaklar, küçük ağız tipik yüz bulgularındandır. Tüm organ sistemleri etkilenmiş olabilir. % 95'inde en sık ventriküler veya atriyal septal defekt olmak üzere kardiyak defekt vardır. At nalı böbrek, radyal kemik aplazisi, hemivertebra, imperfore anüs diğer anomaliler arasında sayılabilir.¹¹

2.1.1.1.3. Trizomi 13

Patau Sendromu olarak bilinen Trizomi 13'ün sıklığı 20,000 doğumda birdir. % 80-90 sıklıkta kardiyak anomaliler ve % 70 sıklıkta holoprozensefali görülür. Bunlara mikrosefali ile göz, burun ve damak anomalileri eşlik eder. Etkilenmiş fetüslerde ayrıca omfalosel, polikistik böbrek, radyal kemik aplazisi ve polidaktili bulunabilir. Hayatta kalma süreleri yaklaşık 7 gün olup ancak % 10'u bir sene yaşayabilir.¹¹

2.1.1.2. Seks Kromozom Anomalileri

Cinsiyet kromozomları ile ilgili düzensizliklerin, otozomal kromozom düzensizliklerinden farklı bir davranış şekli gösterdikleri ve daha hafif fenotipik belirtiler ortaya koydukları bilinmektedir. Bu tip hastalarda büyük fenotipik düzensizliklere veya zeka geriliğine rastlanmaz. Bununla birlikte, bu tip hastalarda karakteristik infertilite veya fertilite azalması gözlenir. Cinsiyet kromozom sayısının arttığı olgularda ise (48,XXXYY, 49,XXXYYY gibi) belirgin zeka geriliği ve fiziksel anomaliler görülmektedir.¹⁰

2.1.2. Kromozomlardaki Yapısal Düzensizlikler

Yapısal düzensizlikler hücre döngüsünün herhangi bir evresinde bir veya daha fazla kromozomda oluşan kırılma ve yeniden düzenlenmeler şeklinde ortaya çıkarlar. Bu yeniden düzenlenmeler nadiren kendiliğinden meydana gelmektedir. İn vitro çalışmalar ile iyonize radyasyonun, viral enfeksiyonların ve bazı kimyasal ajanların kromozomlarda yeniden düzenlenmeye neden olduğu gösterilmiştir.^{10,12}

2.2. Prenatal Tarama

Tarama; ‘hastalık semptomlarından dolayı tıbbi bakım gerektirmeyen kişiler arasından, ileri araştırma veya doğrudan koruyucu faaliyetlerden yararlanmak amacıyla, spesifik bir hastalık için yüksek riskli bireyleri belirlemek için bir test veya araştırmanın sistematik uygulaması’ olarak tanımlanmaktadır.^{16,19} Yararlı tarama programları için kriterler açıkça belirtilmiştir. İdeal bir perinatal genetik tarama aşağıdaki kriterleri yerine getirmelidir:

- Sık görülen ve önemli fetal hastalıkları belirlemek,
- Maliyet etkin ve kolay uygulanabilir olmak,
- Yüksek saptama oranı ve düşük yanlış pozitiflik oranı,
- Güvenilirlik ve tekrar üretilebilirlik,
- Hastalığın diyagnostik testinin mevcut olması,
- Gerektiğinde gebeliğin güvenli ve yasal olarak sonlandırılabilmesi için yeterince erken pozitif olmak.²⁰

Fetal Down sendromu için yüksek riskli olan kadınların belirlenmesi bu tanımlama ile uyumludur. Tarama pozitif olan hastalara fetusun ultrason incelemesi,

genetik danışmanlık ve ilk trimesterde koryonik villus veya ikinci trimesterde amniyotik sıvı hücrelerinden sitogenetik analiz ile kesin tanı önerilir. Anöploidiler için prenatal taramanın temel amacı, ebeveynlere etkilenmiş gebeliğin devam etmesi ya da gebeliğin sonlandırılması arasında bir seçim imkanı vermektir. İnvaziv tanı işlemlerini takiben fetal kayıp riski, anksiyeteye neden olması, yanlış pozitif sonuçlar ve yanlış negatif bir sonuç ile hastaya verilen yanlış güvence ise taramanın dezavantajları arasında sayılabilir.^{3,16}

Tarama testlerinin performanslarının değerlendirilmesi için bazı terimler kullanılmaktadır.

Saptama oranı; duyarlılık ile eş anlamlı olarak kullanılır ve etkilenmiş gebeliği olanlarda tarama testinin pozitif olma olasılığıdır.^{19,20}

Yanlış pozitiflik oranı; etkilenmemiş gebeliği olanlarda tarama testinin pozitif olma olasılığıdır ve özgüllüğün karşılığıdır.^{19,20} FPR, etkilenmemiş gebeliklere uygulanan invaziv işlemlerin oranının bir göstergesidir.³

Pozitif sonuç verenlerin etkilenme olasılığı; pozitif sonuç veren etkilenmiş gebelerin pozitif sonuç veren etkilenmemiş gebelere oranıdır. Başka bir deyişle gerçek pozitiflerin yanlış pozitiflere oranıdır.^{19,21} Testin saptama ve yanlış pozitiflik oranı ile Down sendromlu gebeliklerin prevalansına bağlıdır.²²

Olabilirlik oranı; bir hastalığın belirli bir test ile belirlenmiş riskinin, bu hastalıktan etkilenmemiş kişilerdeki riske oranıdır.^{23,24} Etkilenmiş gebeliklerde testin pozitif olma sıklığının normal gebeliklerde testin pozitif olma sıklığına oranlanması ile belirlenir. Bir diğer deyişle duyarlılığın yanlış pozitiflik oranına bölünmesi ile hesaplanır.²⁰

İdeal bir tarama testinin DR'si ve OAPR'si yüksek, FPR'si ise düşük olmalıdır.²⁵

Her kadın için kromozomal defektli fetus sahibi olma riski vardır.²⁶ Kullanılan tüm serum belirteçlerinin aldığı farklı değerlerle yapılan kombinasyonlar ile Down sendromu riskini belirleyebilecek yeterince geniş bir veritabanı toplamak mümkün olmadığı için risk taraması istatistiksel bir model kullanarak yapılmaktadır. Genellikle Down sendromu için serum taramasında tek veya çok değişkenli Gaussian modeller kullanılmaktadır.²² Bireysel riski hesaplamak için öncelikle gebenin yaşına ve gebelik yaşına bağlı önsel riskinin bilinmesi gerekir.²⁶ Önsel risk, anne yaşı ve gebelik haftasına bağlıdır. Anne yaşına uygun Down sendromu riskini gösteren maternal yaş eğrisi

kullanılarak önsel risk belirlenebilir. Bu eğriye ait değişkenler yayınlanmış yaşa özgü doğum prevalans serilerinin kombine sonuçlarının regresyon analizi ile elde edilir.²⁷ Sonografi veya biyokimyasal testlerle elde edilen bir ölçüm sonucunun, kromozomal defekti olan ve olmayan olguların yüzde kaçında bulunduğu hesaplanıp, bu oranların birbirine bölünmesi ile olasılık oranı bulunur.²⁸ Ardından önsel risk hesaplanan olabirlik oranları ile çarpılır. Önsel risk ve olabirlik oranları sonuçları hastaya özgü riski verir.²⁶

Down sendromu için tarama testleri gebeleri hesaplanan risklerine göre pozitif veya negatif sonuçlara sahip olanlar şeklinde sınıflandırmak için kullanılmaktadır.²² Bu ayırım için bir eşik değer gerekmektedir. Testin performansı bu eşik değerine bağlıdır, örneğin eşik değerini azaltarak testin saptama oranı artırılabilir ancak beraberinde yanlış pozitiflik oranı artışı ile testin duyarlılığı azalır. Testin duyarlılığı ve özgüllüğü arasındaki en iyi dengenin kurulabilmesi için istatistiksel olarak bir ROC eğrisi kullanılabilir.²⁰

2.2.1 Prenatal Taramanın Tarihçesi

Maternal yaş ve Down sendromlu gebelik prevalansı arasındaki ilişki ilk defa Penrose tarafından 1933 yılında yayınlanmıştır.¹⁶ 1959'da fazladan bir 21. kromozomun varlığının Down sendromunun patognomonik bulgusu olduğu gösterilmiş ve takiben 1966'da ilk defa insan amniyotik sıvı hücrelerinde başarılı bir kromozom analizi rapor edilmiştir. 1968'de Down sendromunun ilk antenatal tanısı yapılmıştır.²²

Biyokimyasal tarama testleri kullanılmaya başlamadan önce tarama testi olarak sadece anne yaşı kullanılmaktaydı ve eşik sınırı 35 ile 37 yaş arasında idi. Ancak bu şekilde gerçekleştirilen tarama testinde gebe popülasyonunun % 5'ine amniyosentez önerilmiş ve Down sendromlu gebeliklerin % 30'u teşhis edilebilmiştir.^{16,22}

1972'de Brock ve Sutcliffe ilk defa açık NTD'lerde amniyotik sıvı AFP düzeylerinin yükselmiş olduğunu bildirmişlerdir. 1973 yılında ise açık NTD'lerde maternal serum AFP değerlerinin yükseldiği rapor edilmiştir.²⁹

Down sendromu için 35 yaş altındaki kadınlarda biyokimyasal serum taraması 1984 yılında Merkatz tarafından düşük maternal serum AFP düzeyleri ve Down sendromu arasındaki ilişkinin gösterilmesiyle başlamıştır.⁵

1987'de Bogard ve ark. maternal serum hCG düzeylerinin Down sendromlu gebeliklerde etkilenmemiş gebeliklere oranla iki kat yükseldiğini bildirmişlerdir. Bunu, 1988 yılında Canick ve ark.'nın Down sendromlu gebeliklerde maternal serum uE₃ düzeylerinin etkilenmemiş gebeliklerden % 25 daha düşük olmasının göstermeleri takip etmiştir.^{22,30} 1990'larda Down sendromu için saptama oranlarını artırmak için hCG ve uE₃ maternal serum AFP ile kombine olarak kullanılmıştır. Anne yaşı ile ilişkili risk ile birlikte bu 3 belirtecin (üçlü test) düzeyleri beraber değerlendirildiğinde Down sendromu için saptama oranı % 5 FPR ile yaklaşık olarak % 70'tir.⁵ 1996 yılında ise AFP, uE₃ ve hCG ile dimerik inhibin A kombinasyonunun saptama oranını aynı FPR ile % 76'ya yükselttiği belirlenmiştir.²²

1991'de PAPP-A isimli bir proteinin gebeliğin 15. haftasından önce azalmış düzeylerinin, serbest β -hCG düzeylerindeki artış ile beraber Down sendromlu gebeliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu iki serum belirtecinin maternal yaş ile kombine edilmesi ile Down sendromlu gebeliklerin % 62'si % 5 FPR ile belirlenebilmekteydi.²²

1989'da Brohnstein ilk defa fetal Down sendromlu bir olguda birinci trimesterin son döneminde nukal ödemin artmış olduğunu göstermiştir.²⁵ 1990'da Szabo ve Gellen, 1992'de ise Nicolaidis ve ark. fetal Down sendromu için bir belirteç olarak nukal translusensi kalınlığı olarak isimlendirilen nukal ödemin etkinliğini yayınlamışlardır.^{25,31} Yaptıkları retrospektif bir çalışmada Spencer ve ark. gebeliğin 10-14. haftalarında maternal yaş, fetal NT ve maternal serum PAPP-A ve serbest β -hCG kombinasyonu ile yapılan taramada trizomi 21 için saptama oranını % 90 ve yanlış pozitiflik oranını % 5 olarak belirlemişlerdir.³² Fetal NT ve maternal serum PAPP-A ve serbest β -hCG kombinasyonunun uygulanabilirlik ve etkinliği yapılan prospektif çalışmalar ile onaylanmıştır.³³

2001 yılında ilk trimester taramasında nazal kemiğin yokluğunun Down sendromlu gebelikler ile yüksek oranda ilişkili olduğu Cicero ve ark. tarafından yayınlanmıştır.³¹

2.2.2. Ortancanın Katları

Prenatal taramada kullanılan tüm belirteçlerin düzeyleri gestasyonel yaşla değişmektedir. Hem gebelik süresince belirteç düzeylerindeki olan bu değişimleri, hem

de laboratuvarlar ve yöntemler arasındaki farklılıkları giderebilmek amacıyla MoM değeri kullanılmaktadır.²⁵ MoM değeri belirli bir belirteç düzeyinin, o belirtecin aynı gebelik yaşındaki normal gebeliklerde izlenen medyan değerine bölünmesiyle ifade edilir.^{22,34} Ortalama yerine medyan kullanılmasının nedeni belirteç düzeylerinin sağa eğik (log-linear) bir dağılım göstermesi ve aykırı değerlerde kullanımının daha sağlıklı olmasıdır. Medyan değerler hesaplandıktan sonra gebelerin belirteç düzeyleri MoM olarak rapor edilir. 1,0 MoM etkilenmemiş tekil gebelikler için orta değerdir. 0,5 ve 2,0 MoM değerleri sırasıyla medyan değerlerine göre 2 kat düşük veya 2 kat yüksek olduğunu göstermektedir. Wald tarafından geliştirilen MoM değeri, prenatal taramada raporlamada tüm dünyada kabul edilmiş bir birimdir.²⁵

MoM değeri kullanırken önemli bir nokta gestasyonel yaşın belirlenmesidir. Daha doğru bir tahmin ile daha iyi bir tarama performansı elde edilir. Tarama programları için standart uygulama gestasyonel yaşın ultrasonografik ölçümlerle belirlenmesidir. Bunun için ilk trimesterde baş-popo mesafesi ya da ikinci trimesterde biparietal çap ölçülebilir. Ultrason ile gestasyonel yaşın belirlenemediği durumlarda son adet tarihi kullanılabilir ancak daha iyi bir tarama performansı için ultrason ile ölçüm tercih edilmelidir.²⁵

2.2.3. İkinci Trimester Tarama Testleri

Bu testte kullanılan belirteçler AFP, uE₃, total hCG, serbest β-hCG, serbest α-hCG, ve dimerik inhibin A'dır.²² Bu belirteçler ikili (AFP ve hCG), üçlü (AFP, hCG ve uE₃) ve dördü (AFP, hCG, uE₃ ve inhibin A) kombinasyonlar şeklinde tarama testi olarak kullanılmaktadır. İkinci trimester serum taraması genellikle gebeliğin 15-20. haftaları arasında yapılmaktadır ancak 22. haftaya kadar uygulanabilir. Down sendromu riskinin belirlenmesi için 14. haftada da aynı kombinasyonlar kullanılabilir ancak AFP'nin açık nöral tüp defektlerini saptama gücü azaldığından önerilmez.¹⁶

Yapılan çalışmalarda ikinci trimester belirteçlerinin çeşitli kombinasyonlarını kullanarak hesaplanan tarama performansları yayınlanmıştır. SURUSS ve FASTER çalışmalarında da elde edilen benzer sonuçlar tablo 1'de gösterilmiştir.³⁵

Tablo 1. İkinci trimester tarama test performansları

	% 5 FPR ile % Saptama oranları	
	SURUSS ²¹	FASTER ³⁶
AFP ve hCG	66	-
AFP, hCG ve uE ₃	74	70
AFP, hCG, uE ₃ ve inhibin A	81	81

Down sendromlu vakalarda AFP ve uE₃ düzeyleri düşük, hCG ve inhibin A düzeyleri ise yüksektir.⁶ Tablo 2’de bu dört belirtecin çeşitli çalışmalarda elde edilen MoM değerleri gösterilmiştir. Trizomi 18’li gebeliklerde AFP, uE₃, hCG ve inhibin A düzeyleri düşüktür.

Tablo 2. Down sendromlu vakalarda ikinci trimester belirteçlerinin MoM değerleri

	MoM değerleri		
	SURUSS ²¹	Cuckle ve ark. ³⁷	FASTER ³⁶
AFP	0,74	0,73	0,74
uE ₃	0,70	0,73	0,61
hCG	2,05	2,02	1,79
Serbest β-hCG	2,66	2,30	-
İnhibin A	2,54	1,85	1,98

İkinci trimester üçlü tarama testi ile 1:100 eşik değer kullanılarak % 0,2 FPR ile trizomi 18’li gebeliklerin % 60’ı saptanabilmektedir.²⁴ Özellikle uE₃’ün trizomi 18 için önemli bir belirteç olması nedeniyle uE₃ ölçümü yapılamadığı durumlarda trizomi 18 için risk hesaplaması yapılması önerilmemektedir.³⁸ Mevcut tarama testleri Down sendromu ve trizomi 18 dışındaki kromozomal anomalileri saptamada yetersiz kalmaktadır.³⁹

Elde edilen serum belirteç düzeylerini bağımsız olarak etkilediği bilinen bazı faktörler vardır. Bu faktörlerin başında maternal ağırlık, ırk/etnik köken ve hastanın

diyabetik durumu gelmektedir.¹⁶ Ortalama olarak 20 kg'lık ağırlık artışı ile serum AFP'de % 17, uE₃'de % 7 ve hCG'de % 16 artış izlenir. İnsüline bağımlı diyabeti olan gebelerde ise serum belirteç düzeyleri daha düşüktür.²² Sigara içiciliği, önceki gebeliklerinin sayısı, Down sendromlu gebelik öyküsü, önceki gebeliğinde tarama pozitifliği, yardımcı üreme teknikleri (in vitro fertilizasyon ve ovulasyon indüksiyonu), fetüsün cinsiyeti, annenin Rh kan grubu ve maternal sistemik lupus eritematozus serum belirteçlerini etkileyen diğer faktörler arasında sayılabilir.^{16,22}

İkiz gebeliklerin taranmasında pekçok karışıklık ortaya çıkar. İkiz gebeliklerde maternal serum belirteç düzeyleri tekiz gebeliklerin yaklaşık iki katıdır. Serum belirteçlerinin konsantrasyonları ister istemez gebelikle ilişkilidir, her bir fetüse spesifik değildir. Bir ya da her iki fetusun etkilenmesi halinde beklenen serum belirteç konsantrasyonları hakkında da yeterli veri bulunmamaktadır. Bu durumda ultrason bulguları ve serum belirteçleri birlikte değerlendirilmelidir.⁴⁰

2.2.3.1. Alfa-Fetoprotein

Fetusa özgü bir protein olarak ilk defa 1956'da tanımlanan insan alfa-fetoproteini molekül ağırlığı 69.000 dalton olan bir glikoproteindir. Dördüncü kromozomun q kolu üzerindeki gen ile kontrol edilir.⁴¹

AFP'nin fetus için biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir. Kimyasal ve fiziksel özelliklerindeki albumine olan benzerliği nedeniyle fetal dolaşımında intravasküler hacmin sürdürülmesinde ozmotik bir role sahip olabilir. AFP'nin gebelik esnasında immünregülasyonla ilgisi olduğu ise geçerli olan bir başka teoridir.⁴¹

AFP, ilk olarak düşük miktarlarda fetal yolk sak'tan, yolk sak geriledikçe daha yüksek miktarlarda fetal karaciğerden salınır. Erken embriyonik hayatta fetal serumda yüksek konsantrasyonlardadır. Yaklaşık 9. gebelik haftasında maksimum değere ulaşır. Maternal serumda ilk defa 10. hafta civarında ölçülebilir (~5 µg/L). Her hafta konsantrasyonda % 15'lik bir artış olur ve yaklaşık 25. haftada pik yapar (~180 µg/L). Daha sonra terme kadar maternal serum AFP düzeyleri yavaşça azalır.⁴⁰

Down sendromlu gebelerde azalmış AFP düzeylerinin nedeni bilinmemektedir. Ancak ikinci trimesterde fetal karaciğerin tam gelişmemesine bağlı olduğu düşünülmektedir.⁴¹

2.2.3.2. Koryonik Gonadotropin

Protein bir iskelete karbonhidrat yan zincirlerinin bağlandığı, genellikle siyalik asit ile sonlanan bir glikoproteindir. Birbirine kovalen olmayan bağlarla bağlanmış alfa ve beta olmak üzere iki alt üniteden oluşan bir heterodimerdir.⁴⁰

hCG, plasentada sinsityotrofoblast hücrelerinde sentezlenir. Erkeklerde ve gebe olmayan kadınlarda ise hipofizde pulsatil tarzda önemsiz miktarlarda üretilmektedir. Overlerde korpus luteumu uyararak gebeliğin ilk haftalarında progesteron sentezlenmesini sağlar. hCG'nin α alt ünitesi 6. kromozom üzerinde tek bir gen tarafından LH, FSH ve TSH ile birlikte kodlanır. β alt ünitesi ise 19. kromozomdaki bir gen ailesi tarafından kodlanır.⁴⁰

Normal gebe kadınların serumlarında intakt (% 92-98), α alt ünitesi (% 0-7), β alt ünitesi (% 0-3) ve kısmen degrade olmuş (çentikli hCG ve β -çekirdek fragmanları) olmak üzere birçok farklı formda hCG bulunmaktadır.⁴² İntakt hCG ve serbest β -hCG gebeliğin 8-10. haftalarında pik konsantrasyonlarına ulaşırken, serbest α -hCG gebeliğin geç dönemlerine kadar yükselmeye devam eder.¹⁶

İkinci trimesterde hem α hem de β alt ünitelerinin ölçümleri Down sendromlu gebelikleri belirlemek için kullanılabilir. Ancak total ve serbest β -hCG kullanmak daha üstün gibi görünmektedir.¹⁶ Değişik çalışmalarda hCG, serbest β -hCG ve serbest α -hCG kullanılarak tespit edilen % 5 yanlış pozitiflik oranı ile saptama oranları tablo 3'te gösterilmiştir.

2.2.3.3. Unkonjuge Östriol

Sinsityotrofoblastlarda prekürsör olarak fetal adrenal bez DHEAS'ından sentezlenen steroid yapıda bir hormondur. DHEAS fetal karaciğerde 16-alfa hidroksilaz enzimi ile hidroksillenir ve plasentaya taşınır. Sülfataz enzimi ile dekonjuge edildikten sonra östriole aromatize edilir. Bundan sonra uE₃ maternal dolaşıma salınır. Uteroplasental kan akımı ve plasental vaskülarizasyonu regüle eder.⁴³ Down sendromlu fetüslerde adrenal hipoplaziye bağlı olarak uE₃ düzeyi düşük bulunmaktadır.⁴¹

Tablo 3. İkinci trimester tarama testlerinin hCG'nin farklı formları ile tespit edilen % 5 FPR ile saptama oranları

Serum Belirteci	% 5 FPR ile % Saptama oranları		
	Wald ve ark. ²²	SURUSS ²¹	Cuckle ve ark. ³⁷
hCG	51	53	-
Serbest α -hCG	39	-	-
Serbest β -hCG	51	61	-
AFP+hCG	59	66	56
AFP+Serbest α -hCG	47	-	-
AFP+Serbest β -hCG	58	71	61
AFP+uE3+hCG	69	74	60
AFP+uE3+Serbest α -hCG	64	-	-
AFP+uE3+Serbest β -hCG	68	77	65
AFP+uE3+hCG+inhibin A	76	81	67
AFP+uE3+Serbest α -hCG+inhibin A	73	-	-
AFP+uE3+Serbest β -hCG+inhibin A	75	83	71

2.2.3.4. İnhibin A

İnhibin alfa ve beta alt ünitelerinden oluşan glikoprotein yapısında bir hormondur. Hipofiz ön lob gonadotropin hormonlarından FSH'nın salınımını spesifik olarak inhibe ettiği için 1930 yılında bu isim verilmiştir.³⁵ Overde granüloza, testiste sertoli hücrelerinde sentezlenmektedir.⁴⁰

Van Lith ve ark. immunoassay yöntemi kullanarak tüm formlarını ve alfa alt ünitesini ölçerek, Down sendromlu gebeliklerde ikinci trimesterde maternal serum total inhibin düzeylerinin artma eğiliminde olduğunu raporlamışlardır. Total inhibin yerine sadece dimerik inhibin-A ölçümünün Down sendromlu gebeliklerde daha fazla yükseldiğinin gösterilmesi üzerine 1996 yılında Wald ve ark. tarafından üçlü teste inhibin-A eklenmesinin tarama testinin performansının belirgin olarak yükseldiğini bildirmişler, bu testi dörtlü tarama testi olarak önermişlerdir.³⁵

2.2.4. Birinci Trimester Tarama Testleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar Down sendromu taramasının birinci trimestere kaydırılması yönüne odaklanmıştır. Erken tarama ile gebelere erken güvence verilmesi sağlanacak ve gebeliğin sonlandırılması gerektiğinde bu işlem fetal hareketler belli olmadan ve dışarıdan fark edilebilecek gebelik belirtileri ortaya çıkmasından önce

yapılabilecektir. Ayrıca gebeliğin birinci trimesterde sonlandırılması ileri gebelik haftalarına göre daha güvenlidir.^{34,44}

Birinci trimester anöploidi taraması ultrason belirteci olarak fetal NT ölçümü ile maternal serum PAPP-A ve serbest β -hCG düzeyleri kullanılarak gebeliğin 10-13. haftalarında gerçekleştirilir.⁴⁵ Fetal NT ile maternal serum PAPP-A ve serbest β -hCG arasında anöploid gebeliklerde anlamlı bir ilişki bulunmadığından daha efektif bir tarama performansı için biyokimyasal ve ultrasonografik belirteçler kombine edilebilmiştir.^{34,46} Bu yaklaşım kombine tarama olarak isimlendirilmektedir.⁵ Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çok merkezli geniş prospektif çalışmalar sonucunda ilk trimester kombine tarama testlerinin Down sendromu saptama oranı % 5 FPR ile ortalama % 84 olarak bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. Birinci trimester kombine tarama prospektif çalışma sonuçları⁵

Çalışma	Hasta sayısı	Down sendromlu vaka oranı	Saptama oranı (%)
BUN ⁴⁷	8.216	61	79
FASTER ⁴⁸	33.557	84	83
SURUSS ²¹	47.053	101	83
OSCAR ⁴⁹	15.030	82	90
Toplam	103.856	328	84

Kombine taramanın Down sendromlu gebelikler haricinde trizomi 13, trizomi 18, Turner sendromu ve diğer seks anöploidileri ile triploidileri belirleyebildiği gösterilmiştir.⁵⁰⁻⁵³

Down sendromlu gebeliklerde normal gebeliklerle kıyaslandığında maternal serum serbest β -hCG düzeyleri iki kat yüksek bulunurken PAPP-A düzeyleri yarı yarıya azalmıştır. Trizomi 18 ve 13'te maternal serum PAPP-A ve serbest β -hCG'nin her ikisinin de düzeyleri azalmaktadır. Seks kromozom anomalilerinde ise maternal serum serbest β -hCG düzeyleri normal, PAPP-A düzeyleri düşüktür. Bu belirteçlerin düzeyleri etnik köken, ağırlık, sigara içiciliği, konsepsiyon yöntemi gibi anneye ait özelliklerden

etkilenmektedir. Bu nedenle risk hesaplaması yapılırken bu değişkenler de hesaba katılmalıdır.⁴⁶

2.2.4.1. Gebelikle İlişkili Plazma Proteini-A

PAPP-A; sinsityotrofoblastlardan salgılanan, 750 kDa ağırlığında, 16 çinko atomu içeren ve heparine afinitesi olan bir glikoproteindir. Ovulasyondan 33 gün sonra maternal kanda tespit edilebilmektedir. Gebelik boyunca doğuma kadar artan miktarlarda salınmaktadır. Maternal serumda ProMBP ile kompleks oluşturur. PAPP-A IGF-BP-4'ün proteazıdır. Bu nedenle fetal büyümenin düzenlenmesi ve trofoblast proliferasyonunda rol oynar. Down sendromlu gebeliklerde düzeylerinin neden azaldığı bilinmemekte olup plasental yetmezlikle ilişkili olduğu düşünülmektedir.^{41,44}

PAPP-A 8-13. haftalar arasında etkin bir tarama belirteçidir, ancak 14. haftadan itibaren etkinliğini kaybeder. Down sendromlu gebeliklerde medyan PAPP-A düzeyleri 14-16. haftalar arasında 0,9 MoM ve 17-19. haftalar arasında 1.0 MoM olarak belirlenmiştir.⁵⁴

2.2.4.2. Koryonik Gonadotropin

Birinci trimester taramasında kullanılacak olan hCG formunun seçimi belirtecin gebelik haftasına uygun performansına dayanarak yapılmalıdır (Tablo 5). Onbirinci haftadan önce serbest β -hCG ayırt edici iken hCG değildir. Onbirinci ve 13. haftalar arasında hCG'ye göre serbest β -hCG daha ayırt edicidir. Onbirinci haftada maternal yaş, NT ve PAPP-A ile kombine edildiğinde serbest β -hCG'nin performansı hCG'ye göre % 2-3 oranında daha yüksektir. Onüçüncü haftada ise hCG serbest β -hCG'ye göre % 1-2 oranında daha iyi bir performans sergilemektedir.⁵⁵

Tablo 5. Birinci trimester tarama testlerinin hCG'nin farklı formları ile tespit edilen % 5 FPR ile saptama oranları ⁵⁵

Maternal yaş + NT + PAPP-A +	% 5 FPR ile % Saptama oranları		
	11. hafta	12. hafta	13. hafta
Serbest β -hCG ⁵⁶	86	84	82
hCG ⁵⁶	84	83	84
Serbest β -hCG ⁵⁷	85	83	81
hCG ⁵⁷	82	81	81
Serbest β -hCG ⁵⁸	90	88	-
hCG ⁵⁸	87	85	-
Serbest β -hCG ²¹	83	83	84
hCG F19 ²¹	81	83	86
Serbest β -hCG ³⁷	87	84	80
hCG ³⁷	-	83	82

2.2.4.3. Ultrason Belirteçleri

2.2.4.3.1. Nukal Translusensi Kalınlığı

Birinci trimesterde boynun arka tarafında biriken sıvı, septalı olup olmamasına, sadece ense de bulunmasına ya da tüm vücudu zar gibi sarmasına bakmaksızın 'NT' terimi ile ifade edilir. Artmış NT; trizomi 21, Turner sendromu ve pek çok fetal malformasyon ve genetik sendromu içeren diğer kromozomal defektleri işaret edebilir. ^{28,33}

Artmış NT ile ilişkili durumların heterojen olması altta yatan birçok mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Olası nedenler arasında kardiyak malformasyonlar sonucu gelişen hemodinamik bozukluklar, ekstraselüler matriks kompozisyonundaki anomaliler ve lenfatik sistemin anormal gelişimi sayılabilir. ⁵⁹

NT'yi temel alan risk değerlendirmesi, normal ultrason standartlarında çok küçük mesafelerin kantitatif olarak ölçümüne dayandığından, bu şekilde bir risk taraması önemli derecede tekniğe bağlıdır. ⁶⁰ Yüksek duyarlılıkta ve güvenilir bir tarama testi olabilmesi için NT ölçümünün yeterli eğitim almış kişilerce, standardize edilmiş tekniğine uygun olarak yapılması gerekmektedir. Bu nedenle NT ölçümünde standardizasyonun sağlanması için FMF tarafından belirlenen şartlar genel kabul görmektedir. ⁴⁶

NT ölçümü için en uygun dönem 11–13 hafta 6 gün arasındır. CRL en az 45 mm ve en fazla 84 mm olmalıdır.^{46,60} NT ölçümü için en erken dönemin 11. gebelik haftası olarak belirlenmesinin iki nedeni vardır. Birincisi; 10. gebelik haftasından önce yapılan CVS'lerde ekstremitte amputasyon riskinin artmış olması, ikincisi ise pek çok major fetal anomalinin NT ölçümü sırasında 11. haftadan itibaren tanınabilmesidir. NT ölçümü için üst limitin 13 hafta 6 gün olarak kabul edilmesinin ise üç nedeni vardır. Birinci neden; eğer gebelik sonlandırılacak ise ikinci trimester yerine bu işlem birinci trimesterde yapılmış olur. İkincisi; ense arkasında sıvı birikimi 14–18. hafta arasında daha azdır. Üçüncüsü; 14. haftadan sonra fetus genellikle vertikale yakın bir pozisyonda durduğu için ultrason muayenesi sırasında fetusu yatay ile paralel duruma getirmek daha zordur. Bu nedenler ile 10–13. hafta arasında NT ölçebilme oranı % 98–100 olmasına karşın 14. haftada bu oran %90'a düşer.²⁸

Tüm kromozomal defektlerde NT kalınlığı 11-13+6. haftalarda artar. Trizomi 21, 18 ve 13'de NT kalınlığının artma paterni benzer olup bu bozukluklarda ortalama NT, CRL'ye göre normal olguların medyan değerlerinin 2.5 mm üzerindedir. Turner sendromunda ise medyan NT, normal olguların medyan değerlerinin 8 mm üzerindedir.²⁸

2.2.4.3.2. Diğer Belirteçler

Trizomi 21'de, NT'deki artışın yanı sıra, fetusların % 60-70'inde nazal kemik yoktur, % 25'inde maksilla kısadır ve % 80'inde de Doppler muayenesinde duktus venozusda anormal dalga şekli görülür. Trizomi 18'li olgularda, erken başlayan büyüme geriliği, bradikardiye eğilim, yanı sıra % 30 olguda ekzomfalos, % 75'inde tek umbilikal arter vardır. Olguların % 55'inde ise nazal kemik yoktur. Trizomi 13'lü olguların yaklaşık % 70'inde taşikardi, yaklaşık % 40'ında ise erken başlayan gelişme geriliği, megasistis, holoprozensefali veya eksomfalos vardır. Turner sendromunda erken başlayan gelişme geriliği ve olguların yaklaşık % 50'sinde taşikardi vardır.²⁸

2.2.5. Alternatif Birinci ve İkinci Trimester Tarama Stratejileri

2.2.5.1. Entegre Tarama

Entegre tarama modelinde birinci trimesterde bakılan NT ve PAPP-A ile ikinci trimesterde bakılan serum hCG, AFP, uE₃ ve inhibin-A kullanılır. Risk hesabı tüm veriler elde edildikten sonra yapılır. NT ölçümü yapılamayan durumlarda sadece serum belirteçleri kullanılarak da test yapılabilir.^{59,61} Wald ve ark. NT ile birlikte tüm serum biyokimyasal belirteçleri (PAPP-A, hCG, AFP, uE₃ ve inhibin-A) kullanıldığında Down sendromu tespit oranını % 1 yanlış pozitiflik ile % 85, sadece serum belirteçleri ile yapılan entegre testin Down sendromu tespit oranını ise % 5 yanlış pozitiflikle % 85 olarak belirlemiştir.⁶² SURUSS çalışmasında da entegre taramanın % 0,9 yanlış pozitiflik oranı ile % 85 tespit oranı olduğu belirlenmiştir.⁶³

2.2.5.2. Bağımsız Ardışık Tarama

Bu yöntemde iki farklı risk hesaplaması yapılır. Birinci ve ikinci trimester tarama testlerinin her ikisi de hastaya uygulanır. Sonuçlar birbirinden bağımsız olarak hesaplanır. Eğer birinci trimester taramasında risk yüksek bulunmuş ise bu risk ikinci trimester taraması için kullanılmaz. Bu nedenle ikinci trimester tarama testi sonucunda risk çok düşük olabilir ve bazı Down sendromlu bebekler gözden kaçırılabilir. Bununla birlikte eğer birinci trimester taraması negatif ise bu sonuç da ikinci trimester taramasında kullanılmaz ve ikinci trimester taraması sonucunda risk yüksek bulunabilir. Bu durumda bağımsız ardışık taramada yanlış pozitiflik oranı ve bununla birlikte invaziv işlem oranının yüksek olmasına yol açmaktadır. Platt ve ark., birinci veya ikinci trimester tarama pozitif olan tüm kadınlara invaziv test uygulamış, tespit oranını %98, yanlış pozitiflik oranını %17 olarak bildirmiştir. Bu yöntem tarama stratejileri içerisinde en az tercih edilendir.^{61,64}

2.2.5.3. Basamaklı Ardışık Tarama

Basamaklı ardışık tarama yönteminde birinci trimester tarama testi pozitif olan gebelere invaziv tanı önerilir. Testin negatif olduğu durumda ise gebeye ikinci trimester taraması önerilir. İlk trimester taramasında elde edilen sonuç ikinci trimester taramasında öncelikli risk olarak kullanılarak, ikinci trimester sonunda en doğru risk

hesabı yapılırken, uygun olmayan yüksek veya düşük risk hesabından kaçınılabılır. Basamaklı ardışık tarama ikinci trimester risk belirlemede daha doğru sonuç vererek gereksiz invaziv girişim sayısını azaltmasına rağmen hastaların tarama testinin ikinci basamağını beklerken takipten çıkmaları veya yaptırmamaları entegre testte olduğu gibi bu yöntemin de dezavantajıdır.^{61,65}

2.2.5.4. Olasılıklı Tarama

Olasılıklı tarama stratejisinde birinci trimester tarama testi yüksek riskli olan gebelere (örneğin risk $>1/50$) invaziv tanı testi önerilir. Düşük riskli gruba (örneğin risk $<1/1000$) ikinci trimester taraması uygulanmaz. Orta riskli bulunan gebelere ise (örneğin risk $1/50-1/1000$) ikinci trimester tarama testi yapılır ve nihai risk birinci ve ikinci trimester sonuçları entegre edilerek hesaplanır.^{24,59}

Wright ve ark. SURUSS çalışmasının verilerini kullanarak bu stratejiyi değerlendirmiştir. Down sendromu tespit oranı % 5 yanlış pozitiflik oranı ile % 94 olarak belirlenmiştir. Erken saptama oranı (birinci trimester) % 70 ve ikinci trimester taraması gerektiren gebe oranı ise % 15'tir.^{37,59}

Diğer tarama stratejilerine göre bu protokolün bazı avantajlara sahip olduğu görülmektedir. Yüksek tespit oranı ve düşük yanlış pozitiflik oranı, gebelerin büyük bir çoğunluğunun ilk trimesterde taramasının tamamlanması, hasta anksiyetesinin azalması ve test memnuniyetinin artması bunlar arasında sayılabilir.⁶¹

2.2.5.5. Tekrarlanan Ölçüm Taraması

Wright ve Bradbury 2005'te serum belirteçlerinin tekrarlanan ölçümleri kullanılarak Down sendromu taraması için matematiksel bir model geliştirmiştir.²⁴ Bu model daha az kullanışlı olan belirtecin gebelik süresince başka bir zamanda ölçülmesine dayanır. Bu tekrarlanan ölçümün kullanışlı olması için ikinci ölçümün ilki ile büyük ölçüde korele olması gerekmektedir.⁶⁶ Bu şekilde birinci trimester NT ölçümü ile birinci ve ikinci trimesterde uE₃ ve PAPP-A'nın tekrarlanan ölçümleri ile oldukça ümit verici bir yanlış pozitiflik oranı ile (% 0,3) % 85 saptama oranı elde etmişlerdir.⁶⁷ Wald ve ark.'nın SURUSS verilerinden her iki trimesterde AFP, uE₃, hCG, PAPP-A ve inhibin-A düzeylerinin ölçüldüğü vakalar kullanarak yaptıkları çalışmada % 0,67 yanlış pozitiflik oranı ile saptama oranını % 90 olarak bildirmişlerdir.⁶⁸

2.2.6. Halen Geliştirilmekte Olan Diğer Tarama Testleri ve Belirteçler

Son yıllarda Down sendromunun prenatal taramasındaki önemli gelişmelere rağmen yaklaşık % 2-4 oranında yanlış pozitiflik oranı ve yaklaşık % 5-10 yanlış negatiflik oranları ile günümüzde hala önemli sayıda gebeye yanlış bir şekilde güvence verilmekte veya gebeler gerekmediği halde invaziv prenatal tanıya yönlendirilmektedir. Bu nedenle Down sendromu tarama testlerinin saptama oranları ve yanlış pozitiflik oranlarının iyileştirilmesi gerekmektedir. Maternal kanda fetal DNA veya fetal hücreler kullanılarak invaziv olmayan Down sendromu taraması için halen devam eden birçok çalışma mevcuttur. Down sendromu taraması için daha ucuz ve kolay uygulanabilir başka bir yol ise serumda ölçülebilecek yeni çoklu belirteçlerin geliştirilmesidir.⁶⁹ ADAM 12, ProMBP, PLGF, SP1 ve hPL üzerinde çalışmalar yapılan belirteçlerdir.^{7,8}

2.2.6.1. Maternal Kanda Fetal Hücreler ve Serbest Fetal DNA

Maternal dolaşımında fetal hücreler ilk defa 1863 yılında Schmorl tarafından yayınlanmıştır. Schmorl eklampsi komplikasyonları nedeniyle ölen bir kadının akciğer dokusunda trofoblastların varlığını rapor etmiştir. Ancak maternal dolaşımdaki fetal hücrelerin klinik uygulaması bir yüzyıldan fazla zaman almıştır. 1997'de Lo ve ark.'nın maternal plazmadaki serbest fetal DNA'yı göstermesi ile invaziv olmayan prenatal tanı hızla gelişme göstermiştir. 2000 yılında ise Poon ve ark. tarafından maternal plazmada fetal mRNA tanımlanmıştır. Serbest fetal DNA ve fetal mRNA fetüs kaynaklı değil, plasental trofoblast kaynaklıdır.⁷⁰ Serbest fetal DNA maternal plazma DNA'sının yaklaşık % 3-6'sını oluşturur ve doğumdan sonra 16 dakikalık yarılanma süresi ile 2 saat içinde maternal plazmadan temizlenir.⁷¹ Hücresel DNA'nın aksine serbest fetal DNA tüm kromozomlar yerine kısa DNA parçalarından oluşmaktadır. Gebeliğin 4. haftasından itibaren tespit edilirse de 7. haftadan itibaren güvenilir sonuçlar elde edilir.⁷²

Literatürde birçok farklı yöntem tanımlanmış olmasına rağmen bugüne kadar maternal dolaşımdaki fetal nükleik asitleri kullanarak fetal anöploidilerin saptanması için bir konsensus oluşturulamamıştır.⁷²

2.2.6.2. ADAM 12

Plasenta tarafından sentezlenen ve gebelik boyunca miktarı giderek artan bir glikoproteindir. IGF-BP-3 ve 5 üzerinde proteolitik etki gösterir. Hücre adezyonunda, myojenik ve adipojenik transformasyonda, apoptozda, hücre füzyonunda ve IGF-1, IGF-2 ve diğer büyüme faktörlerinin biyoyararlanımını ve lokal etkilerinin düzenlenmesinde rol alır. Bu nedenle plasentanın ve fetusun büyümesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.⁷³

Yapılan çalışmalarda trizomi 21, trizomi 18 ve diğer anöploidili gebeliklerde birinci trimesterde ADAM 12 düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.⁷⁴⁻⁷⁷ Ancak bazı çalışmalarda ise düzeylerinin çok da fazla azalmadığı belirtilmiştir. Bu nedenle ADAM 12'nin birinci trimester taramasındaki rolünün belirlenebilmesi için daha geniş çalışmalar gerekmektedir.^{78,79} İkinci trimesterde ise ADAM 12 düzeylerinin Down sendromlu gebeliklerde arttığı gösterilmiş ve testin saptama oranını artırırken yanlış pozitiflik oranlarını azalttığı bildirilmiştir.^{80,81}

2.2.6.3. İnsan Plasental Laktojeni

191 aminoasitten oluşan tek zincirli bir polipeptiddir. hPL'nin yapısı GH ile ileri derecede (% 96) ve prolaktin ile daha az (% 67) homoloji gösterir. Bu nedenle güçlü büyümeyi uyarıcı ve laktojenik özellikleri vardır. Doğuma yakın dönemde hPL'nin günde 1-2 grama ulaşan miktarlarda salgılanması, insanlarda bilinen tüm hormonlardan daha yüksektir. Fizyolojik olarak hPL'nin laktojenik, metabolik, somatotropik, luteotropik, eritropoietik ve aldosteron uyarıcı gibi pek çok biyolojik aktivitesi vardır. Geçmişte hPL fetusun genel olarak iyiliğini değerlendirmek için kullanılmıştır.⁴⁰

Gebelik süresince hPL sinsisyotrofoblastlarda sentezlenir ve direk olarak maternal dolaşıma salınır. Down sendromlu gebeliklerin plasentalarında, in vitro koşullarda trofoblastların sinsisyotrofoblastlara farklılaşmasının bozulduğu, bu nedenle hPL sentezinin belirgin olarak düştüğü ve maternal serum konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir.⁸²

Christiansen ve ark. 8-13. haftalar arasında yapılan ölçümlerde Down sendromlu gebeliklerde hPL düzeylerini 0,63 MoM olarak belirlemişler, PAPP-A ve hCG ile birlikte kullanıldığında testin saptama oranını arttırdığını ve birinci trimester taramasında yeni bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmişlerdir.⁷

2.3. Prenatal Tanı

Down sendromunun prenatal tanısı ilk kez Valenti ve ark. tarafından Steele ve Berg'in 1966'da amniyon hücrelerini üretmeyi başardıktan 3 yıl sonra rapor edilmiştir.⁸³ Prenatal tanı için günümüzde halen en yaygın endikasyon artmış fetal trizomi 21 riskidir.⁸⁴ Maternal yaş, anormal serum biyokimyasal belirteçleri veya anormal ultrason bulguları nedeniyle kromozomal anomalili fetus taşıma riski yüksek bulunan gebelere amniyosentez, CVS veya kordosentez uygulanır.⁸⁵ Elde edilen fetal hücreler ile kromozom sayılarının ve yapısal değişikliklerinin belirlendiği ve kromozom anomalilerinin tespiti için altın standart olarak kabul edilen karyotip analizi yapılır.⁸⁶ Karyotip analizinin tanısallık duyarlılığı amniyon hücrelerinde % 99,4-99,8 iken villöz hücrelerde % 97,5-99,6'dır.⁸⁷ Ancak karyotiplemenin başlıca dezavantajı hücre kültürü için gerekli olan 10-14 günlük raporlama süresidir.⁸⁸ Fetal hücre kültürü ihtiyacını aşmak ve dolayısıyla kromozom anomalilerinin hızlı tanısını sağlamak için 1990'lı yılların başlarında FISH ve son zamanlarda QF-PCR prenatal tanı alanına girmiştir.⁸³

2.3.1. İnvaziv Prenatal Tanı Teknikleri

İnvaziv prosedürler fetal hücre veya dokuların direk olarak incelenmesini sağlamaktadır. Sitogenetik, moleküler ve biyokimyasal yöntemler sıklıkla kullanılan invaziv prenatal tanıda kullanılırlar. Gebelik için önemli derecede risk oluşturduğu için tüm endikasyonlar ve kriterler göz önünde bulundurulmalıdır.⁸⁹

2.3.1.1. Koryonik Villüs Örnekleme

CVS ilk defa 1970'lerin ortalarında Çin'de tanımlanmıştır. 1980'lerin başında ise tüm dünyada kullanılmaya başlanmıştır. CVS plasental dokunun aspirasyonu olarak tanımlanabilir. Aspirasyon gebeliğin 10-13. haftalarında ultrason eşliğinde perkutan transabdominal veya transvajinal/transservikal olarak yapılır.^{90,91} Onuncu haftadan önce CVS'in embryoda deformitelere sebep olması, vaginal kanama, enfeksiyon ve maternal hücre kontaminasyon riskinin yüksek olması nedeni ile, 11. gebelik haftasından itibaren transabdominal CVS tercih edilen yöntem olmuştur.⁹² Genel olarak CVS sonrası düşük riski % 0,5 - % 1,0 arasındadır.⁹¹

Koryon villus örneklemesinde göz önünde bulundurulması gereken bir konu maternal hücre kontaminasyonudur. Her CVS uygulamasından sonra hemen uygulanan

ayırma yöntemi ile bu risk tamamen bertaraf edilmelidir. Bu risk, yapılan çalışmalarda % 1 olarak verilmektedir. Koryon villus örneklemesinde karşılaşılan problemlerden biri de plasentaya sınırlı mozaizmdir; embriyogenez esnasında ekstraembriyonik dokularda nondisjunction sonucu anöploidi meydana gelmesi ancak fetüste mevcut olmaması durumudur. Koryonik villus örneklemesinde kromozomal mozaizm görülme sıklığı ortalama % 1 olarak bildirilmektedir. Bu durumda tanı amniyosentez ya da fetal kan örnekleme ile doğrulanmalıdır.⁹²

2.3.1.2. Amniyosentez

Amniyosentez fetal kromozomal patoloji araştırılmasında en sık kullanılan invaziv tanı yöntemidir. Amniyosentez ince bir iğne ile annenin abdominal duvarından geçilerek, gebelik kesesi içerisinden amniyon sıvısının aspirasyon işlemidir. Steele ve Breg'in 1966 yılında amniyotik sıvı kültüründe karyotipleme yapmayı başarmalarının ardından, 1967 yılında Jacobson ve Barter başarılı amniyosentez vakalarını yayınlamışlardır. Bu gelişmelerden sonra amniyosentez fetal genetik tanıda kullanılan en önemli girişim olmuştur.⁹³ Amniyosentez işlemi gebeliğin 15-18. haftalarında yapılmaktadır. Bu dönemde laboratuvar hata oranlarını en aza indirecek yeterli sayıda fetal hücre elde edilebilecek şekilde 20 mL'ye ulaşan miktarlarda amniyon sıvısı elde edilebilir.⁹⁰ Gebeliğin 15-18. haftalarında yapılan amniyosentez sonrası düşük riski % 0,25-% 0,50 arasındadır.⁹¹

2.3.1.3. Kordosentez (Perkutan Umbilikal Kan Örnekleme)

İl defa Daffos ve ark. tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır.¹¹ Gebeliğin 18. haftasından itibaren ultrason eşliğinde umbilikal venden kan alınması işlemidir.⁸⁹ Prenatal tanı için kordosentez hızlı fetal karyotipleme, fetal hematolojik hastalıkların değerlendirilmesi, fetal enfeksiyonların saptanması (kültür veya moleküler tipleme ile) ve fetal aneminin transfüzyon ile tedavisinde kullanılır. En sık görülen komplikasyonlar amniyonit ve transplasental hemorajidir.⁴¹

2.3.2. Prenatal Tanıda Altın Standart: Fetal Karyotip Analizi

Standart karyotip analizi 23 çift kromozomun sayısal ve yapısal olarak incelenmesi anlamına gelir. Kromozom anomalilerinin en sık görülenleri ayrılma

hataları ile ilişkilidir ve anne yaşı ile sıklıkları artar. Tüm hücrelerde veya mozaik şekilde fazladan bir kopya oluşumu veya bir kromozom kaybı ile sonuçlanırlar ve kolayca tespit edilebilirler.⁸³

Lenfositler, amniyon sıvısı, koryonik villüs, deri ve fibroblast içeren diğer dokular spontan bölünme hızı düşük olan hücrelerdir. Önce kültüre edilerek yapay uyarıcılarla mitoz bölünmeye sokulur, çoğaltılır ve daha sonra sitogenetik çalışmalar için kullanılırlar. Kültürlere mitozu durdurmak için kolçisin ya da demekolşin eklenir. Ardından hücre fazına hipotonik solüsyon eklenerek kromozomların birbirlerinden ayrılması sağlanır ve fiksatif ile yıkanır. Daha sonra elde edilen hücre fazı lamlara yayılarak boyanır. Normal kromozomların tanımlanması ve anormalliklerin tespiti için elde edilen preparatların çeşitli boyalar kullanılarak bantlama işlemi yapılır.^{94,95}

Tam karyotip analizi, önemli ölçüde teknik uzmanlık gerektirir. Laboratuvarla ilgili teknik gelişmelere ve kısmi otomasyona rağmen, işgücü maliyetleri hala önemlidir ve bir uzmanın güvenli bir şekilde üstesinden gelebileceği analiz sayısı sınırlıdır.⁸³

Fetal hücre kültürü ve analizin tamamlanması için gereken süre 10 ila 21 gün arasındadır. Bu sürecin genellikle psikolojik olarak ağır bir yük olduğu düşünülür ve patolojik bir tanıyı takiben gecikmiş gebelik sonlandırılmaları ile sonuçlanır. Bazı ülkelerde kromozom anomalilerinin ilk trimester tarama ve tanısına yönelik gerçekleştirilen değişiklikler, daha çok zaman faktörünün üstesinden gelmek amacıyla yapılan girişimlerdir.⁸³

2.3.3. Floresan in situ Hibridizasyon

Karyotip analizi klinik sitogenetik alanında temel yöntem olmasına rağmen son 20 yıl içerisindeki önemli teknik ilerlemelerden bir tanesi FISH yönteminin geliştirilmesidir.⁸⁸

Sitogenetik çalışmalarda kromozomlar metafazda değerlendirilirken kültür edilmemiş amniyositlerdeki (interfazda) kromozomlar geleneksel karyotiplerede görüntülenemezler. FISH tekniği, bölünmeyen interfaz hücrelerinde bile kromozomlardaki belirli nükleik asit dizilerinin tanımlanmasını sağlar. Böylece hücre kültürü gereksinimini ortadan kaldırarak daha hızlı bir tanı sağlar.^{96,97}

FISH, seçilen kromozomların belirli bölgelerine özgün floresan işaretli DNA dizilerinin (prop) DNA ile hibridizasyonunu ifade eder.⁸⁴ Önce prop ve hedef bölge çift

iplikli DNA'ları ısıtma işlemi ile tek zincir haline getirilir. Ardından hibridizasyon gerçekleşir, proplar ve hedef bölgenin tamamlayıcı tek iplikli dizileri bağlanır. Hibridizasyon sonrası yıkamanın ardından proplar floresan mikroskopu ile görüntülenirler.⁹⁸ Anöploidiler için fetal hücreler floresan mikroskopu ile incelendiğinde, normal olgularda analiz edilen kromozomların her biri için iki nokta görüntülenirken, trizomiler ekstra bir nokta varlığı ve monozomiler bir noktanın yokluğu ile belirlenir.⁸³ Anöploidilerin tespitinde ticari olarak mevcut kitler kullanılarak FISH'in son derece duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir.⁸⁷

İnterfaz hücrelerinin FISH ile analizi hücre kültürüne ihtiyacı ortadan kaldırır ve tüm sitogenetik değerlendirmeden önce başlangıçta hızlı bir tarama sağlar, böylece tanı için gerekli zamanı azaltabilir. Fakat bu teknik nisbeten yoğun emek ve teknik uzmanlık gerektirir. Ayrıca dengeli yeniden düzenlenmeleri ve kullanılan prop setine karşılık gelen tamamlayıcı dizilerden başka kromozomal segmentleri içeren dengesiz bozuklukları tespit edemez. Prenatal olarak tanı konabilen major anöploidiler 13, 18, 21 otozomal kromozomlar ile cinsiyet kromozomlarını içermekte, ancak diğer anöploidiler, mozaiklik ve yapısal anomaliler FISH ile tanımlanamamaktadır. Ayrıca dişi fetuslarda maternal kontaminasyonu açıklayamaması, maliyetinin yüksek olması, daha fazla örnek gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir.⁹⁸⁻¹⁰⁰

2.3.4. Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

QF-PCR, floresan işaretli primerler kullanarak kromozom spesifik polimorfik mikrosatellit belirleyicilerin çoğaltılmasını, bunu takiben spesifik kromozom materyalinin düzensizliklerini ve/veya kopya sayısı belirlemek için bir genetik analizörde ürünlerin kantitatif analizini içerir.¹⁰¹ Bu yaklaşım ilk defa X kromozom anöploidisinin tanımlanması için kullanılmış, daha sonra diğer sık görülen anöploidilerin tanısını kapsayacak şekilde değiştirilmiştir.¹⁰² Anöploidilerin tanısı için STR belirteçleri kullanılarak QF-PCR analizi ilk defa 1993 yılında Mansfield tarafından yapılmıştır.¹⁰³ 1993'ten bugüne STR dizileri kullanılarak QF-PCR analizi ile seçilmiş kromozom anöploidilerinin hızlı ve kesin tanısının gerçekleştirildiği bir çok çalışmada gösterilmiştir.^{104,105} Bu çalışmalarda QF-PCR'ın geleneksel sitogenetik çalışmalar ile

yanlış pozitiflik olmadan ve çok düşük yanlış negatif oranları ile oldukça uyumlu olduğu belirlenmiştir.^{85,106,107}

2.3.4.1. Prensip

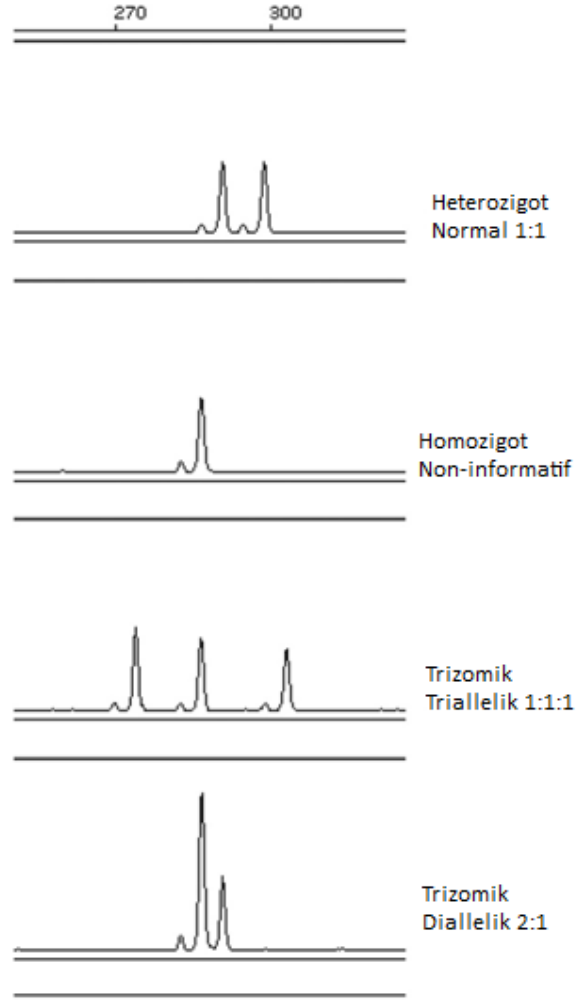
QF-PCR yöntemi her kromozom için özgül ve son derece polimorfik STR belirteçlerin varlığına dayanır. Mikrosatellit veya basit dizi tekrarları olarak bilinen STR, 2-7 baz uzunluğunda tekrar birimlerinden oluşan DNA dizileridir. Bir STR lokusunun polimorfik karakteri alleller arasındaki ardışık tekrarlayan birimlerin sayısının farklılığından kaynaklanır. Böylece polimorfik STR amplifikasyonu farklı uzunluklarda PCR ürünü ile sonuçlanır. Bu nedenle, bireylerin büyük bir kısmı bu belirteçlerin her biri için heterozigot olacaktır. Bir örnekteki allellerin sayısı, her kromozoma özgü STR belirteçlerinin floresan işaretli primerler kullanılarak amplifikasyonu ve takiben PCR ürünlerinin otomatik DNA dizi analizöründe kantitatif analizi ile belirlenebilir. Normal bireylerden alınan örneklerde, PCR ürünleri her bir özgün STR lokusunda bulunan 2 allele karşılık gelen benzer floresan yoğunluğunda ve 1:1 oranında iki pik gösterecektir. Polimorfizmin derecesine bağlı olarak bazen herhangi bir STR belirteci için homozigot olan durumlar gözlenebilir. Trizomik örnekler ya 1:1:1 oranında floresan yoğunluğu olan 3 pik ya da 2:1 oranında floresan yoğunluğu olan 2 pik oluştururlar (Şekil 3). Üç pikten oluşan triallelik patern 3 farklı STR allelin varlığını gösterirken, iki pikten oluşan diallelik patern ise iki özdeş allel ve üçüncü farklı bir allele karşılık gelir. Anöploidilerin sık görüldüğü kromozomların her biri için özgün birkaç belirtecin kullanılması ile non-informatif sonuç elde edilme olasılığı düşüktür.¹⁰⁸

2.3.4.2. Analiz

Örnek DNA floresan primerler kullanılarak amplifiye edilir. Gene-Scan Analiz yazılımına sahip otomatik DNA dizi analizi cihazı kullanılarak tekrar uzunlukları pik alanları şeklinde kantitatif olarak belirlenir.⁸⁴

Genescan analiz, PCR örneklerinin içerdiği belirli dizilerin miktarını ve boyunu karşılaştırmak için kullanılan kapiller elektroforez yöntemidir. Bu cihazlar anot ve katot kutuplar arasında uzanan bir kapiller, sıcaklığı sabit tutacak bir ısıtıcı bölge ve anot uca yakın bir bölgede lazer ışık kaynağı ile CCD kameradan oluşur. Kapillerin içine polimer dolduran bir şırınga ve her iki kutupta elektrik geçirgenliği sağlayacak tampon

hazneleri bulunmaktadır. Her bir örnek için yeniden polimerle doldurulan kapiller, örnek tüpüne girdiğinde PCR ile çoğaltılmış ve denatüre edilmiş DNA fragmanlarını elektrokinetik yöntemle kapiller içerisine alır ve bu aşamadan sonra sabit voltaj ve sabit sıcaklıkta anot kutba doğru hareket eden DNA fragmanları kapillerin silika ile kaplanmamış bölgesinden geçerken lazer ışığını bağılandıkları primerin rengine göre değişik dalga boylarında yansıtılarak CCD kamera tarafından algılanırlar.¹⁰⁹



Şekil 3. STR belirteçleri kullanarak QF-PCR analizi ile trizomilerin tespiti⁸⁸

DNA'nın algılayıcı sistem tarafından tanınması floresan boyalı primerler sayesinde olmaktadır. Bu amaçla primerler dört ve daha fazla, farklı renkte floresan boya ile boyanmaktadır. Uygun bilgisayar yazılımı tarafından değerlendirilen bu veriler ekranda büyüklük ve yoğunluğu ifade eden pikler şeklinde belirir. Bu pikler bahsedilen yazılım tarafından daha önce bu yazılıma tanıtılan floresan boyalı ve fragman büyüklüğü bilinen standartlarla karşılaştırılarak değerlendirilmektedir.¹⁰⁹

QF-PCR analizinde her kromozom için en az 4 STR belirteci kullanılmalıdır (Tablo 6). Analiz tasarlanırken multipleks PCR'ın temel ilkeleri göz önünde bulundurulmalıdır. Primerler 22 bp'den uzun olmamalı, tekrarlayan dizilerin homolojisinden ve primer dimer etkileşimlerinden kaçınılmalıdır. Gölge bantların (stutter; gerçek allel boyutundan daha küçük, 1-3 tekrar üniteleri olan çoğaltılmış diziler) oluşumunu önlemek için 3-6 nükleotidlik tekrarlayan diziler kullanılmalıdır. Ayrıca tüm belirteçler kullanılan popülasyonda yüksek heterozigotluk göstermelidir.^{110,111}

Tablo 6. Anöploidilerin tanısında kullanılan bazı STR belirteçleri^{84,85,112}

Adı	Boyut	Primer dizisi
D21S1414	≥ 291	GGC ACC CAG TAA AAA ATT ACT (F) CTG TCT GTC TGT CTG TCT ATC (R)
D21S1411	≥ 239	ATG ATG AAT GCA TAG ATG GAT G (F) AAT GTG TGT CCT TCC AGG C (R)
D21S1435	163-187	CCC TCT CAA TTG TTT GTC TAC C (F) GCA AGA GAT TTC AGT GCC AT (R)
D21S1412	384-414	CGG AGG TTG CAG TGA GTT G (F) GGG AAG GCT ATG GAG GAG A (R)
D18S391	≥ 182	CTG GTT TTC GTC TTG AGA AG (F) CAC TAT TCC CAT CTG AGT CA (R)
D18S535	126-156	TCA TGT GAC AAA AGC CAC AC (F) AGA CAG AAA TAT AGA TGA GAA TGC A (R)
D18S386	330-387	TCA GGA GAA TCA CTT GGA AC (F) TCC ATG AAG TAG CTA AGC AG (R)
D18S499	150-178	CTG CAC AAC ATA GTG AGA CCT G (F) AGA TTA CCC AGA AAT GAG ATC AGC (R)
D18S1002	286-318	CAA AGA GTG AAT GCT GTA CAA ACA GC (F) CAA GAT GTG AGT GTG CTT TTC AGG AG (R)
D18S858	193-211	AGC TGG AGA GGG ATA GCAT T (F) TGC ATT GCA TGA AAG TAG GA (R)
D13S631	189-223	GGC AAC AAG AGC AAA ACT CT (F) TAG CCC TCA CCA TGA TTG G (R)

Tablo 6 devamı. Anöploidilerin tanısında sıklıkla kullanılan STR belirteçleri

Adı	Boyut	Primer dizisi
D13S634	≥ 375	TCC AGA TAG GCA GAT TCA AT (F) CCT TCT TCT TCC CAT TGA TA (R)
D13S258	230-267	ACC TGC CAA ATT TTA CCA GG (F) GAC AGA GAG AGG GAA TAA ACC (R)
D13S305	430-465	GCC TGT TTG AGG ACC TGT CGT TA (F) TGG TTA TAG AGC AGT TAA GGC AC (R)
D13S742	≥ 364	TCC AGC CTG GTC AAC ACAG (F) TCC AGA CTT CCC AAT TCA GG (R)
D13S628	≥ 247	ACG CCA CTT TTC TAA ATG CC (F) GGA GTA ACA AAT AGC AAG GCT (R)
AMXY	X-432,Y-250	CTG ATG GTT GGC CTC AAG CCT (F) ATG AGG AAA CCA GGG TTC CA (R)
X22	189-242	TAA TGA GAG TTG GAA AGA AA (F) CCC ATT GTT GCT ACT TGA GA (R)
SBMA	142-178	TCC GCG AAG TGA AGA AC (F) CTT GGG GAG AAC CAT CCT CA (R)
DXS6803	106-125	GAA ATG TGC TTT GAC AGG AA (F) CAA AAA GGG ACA TAT GCT ACT T (R)
DXS6809	242-274	TGA ACC TTC CTA GCT CAG GA (F) TCT GGA GAA TCC AAT TTT GC (R)
DXS8377	203-245	CAC TTC ATG GCT TAC CAC AG (F) GAC CTT TGG AAA GCT AGT GT (R)
SRY	248	AGT AAA GGC AAC GTC CAG GAT (F) TTC CGA CGA GGT CGA TAC TTA (R)

2.3.4.3. Sonuçların Yorumlanması

Analiz sonuçlarının kantitatif değerlendirmesi, elektroforetogramdaki özgül pik ölçümleri ile yapılır. Allel oranlarını hesaplamak için pik alanı, pik yüksekliği veya her iki ölçüm birlikte kullanılabilir. Allel oranı hesaplanırken boyu daha kısa olan allelin alan/yüksekliği daha uzun olan allelinkine bölünür.¹¹⁰

Normal heterozigotlarda allel oranı 0,8-1,4'ü geçmemelidir. Ancak 24 bç'den daha fazla ayrılmış olan alleller için, allel oranı 1,5'e kadar normal kabul edilebilir. Trizomik olgularda ise, 0,45-0,65 ya da 1,8-2,4 (~1:2/2:1) oranı gösteren iki pik (trizomik diallelik) ya da floresan yoğunlukları eşit (~1:1:1) üç pik (trizomik triallelik) görülür. Allel oranları verilen sınırların dışında kalan (0,65-0,80 ile 1,4-1,8 arasında) değerler, trizomiye göstermeyen ekstra piklere sahip belirteçler (pik alanlarının farklı olması gibi) ve sıradışı gölge bantlar gibi nadir özellikler sergileyen belirteçler yetersiz olarak sınıflanır.^{101,110}

Sonuçlar yorumlanırken önemli bir nokta ise bir kromozomdaki tüm belirteçlerin tutarlılık göstermesidir. Herhangi bir STR belirtecinde sadece bir allel bulunması homozigotluğu gösterir ve non-informatif olarak tanımlanır. Bir sonucun normal olarak değerlendirilebilmesi için en az iki informatif STR belirteçine ihtiyaç vardır. Bu, primer bölge polimorfizmleri ve/veya somatik tekrar kararsızlığının sebep olacağı yanlış tanı riskini en aza indirir.^{101,110,113} Non-informatif olarak belirlenen kromozom için diğer STR belirteçleri kullanılarak tekrar analiz yapılabilir.¹⁰⁸

Eğer, sadece bir belirteç normal diallelik patern gösteriyor ve diğer belirteçler normal bir kromozom komplemanı ile uyumlu şekilde non-informatif ise, raporda sonucun tek belirteç sonucuna dayandığı ve bu sonucun teyit edilmesi gerektiği belirtildiği takdirde, tek belirteç sonuçlarını rapor etmek kabul edilebilir.¹¹⁰

Bir sonucu anormal olarak değerlendirmek için, diğer belirteçlerin non-informatif olmasına rağmen, triallelik genotiple uyumlu en az iki informatif belirteç sonucu gereklidir. Yalnızca bir belirteçle gösterilen bir sonucu anormal olarak değerlendirmek kabul edilemez.¹¹⁰

2.3.4.4. Avantajları

Anöploidilerin hızlı tanısında STR belirteçlerinin ve QF-PCR analizinin kullanılmasının tanısal değeri birçok çalışmada değerlendirilmiştir.¹⁰⁵ FISH analizi ile karşılaştırıldığında QF-PCR'in klinik uygulaması, seçilmiş major kromozom anomalilerini teşhis edebilmesi açısından aynı sınırlamalara sahiptir. Fakat klinik kullanılabilirliğini artıran birkaç avantajı vardır.^{101,104,112} Floresan primerlerle PCR amplifikasyonu hibridizasyondan daha duyarlıdır. Aynı zamanda küçük miktarlarda DNA ile çalışıldığında daha güvenilir ve tekrarlanabilir.¹⁰⁴

En önemli avantajlarından biri örneklerin kısa sürede analiz edilebilmesidir. DNA ekstraksiyonu, PCR amplifikasyonu ve analiz, floresan ürünlerin görüntülenmesi için hızlı bir DNA tarayıcı kullanılarak bir örnek 6 saat içinde çalışılabilir.¹⁰⁵

QF-PCR analizi için FISH'e göre daha küçük miktarlarda örnek yeterlidir.^{84,98,104} Test için az bir miktara ihtiyaç duyulması QF-PCR'ı, yavaş üreyen veya kontamine sitogenetik kültürler gibi, daha önce hızlı tanı planlanmamış vakalarda da uygulanabilir kılar. Etkinliği gebelik haftasından etkilenmez.¹⁰⁴

QF-PCR maliyet açısından FISH'e göre daha uygundur.⁸⁷ FISH tekniği, yoğun emek gerektirir ve floresan problemler pahalıdır. QF-PCR ile toplam maliyet FISH'in 1/3'ü kadardır.¹⁰⁶ Bu nedenle bu yöntem kullanılarak sınırlı sayıda örnek analiz edilebilir.¹¹⁴ QF-PCR ile eş zamanlı olarak çok daha fazla sayıda örneğin analiz edilmesi mümkündür.⁸⁷ Yöntem otomatize edilebilir ve 96 örnek aynı anda çalışılarak sonuçlar aynı gün verilebilir.⁹⁸

Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de maternal hücre kontaminasyonunun tespit edilebilmesidir. Hedef kromozomlar için ekstra alleller görülmesi veya pikler arasında beklenenin dışında oranların bulunması maternal hücre kontaminasyonu için karakteristik özelliklerdir. Bu bağlamda, QF-PCR diğer birçok DNA tabanlı yöntemden çok daha az hata gösterme eğilimindedir. Bu durumda, doğru tanı genellikle anne kan örneği profili ile dikkatli karşılaştırılma sonucunda elde edilebilir.^{84,98} FISH'in aksine, maternal hücre kontaminasyonunun neden olabileceği yanlış tanı ihtimali QF-PCR ile oldukça düşüktür ve bir yöntemin etkinliği ve klinik kullanımı için en önemli parametre olan saptama oranları buna bağlı olarak artmaktadır.¹¹²

2.3.4.5. Dezavantajları

QF-PCR yöntemi, yalnızca seçilmiş kromozom anomalilerini tespit edebilmesi yönüyle FISH'le aynı sınırlamalara sahiptir.^{104,115} Sadece 13,18,21. kromozomlar ile cinsiyet kromozomları analiz edildiği için en sık görülen bu anöploidilerin tanısı mümkün olmaktadır. Klinik olarak önemli kromozom anomalilerinin 1/13'üne QF-PCR ile tanı konamadığı belirlenmiştir. Bununla beraber QF-PCR, dengeli kromozom yeniden düzenlenmeleri ve anormal hücre sayısı % 30'un altında olan mozaiklikleri de tespit etmekte başarısızdır.^{83,116}

2.3.4.6. Güvenilirliği

Nicolini ve ark.⁸³ prenatal tanıda kromozom anomalilerinin tanısında QF-PCR'ın doğruluğuna dair 2004'e kadar yapılan çalışmalarını gözden geçirmiştir. Tablo 7'de şimdiye kadar yayınlanan ve Medline'da yer alan bu çalışmalardan trizomi 21'e ilişkin sonuçları göstermektedir.

Tablo 7. QF-PCR ile anöploidilerin prenatal tanısına ilişkin çalışmaların sonuçları⁸³

Referans	Analiz edilen örnek sayısı	Teşhis edilen trizomi sayısı / Gerçek trizomi sayısı
Verma ve ark. ¹⁰²	2139	32/33
Pertl ve ark. ¹⁰⁰	247	20/21
Pertl ve ark. ¹¹⁷	52	5/8
Schmidt ve ark. ¹¹²	662	14/15
Levett ve ark. ¹¹⁸	5000	98/102
Voglino ve ark. ¹¹⁹	1653	190/190
Bili ve ark. ¹²⁰	1084	19/22
Mann ve ark. ⁸⁴	5090	296/296
Cirigliano ve ark. ⁸⁴	3478	93/93
Leung ve ark. ¹²¹	235	57/57
Curcio ve ark. ¹²²	1277	42/42
Andonova ve ark. ¹²³	472	12/12
Quaife ve ark. ¹²⁴	1115	36/36
Toplam	22504	914/927 (% 98,6)

Tüm örneklerde QF-PCR, altın standart olarak görülen geleneksel sitogenetik analizle kombine olarak kullanılmıştır. QF-PCR farklı fetal dokularda (amniyon sıvısı, koryonik villüsler, fetal kan ve gebelik sonlandırılmalarından sonra elde edilen fetal dokular) uygulanmış ve analiz edilen her kromozom için en az iki belirteç kullanılmıştır.⁸³

Tablo 7’de yer alan 13 çalışmada toplam 22504 örnek gözden geçirilmiştir. Seçilmiş kromozomların (13, 18, 21, X ve Y) anöploidilerinin QF-PCR saptama oranları % 98,6 bulunmuştur. Trizomi 21’li olgular arasında bu oranın % 99,5 (548/551) olduğu görülmektedir. Yanlış negatiflik oranı cinsiyet kromozom anomalilerinde diğerlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur.⁸³

Dengesiz yapısal anomali içeren dokuz kromozomdan dördü teşhis edilebilmiştir. QF-PCR; dört halka kromozomu (ikisi kromozom 21, ikisi kromozom 18) ve kromozom 21’e ait bir tane dengesiz translokasyonu teşhis edememiştir. Mozaikliklerin yalnızca % 45’ine (anormal hücre oranının %30’dan fazla olduğu örnekler) doğru olarak tanı konmuştur.⁸³

Pek çok çalışma QF-PCR’la sonuç elde etmedeki başarısızlık oranlarını bildirmemişlerdir. QF-PCR’ın tek başına kullanılmasıyla, test edilemeyen kromozomlar

arasında klinik olarak anlamlı kaç anomalinin gözden kaçtığını bildiren yalnızca birkaç çalışmavardır.^{112,117-119,121,123,124} Bu verilere göre 9189 örnek içinde 386'sında mozaik olmayan otozomal kromozomal anomali görülmüş ve bunların 26'sı teşhis edilememiştir. Bu; her 15 anormal karyotipten birinin ve analiz edilen 353 örnekten birinin tanısının gözden kaçması demektir. Trizomi 13,18 ve 21 tanısındaki hatalar da göz önüne alınacak olursa (6/853) analiz edilen 13 örnekten birinin tanısının gözden kaçtığı anlamına gelir.⁸³

2.3.5. Multipleks Ligasyon Prop Amplifikasyonu

MLPA, bir örneğin tek bir reaksiyon tüpünde 50 kadar farklı genomik DNA veya RNA dizisindeki kopya sayısının tespitini sağlayan bir multipleks PCR yöntemidir.⁸⁸

MPLA için tipik olan hedeflenen dizilerin değil, MLPA proplarının hedef diziyile hibridizasyonunun çoğaltılmasıdır. Herbir MLPA probu iki adet floresan işaretli oligonükleotitten oluşur. Bu oligonükleotitler hedef diziyeye yakın bir şekilde hibridize olurlar. Hibridizasyondan sonra oligonükleotitler ligaz tarafından birleştirilirler. Böylece prop PCR ile amplifiye edilebilir. Tüm proplar sonlarında benzer PCR primer dizileri taşır. Bu da bir primer çifti ile eş zamanlı PCR amplifikasyonu sağlar. Amplifiye edilen ürünler 130 ile 480 bp arasındaki uzunluklarda değişir. Kapiller elektroforez ile bu fragmanlar uzunluk ve floresan yoğunluklarına göre ayrılırlar. Spesifik amplifikasyon ürünününün relatif miktarı, probun (dolayısı ile hedef genin) kopya sayısı ile ilişkilidir.⁸⁷

Sonuçlar normal kontrollerle karşılaştırılarak allel kopya sayısı şeklinde verilir. Eğer oran birse bu lokustaki DNA miktarı kontrol DNA ile aynıdır, yani diploiddir. Allellerin birinin yokluğunda oran 0,7'den küçük, allellerin duplikasyonunda ise oran 1,3'ten büyük olacaktır.⁸⁸

Yapılan birçok çalışmada MLPA'nın normal ve mozaik olmayan anöploidilerin tanısında güvenilir sonuçlar elde ettiği gösterilmiştir.¹²⁵⁻¹³⁰ Türkiye'de Yurdakul ve ark.'nın yaptığı çalışmada da testin duyarlılığı % 97 ve özgüllüğü % 100 olarak belirlenmiştir.¹³¹

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına Haziran 2009-Mayıs 2011 tarihleri arasında rutin analiz için başvuran birinci ve ikinci trimester tarama testleri incelendi.

Birinci trimester taraması için CRL ölçümleri esas alınarak saptanan gestasyonel yaş ile serum serbest β -hCG ve PAPP-A verileri ve NT ölçümü, ikinci trimester taraması için ise BPD ölçümleri esas alınarak saptanan gestasyonel yaş ile serum serbest β -hCG ve AFP verileri değerlendirildi. Biyokimyasal belirteçler Zamana Bağlı Kryptat Emisyonu (TRACE) teknolojisini kullanan ve ölçülecek olan analit ile kompleks oluşturarak floresans veren maddeler arasında non-radyoaktif enerji sinyal transferine dayalı immünometrik bir yöntem ile çalışan Kryptor (B.R.A.H.M.S., Almanya) cihazı ile ölçüldü. Risk hesaplaması birinci trimester için paket tarama programı Viewpoint (GmbH, Almanya), ikinci trimester için paket tarama programı SsdwLab5 (SBP Soft 2007, İspanya) ile yapıldı. Gebelik haftalarına göre olguların biyokimyasal belirteçler düzeyleri normal gebe popülasyonundaki belirteç düzeylerinin medyan değerleri ile karşılaştırılarak MoM değerleri hesaplandı. Her olgu için maternal yaşa bağlı trizomi riski ve hesaplanmış trizomi riski belirlendi. Hesaplanmış risk birinci trimester taramasında beklenen doğum tarihindeki anne yaşı, NT ve serum biyokimyasına bağlı olarak, ikinci trimester taramasında ise anne yaşı ve serum biyokimyasına bağlı olarak hesaplandı. Risk eşik değeri, Down sendromu için 1:300, trizomi 13-18 için 1:100 olarak kabul edildi.

hPL'nin fetal trizomiler için birinci ve ikinci trimesterde maternal serum belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirleyebilmek için öncelikle tarama testinde trizomi riski düşük olan gebelerde hPL'nin medyan değerleri belirlendi. Gebelik yaşı ile ölçülen hPL değerlerinin verdiği regresyon doğrusu ile gebelik yaşına uygun medyan değerleri hesaplandı. Belirlenenen bu medyan değerleri tarama testi pozitif olan olguların serum hPL MoM düzeylerini hesaplamak için kullanıldı.

Tarama testi pozitif bulunan gebelere prenatal tanı yapıp yapılmadığı takip edildi. Hasta bilgilerine öncelikle invaziv işlem kayıtları yoluyla ulaşıldı. Eksik kalan

bilgiler hastane arşivinden tamamlandı. Tarama testi pozitif bulunan ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde CVS, amniyosentez veya kordosentez yapılmış olan gebelerde ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalına hemoglobinoopatilerin prenatal tanısı için başvuran 35 yaş ve üstü gebelerde CVS materyallerinden QF-PCR ile anöploidi analizi yapıldı.

3.1. Serum hPL Düzeyi Ölçümü

hPL konsantrasyonları hPL enzim immunoassay ELISA test kiti (DRG Instruments GmbH, Almanya) kullanılarak ölçüldü. DRG hPL kiti sandviç prensibine dayalı bir katı faz ELISA analizidir. Kuyucuklar, hPL molekülündeki özgün bir antijenik bölgeye yönelik monoklonal antikorlar ile kaplıdır. Bir miktar hasta örneği enzim konjugat (peroksidaz ile konjuge edilmiş anti-hPL antikorları) ile bu kuyucuklarda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası bağlanmamış olan konjugat yıkanır. Bağlanan peroksidaz miktarı örnekteki hPL konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.1.1. hPL Kitinin İçerdiği Gereç ve Solüsyonlar

- Monoklonal anti-hPL antikorlar kaplı kuyucuklar içeren 96 testlik (12x8) *plate*
- **Standartlar;** 1,25-5,0-10,0-20,0 mg/dL'lik konsantrasyonlarda 4 adet standart (0,5 mL)
- **Zero standart;** Örnekleri seyreltmek için de kullanılan 0 mg/dL'lik standart (90 mL)
- **Enzim konjugat;** peroksidaz ile konjuge edilmiş anti-hPL antikorları (11 mL)
- **Substrat solüsyonu;** Tetrametilbenzidin (14 mL)
- **Stop solüsyonu;** 0,5 M H₂SO₄ (14 mL)

3.1.2. Test Protokolü

- Örnekler *zero* standart ile 1:100 oranında sulandırılır. Her örnek için 1 mL *zero* standart ve 10 µL serum karıştırılır.
- Kuyucuklara tüm standart ve dilüe edilmiş örneklerden 10'ar µL konur.
- 100 µL enzim konjugat eklenir ve 10 saniye karıştırılır.
- 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

- Kuyucukların içeriği hızlı bir şekilde silkeleyerek boşaltılır ve 5 kez distile su ile (her kuyucuk için 300 µL) yıkanır.
- Kuyucuklara 100 µL substrat solüsyonu eklenir.
- 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 50 µL *stop* solüsyonu eklenerek enzimatik reaksiyon durdurulur.
- *Plate*, ELISA okuyucusunda 450±10 nm dalga boyunda okunur.

3.2. QF-PCR Analizi

CVS, amniyosentez veya kordosentez materyallerinden genomik DNA izole edilerek anöploidi tayini için Aneufast (molGENTIX, İspanya) QF-PCR kiti kullanıldı. Amplifiye edilen ürünler Applied Biosystems 3130 Genetik Analizörü ile analiz edildi.

Kit seçilmiş mikrosatellitler ve Amelogenin-SRY bölgelerinin amplifikasyonu için 6 adet multipleks STR belirteç seti içermektedir. İki set (S1 ve S2) öncelikli olarak kullanılarak tek bir elektroforezde analiz edilebilir. Kromozoma özgü 4 belirteç seti (MXY, M21, M18 ve M13) ise S1 ve S2'deki belirteçlerin informatif olmaması durumunda yedek olarak kullanılır.

Aneufast QF-PCR Kiti, otomatik DNA fragman analizi için beş-boyalı floresan sistemi kullanır. Bu sistem, aynı anda on beş lokusun multipleks amplifikasyon ve kapiller elektroforezini sağlar. Florokromlar GS-50-LIZ boyut standardı ile birlikte kullanılmak üzere 6-FAM, VIC, NED ve PET içermektedir.

3.2.1. DNA İzolasyonu

3.2.1.1. Amniyon Sıvısından DNA İzolasyonu

Chelex 100 (InstaGene Matrix, BİO-RAD) kullanıldı. DNA izolasyon aşamaları aşağıdaki şekildedir;

- Amniyon sıvısı bir ependorf tüpüne konur ve 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilir.
- Hücrelerin miktarına göre 50-350 µL Chelex eklenir ve 10 saniye vortekslenir.
- 99°C'de 8 dakika inkübe edilir.
- 10 saniye vortekslenir ve 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilir.
- Süpernatanda bulunan genomik DNA, PCR için hazırdır.

3.2.1.2. CVS'ten DNA İzolasyonu

High Pure PCR Template Preparation kiti (Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemde hücreler Proteinaz K ve kaotropik tuz (guanidin-HCl) ile kısa bir inkübasyon ile parçalanır. Hücresel nükleik asitler filtre tüpündeki özel cam fiberlere bağlanır. Bağlanan nükleik asitler hızlı yıkama basamakları ile hücresel bileşenlerden temizlenir. Son olarak, düşük tuz elüsyonu cam fiberden nükleik asitleri serbest bırakır.

High Pure PCR Template Preparation kiti ile CVS'ten DNA izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Koryonik villüs örnekleri disseksiyon mikroskobu yardımı ile maternal dokulardan temizlenir.
- 1,5 mL'lik ependorf tüpüne konulan koryonik villüsler üzerine 400 µl CVS tamponu eklenir, 37°C'de bir gece beklemeye bırakılır.
- 350 µL örnek üzerine 350 µL *binding* tampon ve 50 µL Proteinaz K eklenir. 10 dakika 72°C'de inkübe edilir.
- Üzerine 200 µL izopropil alkol eklenir.
- Karışım filtre tüpüne konur ve toplama tüpü ile birlikte 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir.
- Toplama tüpü yenisi ile değiştirilir. Filtre tüpüne 750 µL *remove* tampon eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir.
- Toplama tüpü yenisi ile değiştirilir. Filtre tüpüne 800 µL yıkama tamponu eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. (2 kez)
- Son bir kez 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj edilir.
 - Toplama tüpü atılır. Filtre tüpü ependorf tüpüne konur. 70°C'ye ısıtılmış elüsyon tamponundan 100 µL eklenir ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir. Ependorf tüpünde DNA toplanmış olur.

3.2.1.3. Kordon Kanından DNA İzolasyonu

MagNA Pure LC (Roche Applied Science, Almanya) otomatik DNA izolasyon cihazı kullanıldı. İzolasyon yöntemi manyetik partikül teknolojisine dayanmaktadır. Örnekler kaotropik tuzlar ve proteinaz K içeren bir tamponla muamele edilerek parçalanır. Ortama manyetik cam partiküller eklenir ve DNA bunların yüzeyine

bağlanır. Bağlanmayan maddeler birçok yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılır. Saflaştırılmış DNA düşük derişimli tuz tamponu ile ayrıştırılır.

MagNA Pure LC yöntemi ile DNA izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Kordon kanından 500 µL örnek kartuşunun kuyucuklarına yerleştirilir. Ayıraçlar da proçes kartuşlarına dağıtılır.
- Parçalayıcı/Bağlayıcı tampon eklenerek tüm hücrelerin parçalanması sağlanır. Nükleik asitler serbest kalır, nükleazlar denature olur.
- Örneklere Proteinaz K eklenerek hücresel proteinler parçalanır.
- Kaotropik tuz varlığında izopropanol ve bağlayıcı tamponun yüksek iyonik gücüne bağlı olarak DNA'lar manyetik parçacıkların yüzeyine yapışır.
- Manyetik parçacığa bağlanmış DNA yıkama tamponlarıyla tekrar tekrar yıkanarak protein, hücre membranları, heparin ve hemoglobin gibi PCR inhibitörleri ile bağlı olmayan maddelerden uzaklaştırılırken, tuz derişimi azaltılır.
- Elusyon tamponu ile saflaştırılmış DNA'lar manyetik partiküllerden ayrıştırılır.

3.2.2. Aneufast QF-PCR Kiti ile Amplifiye Edilen Belirteçler

S1 ve S2 setleri 21, 18 ve 13 otozomlarının herbiri için 4 STR, iki psödootozomal STR (X22 ve DXYS218), Amelogenin (AMXY) ve SRY'nin aynı anda analizini sağlar. MXY, M21, M18 ve M13 setleri kromozomlardan herhangi birinin S1 ve S2 belirteçleri ile non-informatif olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Aneufast QF-PCR kitinde bulunan setlerin içerdiği belirteçler tablo 8'de gösterilmiştir.

3.2.3. PCR Protokolü

PCR bileşenleri tablo 9'da ve amplifikasyon prosedürü tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 8. Anefast QF-PCR kitinde bulunan 6 setin içerdiği belirteçler

S1	S2	MXY	M21	M18	M13
AMXY	SRY	SRY	D21S1411	D18S386	D13S631
D21S1414	X22	AMXY	D21S1435	D18S391	D13S634
D21S1446	DXYS218	HPRT	D21S1437	D18S858	D13S742
D13S631	HPRT	SBMA	D21S1412	D18S499	D13S628
D13S305	D21S1411	DXS6803	D21S1809	D18S1002	
D18S535	D21S1435	DXS6809			
D18S391	D13S634	DXS8377			
	D13S258				
	D18S386				
	D18S390				

Tablo 9. PCR karışımı

Multipleks PCR karışımı (S1/S2)	10 µL
DNA	1-10 ng
H ₂ O	15 µL'ye tamamlanır
Final PCR hacmi	15 µL

Tablo 10. PCR program

95°C	15 dk	Taq aktivasyonu	1 döngü
95°C	40 sn	Denatürasyon	
60°C	1dk 30 sn	Primer Bağlanması	25 döngü
72°C	40 sn	Zincir Uzaması	
60°C	30 dk	Son zincir uzaması	1 döngü

3.2.4. Örneklerin Yürütülmesi

Öncelikle her bir örnek için 40 µL Formamid ve 0,3 µL GS-50-LIZ boyut standardı olacak şekilde gereken miktarda karışım hazırlanır. Bu karışım fazla hazırlanarak 4°C'de saklanabilir. Daha sonra amplifiye edilen S1 ve S2 ürünlerinin her birinden 1,5 µL ve hazırlanan Formamid-GS-50-LIZ karışımından 40 µL (MXY, M21, M18 ve M13 setleri kullanılacaksa 20 µL) *plate*'e konur. Örnekler kullanım kılavuzuna göre genetik analizöre yüklenir.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizlerde SPSS v.18.0 ve Medcalc 10.1.6.0 paket programları kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Maternal Serum hPL Düzeyleri

Çalışmamızda, Haziran 2009-Mayıs 2011 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na rutin analiz için başvuran gebelerin birinci ve ikinci trimester tarama testleri takip edildi.

Birinci trimester tarama testinde anöploidi riski yüksek olarak belirlenen 23 gebe ve tarama testi negatif olan 85 gebe çalışmaya alındı. Gebelerin demografik bilgileri ve serum belirteç değerlerinin dağılımları Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Birinci trimester tarama grubundaki gebelere ait demografik veriler

	Düşük riskli grup			Yüksek riskli grup		
	Min.	Maks.	Medyan ±SEM	Min.	Maks.	Medyan ±SEM
Yaş	18	41	29 ± 0,51	27	41	32 ± 0,77
Gebelik yaşı (gün)	77	98	88 ± 0,52	78	98	87 ± 1,09
Ağırlık (kg)	38	107	63 ± 1,35	50	103	70 ± 2,76
Serbest β-hCG (IU/L)	7,69	247,55	38,55 ± 4,33	9,00	390,20	61,17 ± 15,95
Serbest β-hCG MoM	0,20	6,46	0,90 ± 0,10	0,28	11,09	1,62 ± 0,46
PAPP-A (IU/L)	0,116	9,205	2,579 ± 0,237	0,295	8,617	2,000 ± 0,443
PAPP-A MoM	0,04	3,83	0,79 ± 0,06	0,07	1,68	0,59 ± 0,09
NT (mm)	0,10	2,60	1,11 ± 0,40	0,80	4,59	1,20 ± 0,25

İkinci trimester tarama testinde anöploidi riski yüksek olarak belirlenen 51 gebe ve tarama testi negatif olan 84 gebe çalışmaya alındı. Gebelerin demografik bilgileri ve serum belirteç değerlerinin dağılımları Tablo 12'de gösterilmiştir.

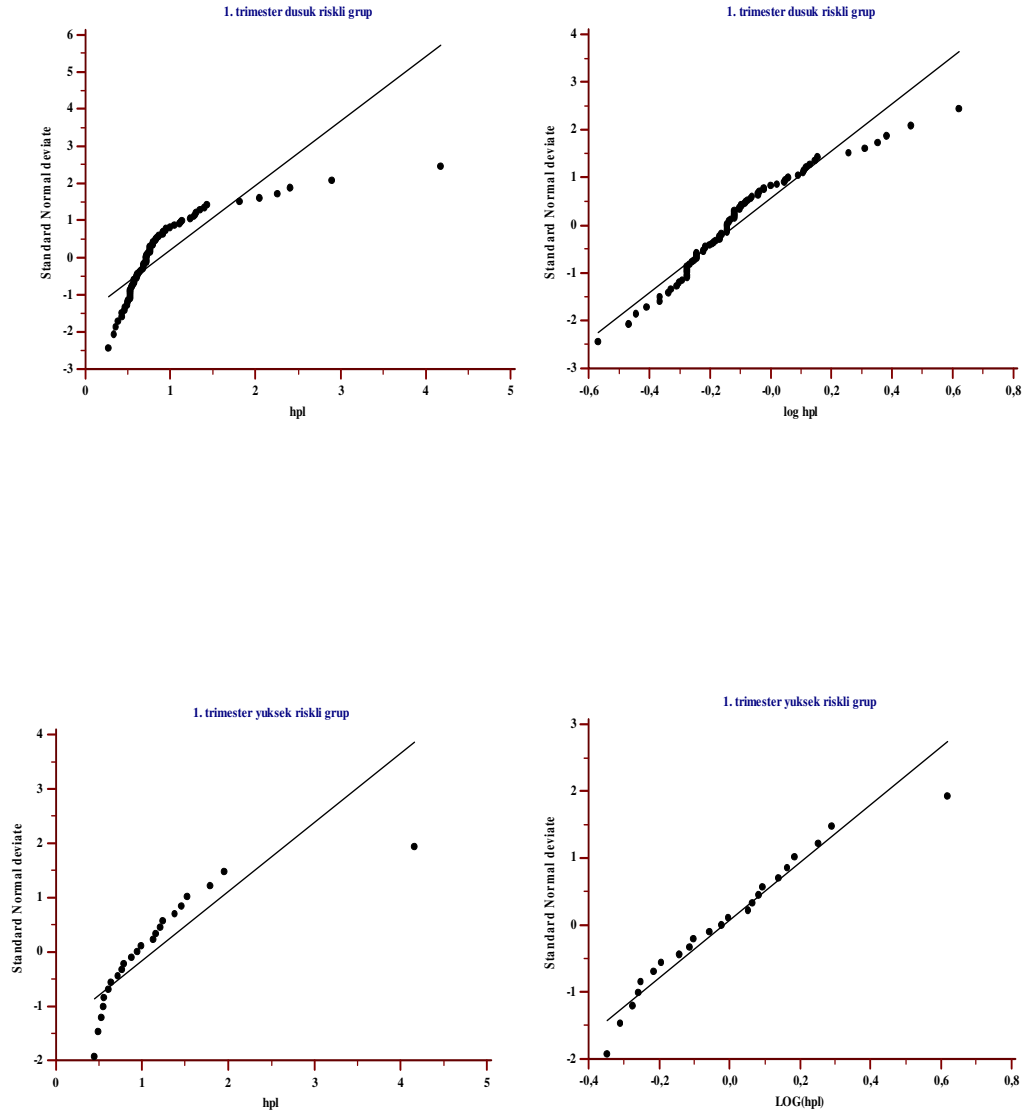
Tablo 12. İkinci trimester tarama grubundaki gebelere ait demografik veriler

	Düşük riskli grup			Yüksek riskli grup		
	Min.	Maks.	Medyan ±SEM	Min.	Maks.	Medyan ±SEM
Yaş	19	40	30 ± 0,48	18	41	30 ± 0,76
Gebelik yaşı (gün)	111	138	119 ± 0,66	111	131	120 ± 0,65
Ağırlık (kg)	46	102	67 ± 1,30	46	95	63 ± 1,65
Serbest β-hCG (IU/L)	1,05	44,35	12,70 ± 0,90	2,16	134,68	31,01 ± 3,79
Serbest β-hCG MoM	0,14	3,94	1,14 ± 0,08	0,22	14,12	3,00 ± 0,33
AFP (IU/L)	13,73	138,47	32 ± 1,95	14,28	81,73	28,48 ± 1,96
AFP MoM	0,43	3,09	0,89 ± 0,48	0,39	2,32	0,83 ± 0,05

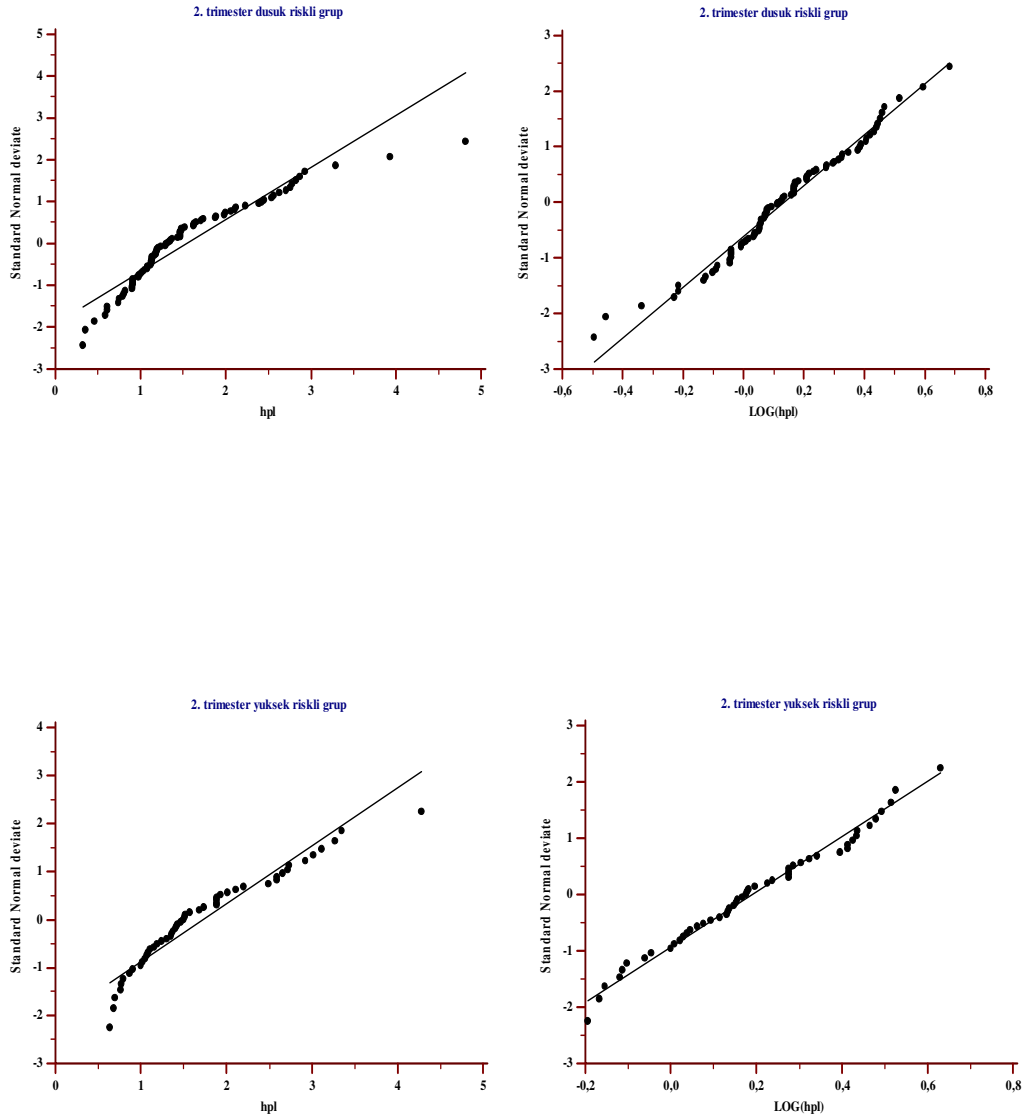
Şekil 4'te normal olasılık grafiklerinde de gösterildiği gibi birinci trimester için ölçülen hPL değerleri düşük ve yüksek riskli gruplarda normal dağılım göstermemektedir (D'Agostino-Pearson test; $p < 0,0001$).

Şekil 5'te ikinci trimester için hPL değerlerinin normal olasılık grafikleri gösterilmiştir. hPL değerleri düşük ve yüksek riskli gruplarda normal dağılım göstermemektedir (D'Agostino-Pearson test; düşük riskli grup $p < 0,0001$, yüksek riskli grup $p = 0,0194$).

Logaritmik dönüşüm normal dağılım sağladığı için (D'Agostino-Pearson test; 1. trimester düşük riskli grup $p = 0,075$, 1. trimester yüksek riskli grup $p = 0,1359$, 2. trimester düşük riskli grup $p = 0,4047$ 2. trimester yüksek riskli grup $p = 0,4933$) istatistiksel analizlerde logaritmik hPL değerleri kullanıldı.

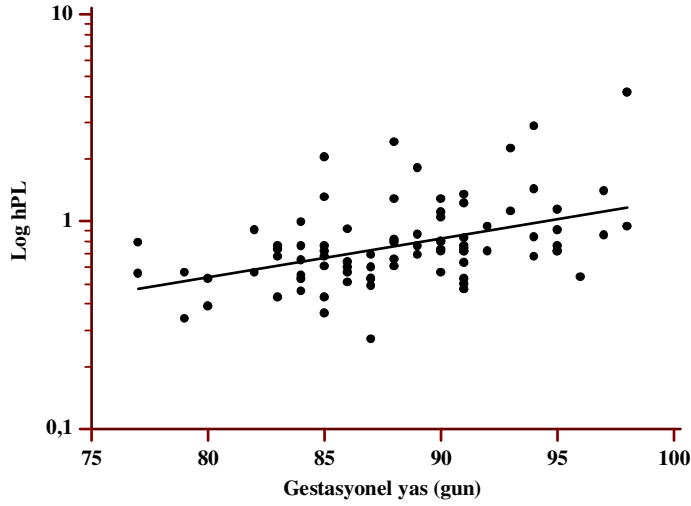


Şekil 4. Birinci trimester hPL ve log hPL değerlerinin normal olasılık grafikleri



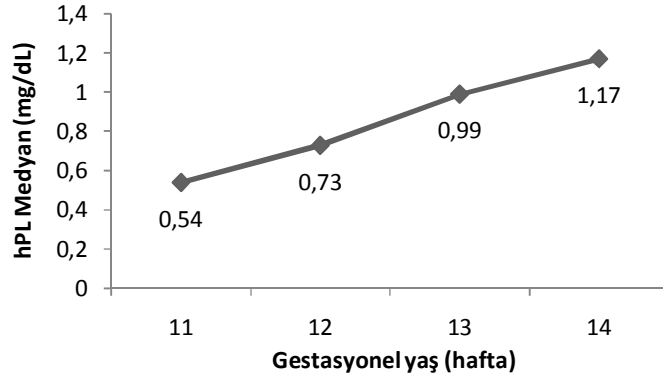
Şekil 5. İkinci trimester hPL ve log hPL değerlerinin normal olasılık grafikleri

Birinci trimester tarama testi negatif olan 85 gebede log hPL değerleri ile gebelik yaşının verdiği regresyon doğrusu ile her gebelik günü için medyan değerleri hesaplandı. Birinci trimester için gestasyonel yaş ve hPL'nin verdiği regresyon doğrusu ($\log \text{hPL} = 0,01865 * \text{gün} - 1,7594$) Şekil 6'da gösterilmiştir. Gestasyonel yaşla hPL konsantrasyonunun arttığı belirlendi ($r^2 = 0,196$, $p < 0,001$).



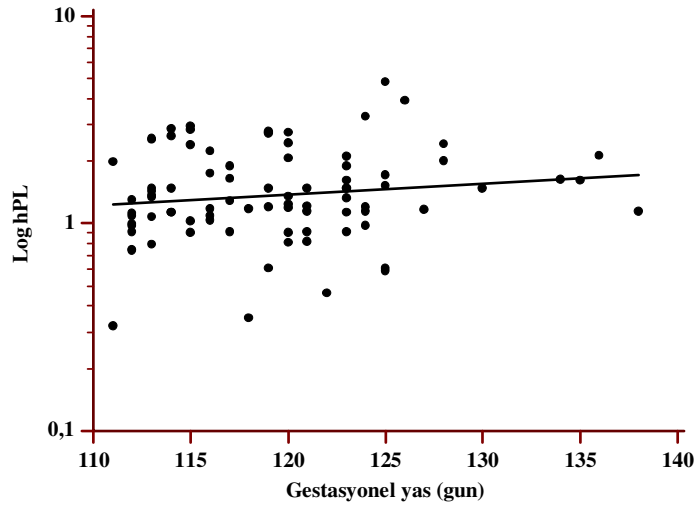
Şekil 6. Birinci trimester hPL değerlerinin (n=85) regresyon doğrusu ve saçılım grafiği

Gebelik haftalarına ait birinci trimester hPL medyan değerlerinin dağılımları Şekil 7'de gösterilmektedir.



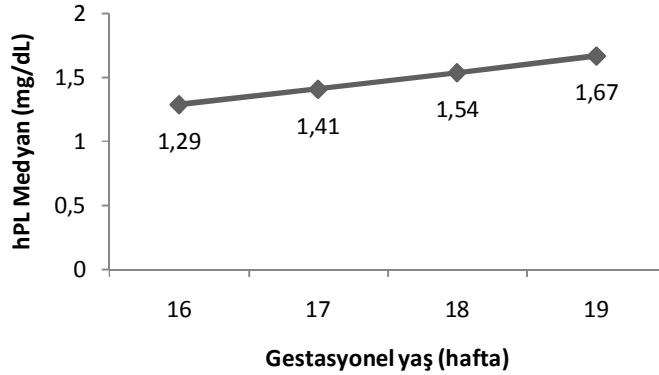
Şekil 7. Birinci trimester hPL düzeylerinin gebelik haftalarına göre medyan değerleri

İkinci trimester tarama testi negatif olan 84 gebede log hPL değerleri ile gebelik yaşının verdiği regresyon doğrusu ile her gebelik günü için medyan değerleri hesaplandı. İkinci trimester için gestasyonel yaş ve hPL'nin verdiği regresyon doğrusu ($\log \text{hPL} = 0,005332 * \text{gün} - 0,5016$) Şekil 8'de gösterilmiştir. hPL konsantrasyonunun gestasyonel yaşla değişmediği belirlendi ($r^2 = 0,021$, $p = 0,181$).



Şekil 8. İkinci trimester hPL değerlerinin (n=84) regresyon doğrusu ve saçılım grafiği

Gebelik haftalarına ait ikinci trimester hPL medyan değerlerinin dağılımları Şekil 9'da gösterilmektedir.



Şekil 9. İkinci trimester hPL düzeylerinin gebelik haftalarına göre medyan değerleri

Hesaplanan medyan değerleri, maternal serum hPL konsantrasyonlarını gebelik yaşına uygun MoM değerlerine dönüştürmek için kullanıldı. Düşük ve yüksek riskli gruplarda hPL MoM değerlerinin dağılımı tablo 13 ve tablo 14’te gösterilmiştir.

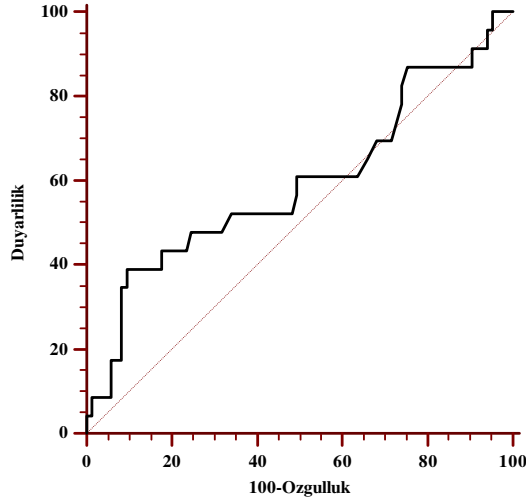
Tablo 13. Birinci trimester hPL MoM düzeylerinin dağılımı

hPL MoM	Düşük riskli grup	Yüksek riskli grup
≥ 1	35 (% 41)	12 (% 52)
0.9- 0.999	9 (% 11)	2 (% 9)
0.8- 0.899	19 (% 22)	4 (% 17)
0.7- 0.799	11 (% 13)	2 (% 9)
0.6- 0.699	6 (% 7)	1 (% 4)
0.5- 0.599	4 (% 5)	2 (% 9)
0.4- 0.499	-	-
0.3- 0.399	1 (% 1)	-

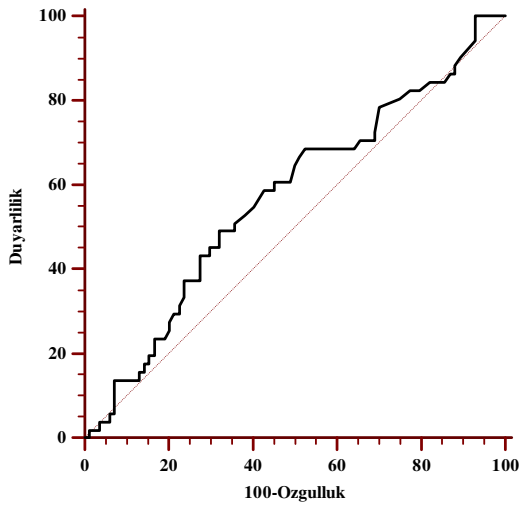
Tablo 14. İkinci trimester hPL MoM düzeylerinin dağılımı

hPL MoM	Düşük riskli grup	Yüksek riskli grup
≥ 1	39 (% 46)	31 (% 60)
0.9- 0.999	8 (% 10)	4 (% 8)
0.8- 0.899	12 (% 13)	5 (% 10)
0.7- 0.799	8 (% 10)	2 (% 4)
0.6- 0.699	8 (% 10)	4 (% 8)
0.5- 0.599	3 (% 4)	4 (% 8)
0.4- 0.499	3 (% 4)	1 (% 2)
0.3- 0.399	1 (% 1)	-
0.2- 0.299	2 (% 2)	-

hPL MoM deęerlerinin dūřuk ve yūksek risk ayırımı yapılmasındaki belirleyicilięi ROC eęrisi analizi ile arařtırıldı. Őekil 10'da birinci trimester için ve Őekil 11'de ikinci trimester için ROC eęrisi analizleri gōsterilmiřtir. Eęri altında kalan alanlar sırası ile 0,594 (% 95 Gūven Aralıęı=0,495-0,687, $p=0,1753$) ve 0,572 (% 95 Gūven Aralıęı=0,484-0,657, $p=0,1624$) olarak belirlendi.



Őekil 10. Birinci trimesterde dūřuk ve yūksek risk ayırımı yapılmasında hPL MoM için ROC analizi



Őekil 11. İkinci trimesterde dūřuk ve yūksek risk ayırımı yapılmasında hPL MoM için ROC analizi

Birinci trimester hPL MoM değerleri ile maternal yaş, maternal ağırlık, serbest β -hCG MoM, PAPP-A MoM ve NT düzeyleri arasındaki korelasyon incelendi. Bunlar arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi (Tablo 15).

Tablo 15. Birinci trimester hPL MoM düzeyleri ile diğer belirteçlerin korelasyon analizi

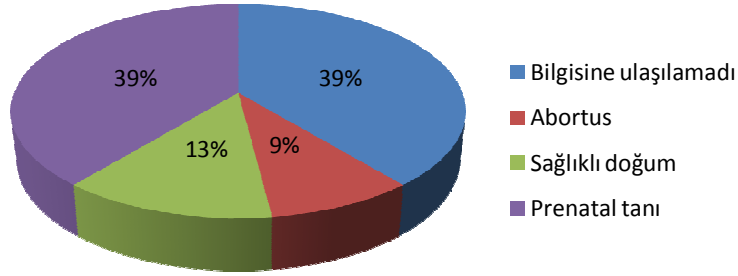
	Düşük riskli grup		Yüksek riskli grup	
	r	p	r	p
Maternal yaş	0,09	0,365	0,1582	0,471
Maternal ağırlık	-0,1471	0,1845	0,248	0,254
Serbest β-hCG MoM	-0,02	0,9849	0,3017	0,1618
PAPP-A MoM	0,21	0,0447	0,1952	0,3722
NT	-0,0272	0,8048	0,2052	0,3475

İkinci trimester hPL MoM değerleri ile maternal yaş, maternal ağırlık, serbest β -hCG MoM ve AFP MoM düzeyleri arasındaki korelasyon incelendi. Bunlar arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi (Tablo 16).

Tablo 16. İkinci trimester hPL MoM düzeyleri ile diğer belirteçlerin korelasyon analizi

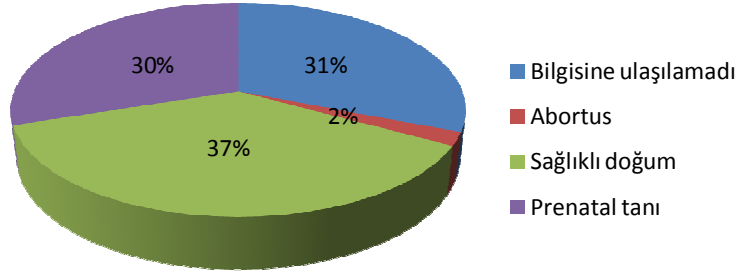
	Düşük riskli grup		Yüksek riskli grup	
	r	p	r	p
Maternal yaş	-0,129	0,2424	0,06	0,6756
Maternal ağırlık	-0,05322	0,637	0,3128	0,0464
Serbest β-hCG MoM	0,2060	0,0601	-0,05919	0,6799
AFP MoM	0,1381	0,2102	0,1642	0,2496

Birinci trimester taramasında yüksek riskli bulunan 23 gebeye prenatal tanı yapıp yapılmadığı takip edildi (Şekil 12). Gebelerden 9'unun bilgisine ulaşılamadı. İki gebeliğin abortusla sonlandığı ve prenatal tanı yaptırmayan 3 gebenin sağlıklı doğum yaptıkları belirlendi. Amniyosentez yapılan 9 gebenin 4'üne sitogenetik analiz, 5'ine ise QF-PCR analizi yapıldığı tespit edildi. Bu olguların 8'inde anöploidi saptanmamış olup, QF-PCR analizi yapılan bir olguda (Olgu 1) fetüsün karyotipinin 47,XX+21 olduğu belirlenmiştir. 39 yaşında ve 12 hafta+6 günlük gebe olan olgunun yapılan birinci trimester tarama testinde serum serbest β -hCG düzeyi 39,92 IU/L (1,32 MoM), PAPP-A düzeyi 2,000 IU/L (0,64 MoM), NT ölçümü 3,90 mm ve hesaplanan trizomi 21 riski 1:3 idi. Gebenin serum hPL düzeyi 0,64 mg/L ve hPL MoM değeri 0,77 olarak belirlendi. Bu değer düşük riskli grubun hPL MoM düzeylerinden anlamlı olarak farklı idi (Test for one mean $p < 0,0001$).



Şekil 12. Birinci trimester yüksek riskli olarak tespit edilen olgularda takip sonuçları

İkinci trimester taramasında yüksek riskli bulunan 51 gebeye prenatal tanı yapıp yapılmadığı takip edildi (Şekil 13). Gebelerden 16'sının bilgisine ulaşılamadı. Bir gebeliğin abortusla sonlandığı ve prenatal tanı yaptırmayan 19 gebenin sağlıklı doğum yaptıkları belirlendi. Amniyosentez yapılan 14 gebenin 4'üne sitogenetik analiz, 10'una ise QF-PCR analizi yapıldığı ve bu olgularda anöploidi olmadığı tespit edildi.



Şekil 13. İkinci trimester yüksek riskli olarak tespit edilen olgularda takip sonuçları

Gebelerden birinin ise (olgu 2) aynı zamanda hemoglobinopatiler yönünden prenatal tanı amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Prenatal Tanı Ünitesi'ne başvurduğu saptandı. Hemoglobinopatiler açısından yapılan moleküler analizlerde annenin genotipi belirlenemezken, fetüsün babanın IVS1-110 (G>A) mutasyonunu heterozigot olarak taşıdığı belirlendi. Annedeki mutasyonun fetüse aktarılması ihtimalinden dolayı aileye kordosentez önerildi. Kordon kanından yapılan sitogenetik analiz sonucu fetüsün karyotipinin 47,XX+21 olduğu tespit edildi. Fetüs talasemi tanısı almadan trizomi 21 nedeni ile gebelik sonlandırıldı.

Olgu 2, 32 yaşında ve 16 hafta+1 günlük gebe iken yapılan ikinci trimester tarama testinde serum serbest β -hCG düzeyi 47,81 IU/L (3,83 MoM), AFP düzeyi 32,89 IU/L (0,97 MoM) ve trizomi 21 riski 1:78 idi. Gebenin serum hPL düzeyi 1,89 mg/L ve hPL MoM değeri 1,50 olarak belirlendi. Bu değer düşük riskli grubun hPL MoM düzeylerinden anlamlı olarak farklı idi (Test for one mean $p < 0,0001$).

4.2. QF-PCR Analizi

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prenatal Tanı Ünitesi'ne Ekim 2009-Haziran 2011 tarihleri arasında hemoglobinopatiler yönünden prenatal tanı amacıyla rutin olarak başvuran 35 yaş ve üzeri 26 gebenin CVS materyallerinden, olgu 1'in amniyon sıvısından, olgu 2'nin ise kordon kanından QF-PCR analizi yapıldı.

Sonuçlar değerlendirilirken allel oranlarını hesaplamak için pik alanı kullanıldı. Allel oranı hesaplanırken boyu daha kısa olan allelin alanı daha uzun olan alleline

bölündü. Oran 1,4'e kadar normal, 1,4-1,8 arası yetersiz ve 1,8'in üzeri trizomik olarak ve tek pikler non-informatif olarak kabul edildi. Her kromozom için en az iki belirtecin bilgi verici olması (yetersiz ve non-informatif olmaması) halinde o kromozom normal olarak değerlendirildi.

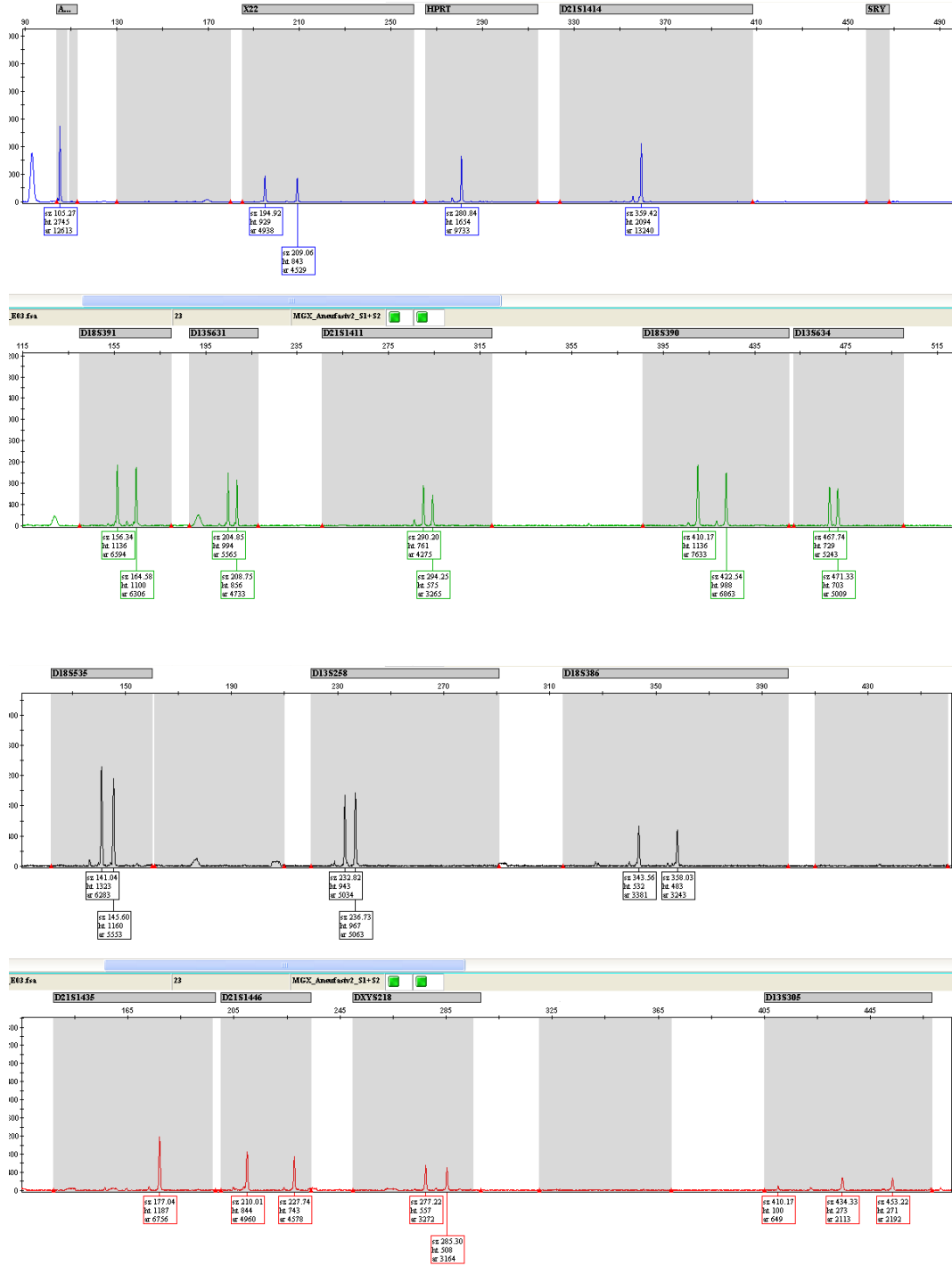
Şekil 14'te 46,XX ve şekil 15'te 46,XY olan birer örneğin elektroforetogram görüntüleri verilmiştir. 46,XX'li olgularda AMXY'nin X'e özgü olan tek piki vardır. SRY amplifiye olmaz. 46,XY'li olgularda ise AMXY'nin X ve Y'ye özgü her iki piki de 1:1 oranında izlenir. Erkek cinsiyet kromozomu varlığı SRY piki ile teyit edilir.

Şekil 16 ve 17'de sırasıyla olgu 1 ve olgu 2'nin QF-PCR analiz görüntüleri verilmiştir.

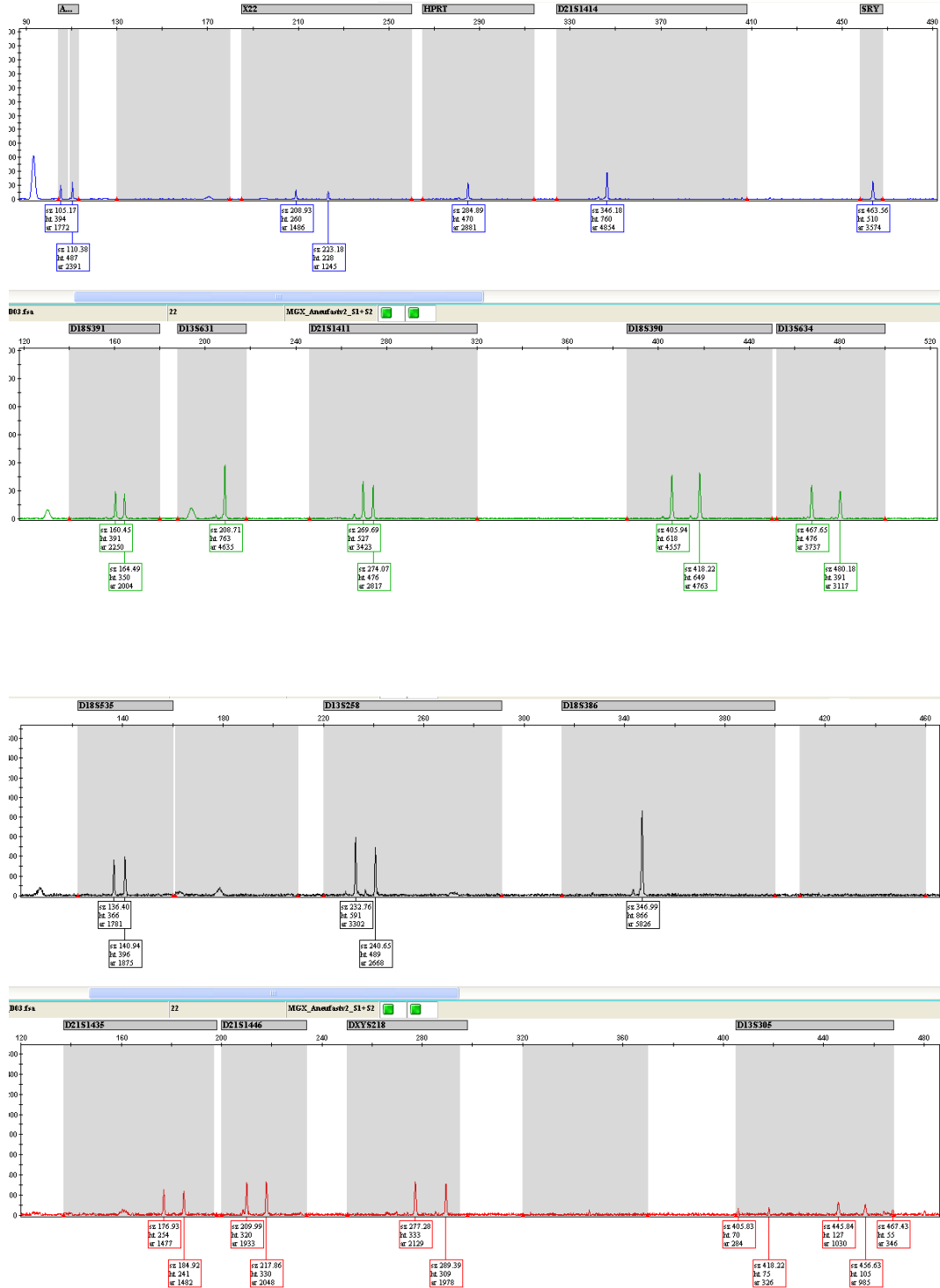
Olgu 1'de 21. kromozomdaki 3 belirteç (D21S1414, D21S1411, D21S1446) trizomik diallelik patern gösterirken, D21S1435 trizomik triallelik patern gösterdi. 18. kromozom belirteçlerinden D18S391 yetersiz (oran 1,54), D18S535 non-informatif iken D18S390 ve D18S386 normal dizomik kromozom paterni gösterdi. 13. kromozoma ait belirteçlerin 3'ü (D13S631, D13S634, D13S258) dizomik diallelik patern gösterirken, D13S305 non-informatif idi. AMXY'nin X'e özgü olan tek piki vardı ve SRY piki gözlenmedi. X22, HPRT ve DXYS218 belirteçleri dizomik diallelik patern gösterdi.

Olgu 2'de 21. kromozomdaki 3 belirteç (D21S1414, D21S1411 ve D21S1435) trizomik diallelik patern gösterirken, D21S1446 belirtecinin allel oranı yetersiz idi (1,70). 18 ve 13. kromozom belirteçlerinin hepsi dizomik diallelik patern gösterdi. AMXY'nin X'e özgü olan tek piki vardı ve SRY piki gözlenmedi. X22 ve HPRT dizomik diallelik patern gösterirken DXYS218 non-informatif idi.

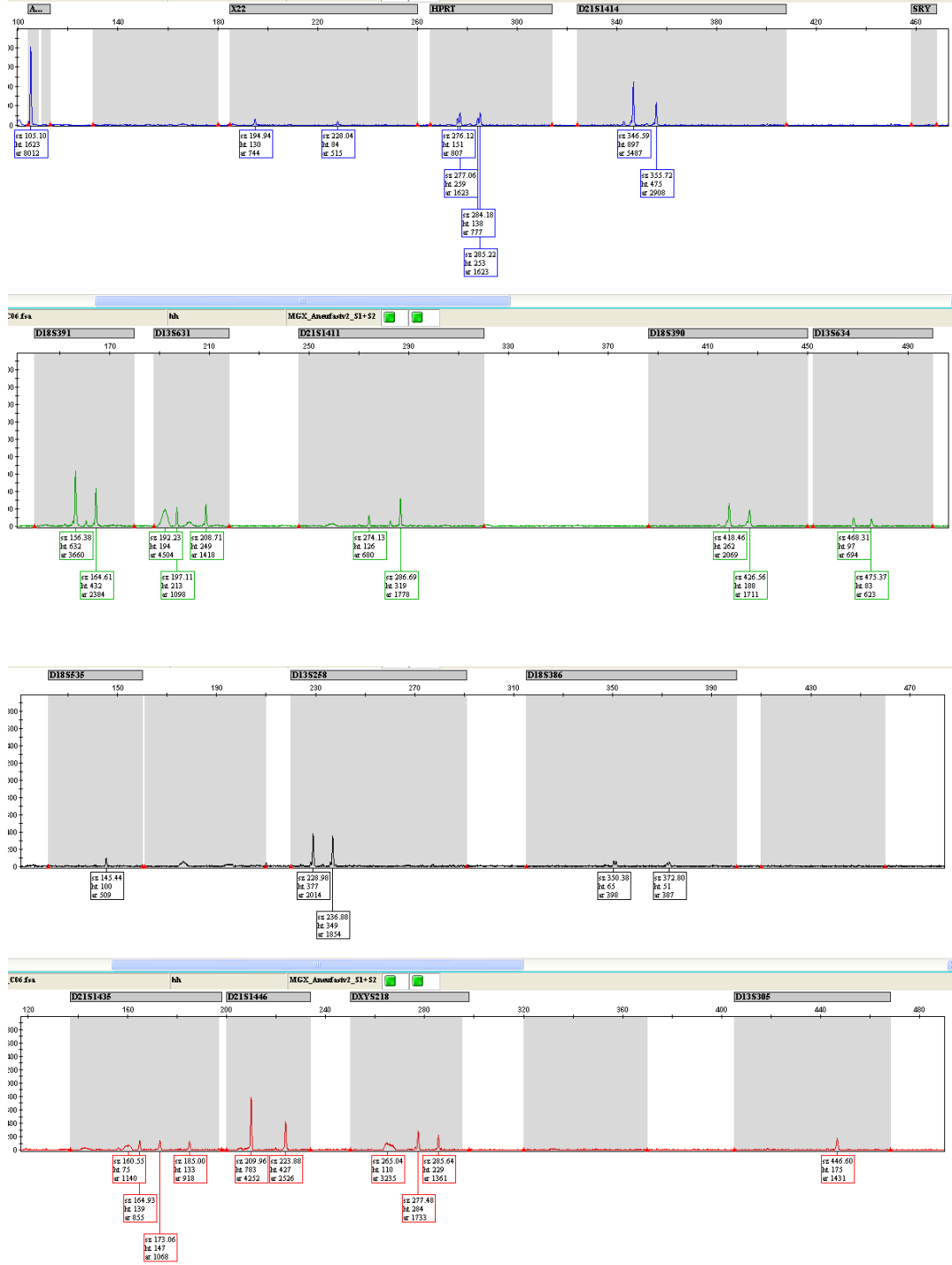
Hemoglobinopatiler yönünden prenatal tanı amacıyla başvuran ve QF-PCR analizi yapılan bir olguda ise (olgu 3), QF-PCR analiz sonucu 46,XX olarak belirlenmesine rağmen olgunun amniyon sıvısından yapılan sitogenetik analizinde fetusun karyotipinin 46,XX (29 hücre)-92,XXXX (20 hücre) şeklinde mozaik tetraploidi olduğu saptanmıştır. Olgu 3'ün QF-PCR analiz görüntüsü şekil 18'de verilmiştir. Olgu 3; 35 yaşından büyük olup, olguya birinci veya ikinci trimester tarama testi yapılmamıştır.



Şekil 14. 46,XX'li bir olgunun QF-PCR analizi görüntüsü



Şekil 15. 46,XY'li bir olgunun QF-PCR analizi görüntüsü



Şekil 16. Olgu 1'in QF-PCR analizi görüntüsü (47,XX+21)



Şekil 17. Olgu 2'nin QF-PCR analizi görüntüsü (47,XX+21)



Şekil 18. Olgu 3'ün QF-PCR analizi görüntüsü (46,XX)

Diallelik tüm örneklerin ortalama pik alanı oranları ve standart sapmaları tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Diallelik örneklerdeki pik alanı oranları

Belirteç	Minimum	Maksimum	Ortalama±SD
X22	1,02	1,38	1,13±0,10
HPRT	1,01	1,28	1,11±0,08
DXYS218	1,01	1,34	1,09±0,08
D21S1414	1,01	1,28	1,07±0,06
D21S1411	1,01	1,31	1,12±0,09
D21S1435	1,02	1,28	1,10±0,07
D21S1446	1,01	1,42	1,11±0,10
D18S391	1,02	1,73	1,21±0,21
D18S390	1,01	1,26	1,10±0,06
D18S535	1,02	1,29	1,10±0,06
D18S386	1,01	1,61	1,20±0,15
D13S631	1,03	1,55	1,15±0,14
D13S634	1,00	1,21	1,09±0,06
D13S258	1,01	1,24	1,08±0,05
D13S305	1,02	1,77	1,19±0,20

Aneufast QF-PCR kitinde kullanılan belirteçlerin çalıştığımız toplam 28 örnek için non-informatif görülme oranları ve heterozigotluk yüzdeleri tablo 18’de gösterilmiştir.

Kromozom 13,18 ve 21 için örneklerin tümünde en az iki informatif belirteç bulunmaktaydı. Ancak cinsiyet kromozom belirteçlerine bakıldığında; 2 örnekte her 3 belirteç non-informatif iken 6 örnekte ise sadece 1 belirteç informatif olarak belirlendi. Bu 8 olgu, MXY setinde bulunan STR belirteçleri ile (HPRT, SBMA, DXS6803, DXS6809 ve DXS8377) tekrar amplifiye edildi. Buna göre bir örnekte toplamda bakılan 7 belirtecin hepsi non-informatif iken 4 örnekte sadece 1 belirteç informatif olarak

belirlendi. Sonuç olarak 28 hastanın 5'inde (% 17,8) cinsiyet kromozom anöploidisi için QF-PCR ile tanı konulamadı.

Tablo 18. QF-PCR analizinde kullanılan belirteçlerin heterozigotlukları

Belirteç	Non- informatif	İnformatif	Heterozigotluk (mevcut çalışma, %)
X22	6	22	79
HPRT	17	11	39
DXYS218	10	18	64
D21S1414	6	22	79
D21S1411	2	26	93
D21S1435	8	20	71
D21S1446	6	22	79
D18S391	7	21	75
D18S390	10	18	64
D18S535	6	22	79
D18S386	2	26	93
D13S631	7	21	75
D13S634	0	28	100
D13S258	4	24	86
D13S305	7	21	75

QF-PCR analizi yapılan toplam 28 örneğin 2'si Down sendromu olarak tespit edildi. Bir mozaik tetraploidi olgusu ise belirlenemedi. Buna göre QF-PCR yönteminin duyarlılığı % 66,6, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri % 96 olarak hesaplandı.

5. TARTIŞMA

Down sendromu prenatal tanı ve terapötik abortus olmadan 1-2:1000 prevalansı ile anöploidiler arasında en sık görülendir. Edwards ve Patau sendromları sırasıyla on ve yirmi kat daha az sıklıkla görülürlerken, cinsiyet kromozom anomalileri daha sık görülmekle beraber daha benign bir tablo sergilerler.^{2,11}

Taramanın amacı, ileri inceleme yapılabilmesi için sağlıklı bireyler arasından belirli bir hastalık için yeterince yüksek risk altında olanların belirlenmesidir. Kromozomal anomaliler için düşünüldüğünde bu incelemeler riskli invaziv prosedürleri kapsamaktadır.¹¹

Geçmişte yüksek riskli grubun belirlenmesinde ileri anne yaşı veya önceki etkilenmiş gebelik dikkate alınır. İleri yaşla birlikte riskteki artışa rağmen olguların çoğu genç kadınlarda görülürken, olguların % 1'inden daha azı önceki etkilenmiş gebeliği olan kadınlarda izlenir. Birçok biyokimyasal ve ultrasonografik belirteçlerle tarama stratejilerinin geliştirilmesi ve uygulanması ile doğum prevalanslarında önemli düşüşler yaşanmıştır.² Ancak invaziv tanısal işlemlere maruz kalan gebelerin sayısını azaltmak için mevcut tarama testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin iyileştirilmesi gerekmektedir.¹³²

Biz de bu çalışmada fetal anöploidiler için hPL'nin maternal serum belirteci olarak etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık. Rutin olarak birinci ve ikinci trimester tarama testi yaptıran gebeler çalışmaya alındı. Hesaplanan riskleri Down sendromu için 1:300 ve üzeri, Edwards ve Patau sendromları için 1:100 ve üzeri ise yüksek riskli olarak kabul edildi. hPL'nin MoM değerlerinin hesaplanması amacıyla öncelikle düşük riskli bulunan gebelerin serum hPL düzeyleri kullanılarak gestasyonel yaşa göre medyan değerleri hesaplandı. Belirlenenen bu medyan değerleri tarama testi pozitif olan olguların serum hPL MoM düzeylerini hesaplamak için kullanıldı. Tarama testi pozitif bulunan gebelere prenatal tanı yapıp yapılmadığı takip edildi. Yapılan prenatal tanı sonucunda Down sendromlu olduğunu tespit ettiğimiz iki vakadan birinci trimesterde başvuranın hPL MoM değeri 0,77, ikinci trimesterde başvuranın hPL MoM değeri ise 1,50 olarak belirlendi.

Frendo ve arkadaşları kültür yaptıkları sitotrofoblastların *in vitro* olarak sinsityotrofoblastlara farklılaşması sırasında normal ve Down sendromlu plasentaların endokrin fonksiyonlarını incelemişlerdir. Down sendromlu gebelerin plasentalarında sinsityotrofoblast oluşumunda defekt ile birlikte hPL, hCG, plasental GH ve leptin sentezinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla beraber etkilenmiş gebelerin serum hPL düzeylerini de düşük olarak belirlemişlerdir. Ancak ikinci trimesterde (15-18. haftalar) bu farkın anlamlı olmadığını belirtmişlerdir.⁸²

Christiansen ve arkadaşlarının 8-13. gebelik haftaları arasında 47 Down sendromlu ve 163 etkilenmemiş gebe üzerinde yaptıkları çalışmada Down sendromlu gebeliklerde hPL'nin 0.63 MoM'a düştüğünü ve bunun 8-13. hafta aralığında değişmediğini belirlemişlerdir.⁷

Biz de bu iki çalışma ile benzer şekilde birinci trimesterde başvuran Down sendromlu gebenin hPL MoM değerinin kontrol grubundan anlamlı olarak düşük olarak belirledik. İkinci trimesterde başvuran Down sendromlu gebenin hPL MoM değerini ise farklı olarak yüksek olduğunu saptadık. Ancak çalışmamızda Down sendromlu olgu sayısının az olması sonuçlar hakkında sağlıklı bir değerlendirme yapılmasını engellemektedir.

Sık görülen anöploidilerin maternal serum analitleri ve fetal ultrason bulgularına dayalı yöntemlerle antenatal taramasının yaygın olarak kullanılması ve birçok yapısal anomalinin rutin fetal ultrason taraması ile saptanabilmesi sonucu son 10 yılda prenatal sitogenetik tanının kullanım paterni radikal olarak değişmiştir. Gebelik yönetimini iyileştirmek ve ailenin anksiyetesini hafifletmek amacıyla, hücre kültürü gerektirmeyen daha hızlı prenatal tanı yöntemleri ihtiyacı doğmuştur.⁸⁸ Bu yöntemlerden biri olan QF-PCR son yıllarda sık görülen kromozom anomalilerinin hızlı tanısını sağlamak için prenatal tanı alanına girmiş ve birçok çalışmada bu anomalilerin belirlenmesinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir.¹³³

Anöploidiler için hızlı prenatal tanı testleri belirli kriterleri karşılamalıdır. Bunlardan en önemlileri minimum yanlış negatif sonuç ile yüksek doğruluğa sahip olması ve gebelik terminasyonu gibi geri dönüşümü olmayan kararlar verildiğinden yanlış pozitif sonuç olmamasıdır.¹⁰⁶ Yöntemin tanısallı doğruluğu duyarlılık ve özgüllük terimleri ile tanımlanır. Duyarlılık, testin hastalık varken tanı koyabilme kapasitesidir,

gerçek pozitif sonuç oranını gösterir. Özgüllük ise hastalık yokken gerçek negatif sonuçları belirleyebilme kapasitesidir.¹³⁴

Prenatal örneklerin test edilmesi, sınırlı örnek miktarı, değişken örnek kalitesi, mozaiklik ve maternal hücre kontaminasyonu sebebiyle güçtür.¹¹⁰ Prenatal örneklerdeki mozaik karyotip problemleri özellikle CVS materyallerinde iyi belgelenmiştir. QF-PCR'la ilgili, mozaiklik seviyesinin tespit edilebilirliği ve direk test sonuçlarıyla fetal genotip arasındaki uyumun derecesi olmak üzere iki problem vardır.¹⁰¹ Genomik mozaikliğin moleküler olarak tespit edilmesinde QF-PCR'm duyarlılığı, anöploidili hücre serisinin yüzde oranına bağlıdır. Bu konuda ilk çalışma kan örneklerinde yapılmış olup, 46,XX (% 90)/45,X (% 10) mozaikliği QF-PCR analizi ile tespit edilememiştir.¹³⁵

Schmidt ve arkadaşlarının 662 amniyon sıvısı ile yaptıkları çalışmada, 45,X/46,XX mozaik karyotipe sahip bir olgu QF-PCR analizi ile belirlenememiştir. 47,XXY tanısı konulan bir örneğin ise kromozom analizinde cinsiyet kromozom mozaikliği (47,XXY/46,XY) ortaya çıkarılmıştır.¹¹²

Yoon ve arkadaşlarının çalışmasında, 78 amniyotik sıvı ve periferik kan örneğinde yaptıkları QF-PCR analizinde bir mozaik trizomi 21 olgusunda yanlış negatif sonuç elde edilmiş, olgunun karyotip analizinde düşük seviyede mozaik (10/130) olduğu görülmüştür. Olguların 3'ünde ise yanlış pozitif sonuç elde etmişlerdir. QF-PCR yönteminin duyarlılığını % 96,7, özgüllüğünü % 93,6, pozitif prediktif değerini % 90,6 ve negatif prediktif değerini % 97,8 olarak belirtmişlerdir.¹³⁶

Çalışmamızda QF-PCR ile yanlış pozitif bir sonuç görülmemekle beraber, mozaik tetraploidili bir olguda yanlış negatif bir sonuç elde edilmiştir. Yöntemin duyarlılığı % 66,6 ve özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri % 96 olarak belirlenmiştir.

Dikensoy ve arkadaşları yayınladıkları bir olgu sunumunda; trizomi 18 riskinin yüksek olması nedeniyle başvuran gebenin amniyon sıvısından yapılan QF-PCR analizinde fetüsün normal kromozomal yapı gösterdiğini ancak sitogenetik analizde fetüste trizomi 18 ve trizomi 9 mozaizminin tespit edildiğini bildirmişlerdir.¹³⁷

Mann ve arkadaşları 7720 amniyotik sıvı, CVS ve fetal kan örneği ile trizomi 13, 18 ve 21 için yaptıkları QF-PCR analizlerinde, tüm normal ve non-mozaik trizomi olgularında karyotip analizi ve QF-PCR sonuçları uyumlu bulunmuş, 15 mozaik olgunun ise 12'si tespit edilebilmiştir.⁸³

Crigliano ve arkadaşlarının toplam 43000 amniyotik sıvı, CVS, fetal kan ve fetal doku örneği ile Aneufast kiti kullanarak yaptıkları QF-PCR analizinde yanlış pozitif olgu bulunmazken, 72 mozaik olgunun 45'ine QF-PCR ile tanı konulabilmiştir. Yöntemin duyarlılığı % 92,3, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri % 100 ve negatif prediktif değeri % 99,7 olarak belirlenmiştir.¹⁰⁷

Hawkins ve arkadaşları, 1069 gebeden alınan amniyon sıvısı ile Aneufast QF-PCR kiti ile yaptıkları analizlerde yanlış pozitif sonuç elde etmezken, sadece mozaik cinsiyet korozom anöploidili bir olguda yanlış negatif sonuç elde etmişlerdir. Yöntemin duyarlılığını % 98, özgüllüğünü % 100 olarak belirlemişlerdir.¹⁰⁶

Aydoğmuş ve arkadaşları, kromozomal anomali araştırılması amacıyla amniyosentez yapılan 40 gebenin alındığı çalışmada standart karyotipleme ile QF-PCR analizi ile elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır. Olguların 6'sında QF-PCR ile yanlış pozitif, 1'inde ise yanlış negatif sonuç elde etmişlerdir. Buna göre QF-PCR'in etkinlik göstergelerini, duyarlılık % 50, özgüllük % 83,7, pozitif prediktif değeri % 14,3 ve negatif prediktif değeri % 96,9 olarak bildirmişlerdir.⁹

Cho ve arkadaşlarının 800 amniyon sıvısı ile yaptıkları çalışmada QF-PCR ile 33 otozomal ve cinsiyet kromozom anomalili olgunun 31'i saptanırken, 1 olguda maternal hücre kontaminasyonu ve 1 olguda mozaizm nedeniyle tanı konamamıştır. Yanlış pozitif sonuç bulunmamıştır.¹³⁸

QF-PCR analizi ile yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuç gözlenmeyen çalışmalar da mevcuttur.^{102,115,139,140} Mann ve arkadaşları, trizomi 18 için düşük seviyede mozaiklik gösteren bir CVS örneğine QF-PCR ile tanı koyduklarını bildirmişlerdir.¹¹³

QF-PCR analizinde mozaizm, ekstra allellerin görülmesi ve allel pikleri arasında çarpık oranların bulunması ile belirlenir. Ancak bu belirtiler aşikar olmayabilir. Müphem ancak sürekli olan bu oranlardaki çarpıklık ve/veya ekstra pikler bulunan kromozomlar daha detaylı incelenmelidir. Bununla birlikte plasentaya özgü mozaizme bağlı yanlış tanı riskini en aza indirmek için, koryonik villüs materyallerinde örneğin farklı bölgelerini temsil eden villüslerin işleme alınması gerekmektedir. Bu, alınan örneğin hem sitotrofoblast hem de mezodermal dokuyu temsil etmesini sağlar.¹¹⁰

Mozaikliğin fetüs üzerinde etkisi, dokulardaki anormal hücrelerin dağılımına bağlıdır. Anormal hücreler fetal doku, ekstraembriyonik doku veya her ikisinde de

olabilir. Bu dağılım; gelişim sırasında mutasyonel olayın zamanlamasıyla ilişkilidir, ne kadar erken olursa fetüste normal hücre serisi olma ihtimali artar. Fetüsün fenotipini de fetüsteki anormal hücrelerin dağılımı belirler. Yapılan çalışmalarda amniyon sıvısı ile yapılan prenatal tanıda mozaiklik tespit edilen olguların % 49,7'sinde gebelik olumsuz bir şekilde sonlanmışır. Bu nedenle prenatal örneklerde mozaiklik durumunun tespiti, fetüs için önemi açısından dikkatli bir yorumlama gerektirmektedir. Amniyotik sıvı hücreleri, koryonik hücrelere göre fetal hücre popülasyonuna daha benzerdir. CVS materyali söz konusu olduğunda, fetal mozaizmin muhtemel seviyesinin daha doğru öngörülebilmesi için takip eden amniyotik sıvı veya fetal kan örnekleme ile detaylı ultrason taraması önerilmelidir.¹⁴¹

QF-PCR yönteminde kullanılan floresan belirteçlerin bilgi vericiliği, amplifiye edilen allelin heterozigotluğu ile direk olarak orantılıdır.¹⁴² Bu nedenle non-informatif sonuç yüzdesini en aza indirmek için uygun belirleyici seçimi önemlidir. STR belirteçlerinin allel sıklığı ve heterozigotluğu farklı etnik gruplar arasında değişmektedir.¹²³ Tablo 19'da dünyada farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda belirlenen STR belirteçlerinin heterozigotluk oranları ve bizim çalışmamızda bulduğumuz heterozigotluk oranları karşılaştırılmışır. Buna göre cinsiyet kromozom belirteçlerinin, özellikle HPRT olmak üzere, heterozigotluklarının düşük olduğu izlenmektedir. Otozomal kromozomlara ait belirteçler ise diğer ülkelerle benzer oranlar göstermektedir.

Cho ve arkadaşları, Kore nüfusunda D13S305 dışındaki belirteçlerde heterozigotluğu batı ülkelerine göre biraz düşük olarak belirlenmiştir.¹³⁸ Choueiri ve arkadaşları Lübnan'da yaptıkları çalışmada kullandıkları belirteçlerin heterozigotluklarını literatüre göre daha düşük olarak bildirmişlerdir. Bunun da Orta Doğu ülkelerinde sık görülen akraba evliliklerine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.¹⁴²

Prenatal tanıda QF-PCR'in rolü ile ilgili farklı görüşler mevcuttur. Çalışmalarda farklı doğruluk değerlendirmeleri olmasına rağmen QF-PCR'in ekonomik, ve hızlı bir teknik olduğu konusunda fikir birliği bulunmaktadır.⁸³

Ogilvie¹¹⁴ ve Leung¹¹⁵ artmış Down sendromu riski sebebiyle prenatal tanı için başvuran kadınlarda, QF-PCR'in karyotip analizine alternatif bir test olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Bu tekniğin avantajlarının dezavantajlarından daha fazla olduğunu öne sürmüşlerdir. Konvansiyonel sitogenetiğe göre QF-PCR kullanımını

daha hızlı sonuç, daha düşük maliyet ve daha az iş gücü sağlar. Down sendromu tanısı koymak veya dışlamak için doğru bir teknik olması da hasta ve klinisyenin beklentilerini tam olarak karşılar.¹¹⁴

Tablo 19. Çeşitli ülkelerde STR belirteçlerinin heterozigotluk oranları

	Heterozigotluk (%)						Mevcut çalışma
	Batı ülkeleri ⁸⁴	İspanya İtalya ¹⁰⁷	Güney doğu Asya ¹²⁴	Yunanistan ¹²⁰	Kore ¹³⁸	Lübnan ¹⁴²	
X22	85,2	91					79
HPRT	73,3	75	62,1	80			39
DXYS218		75					64
D21S1414	88	85		85			79
D21S1411	93	93	77,9	83	84	89,1	93
D21S1435	79	75			74	77	71
D21S1446		77					79
D18S391	75	75	61,2		72		75
D18S390		75			54		64
D18S535	74,6	82	75,5	76	83	80,2	79
D18S386	92,3	89	85,1		85		93
D13S631	83	78		83		78,9	75
D13S634	81,2	85	83,9	80	74		100
D13S258	83,3	89				76,8	86
D13S305	75	75	79,8		84		75

Levett¹¹⁸ ve Bili¹²⁰ ise QF-PCR'ın karyotip analizine alternatif değil, yardımcı olarak kullanılmasını önermişlerdir. Yöntemin hızlı sonuç sağlaması ailenin anksiyetesinin hafifletecektir.¹¹⁸

QF-PCR'in tek başına prenatal tanı testi olarak kullanımına karşı itirazlardan biri seçilmiş beş kromozomun polimorfizmlerinin kullanılması nedeniyle gözden kaçan durumların sayısıdır. Bu durumda yaklaşık 150 anormal karyotipten birinde ya da yaş dağılımına bağlı olarak 10-30000 örnekten birinde, en yaygın ve yalnızca anne yaşıyla sıklığı artan kromozom anomalilerine tanı koyamama riski vardır. Bu hata oranı kabul edilebilir görünmekle beraber, en çok yapısal kromozom anomalileri gözden kaçacaktır.⁸³

Down sendromu haricindeki klinik olarak önemli kromozomal anöploidilerinin, sıklıkla anormal ultrason bulguları ile birlikte olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ultrason taraması normal olan olgular düşük riskli kabul edilir ve önerilecek olan testin QF-PCR olduğu söylenir. Fetal yapısal anomalileri olan kadınlar da, en yaygın anöploidilerin tanısını sağlayan QF-PCR analizinin hızlı cevap vermesinden fayda görürler. Ancak genel ortak görüş, bu olgulara konvensiyonel sitogenetik analizinin de yapılmasının daha uygun olduğu yönündedir. Böyle bir plan doğru bir ultrasonografi muayenesini gerektirmekle beraber, özellikle erken gebelikte, CVS ya da amniyosentezden önce normal fetal anatomiye sahip vakalarda, QF-PCR'in tek başına kullanımıyla Down sendromundan başka gözden kaçabilecek anöploidi riskinin ne olabileceği bilinmemektedir. Tersine, ultrasonografide tespit edilen fetal anatomik defektleri takiben, QF-PCR'la tanı konması mümkün olmayan anöploidilerin riskinde ne derece bir artış olduğu tanımlanmamıştır.⁸³

QF-PCR analizi fetal ultrason taraması ile anormal bulguları olan ve kromozom anomalisi için riskli olan fetüslerde, örneklemeden itibaren 24 saat içinde sitogenetik analiz ile tanı konmuş olan tüm anomalilerin % 95'ini tespit edebilir. Bu da fetal ultrason taramasının; QF-PCR'dan sonra sitogenetik analiz yapıp yapılmamasına karar verebilmek için temel endikasyon olduğunu açıkça göstermektedir.¹⁰⁷ Yapılan geniş serili retrospektif çalışmalarda CVS¹⁴³ ve amniyotik¹⁴⁴ sıvı ile yapılan analizler ile de bu bulgu doğrulanmıştır.

2004 yılında İngiltere Ulusal Tarama Komitesi, prenatal invaziv diyagnostik bir işleme maruz kalan tüm kadınlara hızlı tanısal testlerin önerilmesini teklif etmişlerdir. QF-PCR'in tek başına kullanımından kaynaklanan İngiltere Ulusal Sağlık Servisi'nin maddi kazancı başlıca neden olmak üzere, tüm gebelere karyotip analizi yapıp yapılmaması tartışılmıştır. Hızlı prenatal tanı testleri ile gözden kaçan önlenebilir özürle

doğabilecek olan olası bebek sayısı ve hızlı testlerin tek başına kullanılmaları ile artmış Down sendromu riski ile başvuran gebelerde klinik önemi bilinmeyen ya da az olan kromozom anomalilerinin tesadüfi olarak tespit edilmesinin neden olduğu gereksiz stres diğer tartışılan konulardır.^{88,107}

Yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında genel olarak QF-PCR'in duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olarak bildirilmiştir. Yanlış pozitif sonuç sıklığı oldukça düşük olmakla beraber yanlış negatif sonuçların en önemli nedeni mozaizm olarak görülmektedir. Küçük miktarlarda DNA ile çalışılabilmesi, kısa sürede sonuç elde edilebilmesi, otomatize olabilmesi ve düşük maliyetli olması yöntemin avantajlarıdır. Sonuç olarak tüm avantajları ile birlikte QF-PCR'in güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir. Ancak anormal fetal ultrason bulguları olan olgularda sitogenetik analiz ile karyotipin belirlenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, Haziran 2009-Mayıs 2011 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na başvuran birinci trimester için 85 düşük riskli ve 23 yüksek riskli, ikinci trimester için 84 düşük riskli ve 51 yüksek riskli gebenin serum hPL düzeyleri ölçüldü. Tarama testi negatif olan gebelerin hPL düzeyleri ile her gebelik günü için medyan değerleri hesaplandı. Hesaplanan medyan değerleri, maternal serum hPL konsantrasyonlarını gebelik yaşına uygun MoM değerlerine dönüştürmek için kullanıldı. Birinci trimester yüksek riskli grupta Down sendromlu olduğu tespit edilen bir olgunun hPL MoM değeri 0,77 olarak belirlendi. Bu değer düşük riskli grubun hPL MoM düzeylerinden anlamlı olarak farklı idi. İkinci trimester yüksek riskli grupta ise Down sendromlu olduğu tespit edilen bir olgunun hPL MoM değeri 1,50 olarak belirlendi. Bu değer düşük riskli grubun hPL MoM düzeylerinden anlamlı olarak farklı idi. Literatür ile karşılaştırıldığında birinci trimester Down sendromlu olgunun hPL MoM düzeyi beklenildiği gibi düşük bulunurken, ikinci trimester Down sendromlu olgunun hPL MoM düzeyi aksine yüksek bulundu. Sonuç olarak hPL birinci trimester için anöploidi taramasında mevcut testlere ek olarak kullanılabilir ancak hPL'nin ilk trimester taramasının bir parçası olarak potansiyelinin değerlendirmesi için geniş prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prenatal Tanı Ünitesi'ne Ekim 2009-Haziran 2011 tarihleri arasında hemoglobinopatiler yönünden prenatal tanı amacıyla rutin olarak başvuran 35 yaş ve üzeri 26 gebe ile yukarıda bahsedilen 2 olguya QF-PCR analizi yapıldı. 2 olgunun karyotipi QF-PCR ile 47,XX+21 olarak belirlendi. Normal karyotipe sahip olduğu belirlenen 26 örneğin birinde ise QF-PCR analiz sonucu 46,XX olarak belirlenmesine rağmen olgunun amniyon sıvısından yapılan sitogenetik analizinde fetusun karyotipinin 46,XX (29 hücre)-92,XXXX (20 hücre) şeklinde mozaik tetraploidi olduğu saptandı. Buna göre QF-PCR yönteminin duyarlılığı % 66,6, özgüllüğü % 100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri % 96 olarak hesaplandı. Belirteçlerin heterozigotluğuna bakıldığında ise başta HPRT (% 39) olmak üzere, cinsiyet kromozom belirteçlerinin heterozigotluklarının düşük olduğu izlendi. Kromozom 13,18 ve 21 için örneklerin

tümünde en az iki informatif belirteç bulunurken, olguların % 17,8'inde en az iki informatif belirteç olmadığından cinsiyet kromozom anöploidisi için QF-PCR ile tanı konulamadı. Bu non-informatif ve yetersiz sonuçlar, kullanılan belirteçlerin heterozigotluk oranları belirlenerek ve heterozigotluk oranı yüksek olan belirteçler kullanılarak azaltılabilir. Bununla beraber yapılan çalışmalarda tespit edilen yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları ile QF-PCR, anöploidilerin hızlı tanısında güvenilir bir yöntemdir. Prenatal invaziv diyagnostik işlem uygulanan tüm kadınlarda QF-PCR analizi yapılması da, anöploidili olgulara hızlı tanı konarak gebeliğin erken döneminde sonlandırılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Nicolaidis KH.** Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2003**; 21:313-321.
2. **Gross S, Cuckle H.** Prenatal screening and diagnosis-An introduction. *Am J Med Genet Part C (Semin Med Genet)* **2007**; 145C:1-4.
3. **Chitty L.** Prenatal screening for chromosome abnormalities. *British Medical Bulletin* **1998**; 54(4):839-856.
4. **Kafkaslı A.** Gebelikte Down Sendromu tanısı için tarama testleri ve güvenilirlikleri. *TJD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi* **2004**; 6:30-35.
5. ACOG Practice Bulletin No. 77: Screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* **2007**; 109:217-27.
6. **Driscoll DA, Gross SJ.** ACMG Practice Guidelines: Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects. *Genet Med* **2009**; 11(11):818-821.
7. **Christiansen M, Sørensen T L, Nørgaard-Pedersen B.** Human placental lactogen is a first-trimester maternal serum marker of Down syndrome. *Prenat Diagn* **2007**; 27:1-5.
8. **Christiansen M.** Placental growth hormone and growth hormone binding protein are first trimester maternal serum markers of Down syndrome. *Prenat Diagn* **2009**; 29:1249-1255.
9. **Aydoğmuş S, Keskin HL, Gökçe SB, Avşar AF, Çelen E.** The efficacy of quantitative fluorescent-polymerase chain reaction (QF-PCR) in the diagnosis of prenatal aneuploidy. *Turk J Med Sci* **2009**; 39(5):741-746.
10. **Demirhan O.** Sitogenetik. Kasap H. *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*. Adana: Nobel Kitabevi, **2010**: 347-384.
11. **Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC.** *Williams Obstetrics*. 23th Ed, United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc., **2010**.
12. **Bal F, Yıldız A, Menevşe A, Menekşe S.** Kromozomal anomaliler ve doğum öncesi tanı yöntemleri. *T Klin Jineköl Obst* **1996**; 6:149-159.
13. **Evans- Martin FF.** *Down Syndrome*. United States of America: Infobase Publishing, **2009**.
14. **Hassold T, Hall H, Hunt P.** The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* **2007**; 16:203-208.
15. **Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE.** Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenetic Genome Res* **2005**; 111:273-280.

16. **Benn PA.** Advances in prenatal screening for Down syndrome: I. General principles and second trimester testing. *Clinica Chimica Acta* **2002**; 323:1-16.
17. **De Souza E, Halliday J, Chan A, Bower C, Morris JK.** Recurrence risks for trisomies 13, 18, and 21. *Am J Med Genet* **2009**; 149A:2716-2722.
18. **Tosun M, Yamk F.** Trizomi 18: Olgu sunumu. *OMÜ Tıp Dergisi* **2004**; 21(2):98-99.
19. **Wald NJ.** Guidance on terminology. *J Med Screen* **2008**;15:50.
20. **Jenkins TM, Wapner RJ.** Prenatal diagnosis of congenital disorders. Creasy RK, Resnik R, Iams JD. *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*. 5th Ed, Philadelphia: Saunders, **2004**:235-280.
21. **Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM.** First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technology Assessment* **2003**; 7(11).
22. **Wald NJ, Kennard A, Hackshaw A, McGuire A.** Antenatal screening for Down's syndrome. *Health Technology Assessment* **1998**; 2(1).
23. **Morris JK, Wald NJ.** Graphical presentation of distributions of risk in screening. *J Med Screen* **2005**; 12:155-160.
24. SOGC Clinical Practice Guideline: Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can* **2007**; 29(2):146-161
25. **Saller DN, Canick JA.** Current methods of prenatal screening for Down syndrome and other fetal abnormalities. *Clinical Obstetrics and Gynecology* **2008**; 51(1):24-36.
26. **Khalil A, Pandya P.** Screening for Down syndrome. *J Obstet Gynecol India* **2006**; 56(3):205-211
27. **Cuckle H.** Biochemical screening for Down syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **2000**; 92:97-101
28. **Nicolaidis KH.** The 11-13⁺⁶ weeks scan. *Fetal Medicine Foundation* **2004**.
29. **Özgünen T, Evrüke C, Kadayıfçı O, Arıdoğan N.** 170 riskli gebede açık nöral tüp defekti taramasında maternal serum alfa fetoprotein sonuçları. *Perinatoloji Dergisi* **1994**; 2:248-250.
30. **Önderoğlu LS, Kabukçu A, Aktaş D, Kaşifoğlu MA, Balcı S, Gökşin E.** İkinci trimester anne serumunda alfa-fetoprotein, koryonik gonadotropin ve ankonjuge östriol düzeylerinin Down sendromu taramasında etkinliği. *Perinatoloji Dergisi* **1996**; 4(2):117-120.
31. **Benn PA.** Advances in prenatal screening for Down syndrome: II first trimester testing, integrated testing, and future directions. *Clinica Chimica Acta* **2002**; 324:1-11.

32. **Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH.** A screening program for trisomy 21 at 10–14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* **1999**; 13:231-237.
33. **Nicolaides KH.** Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2004**; 191:45-67.
34. **Spencer K.** Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* **2007**; 145C:18-32.
35. **Canick JA, MacRae AR.** Second trimester serum markers. *Semin Perinatol* **2005**; 29:203-208.
36. **Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Bianchi DW, Rudnicka AR, Hackshaw AK, Lambert-Messerlian G, Wald NJ, D'Alton ME.** First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* **2005**; 353:2001-2011.
37. **Cuckle H, Benn P, Wright D.** Down syndrome screening in the first and/or second trimester: model predicted performance using meta-analysis parameters. *Semin Perinatol* **2005**; 29:252-257.
38. **Sherwin JE, Lockitch G, Rosenthal P, Rhone S, Magee LA, Ashwood ER, Goldsmith BM, Lee CR, Geaghan S, Millington D, Bennett M.** *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Maternal-Fetal Risk Assessment and Reference Values in Pregnancy.* Washington, D.C.: AACC Press, **2006**.
39. **Breathnach FM, Malone FD, Lambert-Messerlian G, Cuckle HS, Porter TF, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, Berkowitz RL, Klugman S, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Tripp T, Bianchi DW, D'Alton ME.** First- and second-trimester screening detection of aneuploidies other than Down syndrome. *Obstet Gynecol* **2007**; 110:651-657.
40. **Ashwood ER, Knight GJ.** Disorders of pregnancy. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* 6th Ed, St Louis: Saunders, **2008**: 802-824.
41. **Milunsky A, Canick JA.** Maternal serum screening for neural tube and other defects. Milunsky A, Milunsky JM, *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment.* 6th Ed, Singapore: Wiley-Blackwell, **2010**:705-770.
42. **Wu AHB.** *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests.* 4th Ed., St. Louis: Saunders Elsevier, **2006**.
43. **Baliff JP, Mooney RA.** New developments in prenatal screening for Down syndrome. *Am J Clin Pathol* **2003**; 120(Suppl 1):14-24.
44. **Diribaş K, Kaya C, Koç FA.** İlk trimester fetal tarama testleri. *T Klin J Gynecol Obst* **2002**; 12:186-193.
45. **Wald NJ, Hackshaw AK.** Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology* **2000**; 14(4):563-580.

46. **Nicolaides KH.** Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* **2011**; 31:7-15.
47. **Wapner RJ.** First trimester screening: The BUN study. *Semin Perinatol* **2005**; 29:236-239.
48. **Malone FD, Wald NJ, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Bianchi DW, Rudnicka AR, Hackshaw AK, Lambert-Messerlian G, D'Alton ME.** First and Second Trimester Evaluation of Risk (FASTER) trial: Principal results of the NICHD multicenter Down syndrome screening study. *Am J Obstet Gynecol*, **2003**; 189:S56.
49. **Spencer K, Spencer CE, Power M, Dawson C, Nicolaides KH.** Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one stop clinic: A review of three years prospective experience. *Br J Obstet Gynaecol* **2003**; 110:281-286.
50. **Spencer K, Ong C, Skentou H, Liao AW, Nicolaides KH.** Screening for Trisomy 13 by fetal nuchal translucency thickness and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10–14 weeks. *Prenat Diagn* **2000**; 20:411-416.
51. **Tul N, Spencer K, Noble P, Chan C, Nicolaides K.** Screening for trisomy 18 by fetal nuchal translucency, maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* **1999**; 19:1035-1042.
52. **Spencer K, Tul N, Nicolaides KH.** Maternal serum free β -hCG and PAPP-A in fetal sex chromosome defects in the first trimester. *Prenat Diagn* **2000**; 20:390-394.
53. **Spencer K, Liao AWJ, Skentou H, Cicero S, Nicolaides KH.** Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* **2000**; 20:495-499.
54. **Canick JA, Kellner LH.** First trimester screening for aneuploidy: serum biochemical markers. *Seminars in Perinatology* **1999**; 23(5):359-368.
55. **Palomaki GE, Lee JES, Canick JA, McDowell GA, Donnenfeld AE.** Technical standards and guidelines: Prenatal screening for Down syndrome that includes first-trimester biochemistry and/or ultrasound measurements. *Genet Med* **2009**; 11(9):669-681.
56. **Canick JA, Lambert-Messerlian GM, Palomaki GE, Neveux LM, Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Saade GR, Berkowitz RL, Dar P, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, D'Alton ME.** Comparison of serum markers in first-trimester down syndrome screening. *Obstet Gynecol* **2006**;108:1192-1199.
57. **Palomaki GE, Lambert-Messerlian GM, Canick JA.** A summary analysis of Down syndrome markers in the late first trimester. *Adv Clin Chem* **2007**; 43:177-210.
58. **Evans MI, Krantz DA, Hallahan TW, Galen RS.** Meta-analysis of first trimester Down syndrome screening studies: free beta-human chorionic gonadotropin significantly outperforms intact human chorionic gonadotropin in a multimarker protocol. *Am J Obstet Gynecol* **2007**; 196:198-205.
59. **Rosen T, D'Alton ME.** Down syndrome screening in the first and second trimesters: what do the data show?. *Semin Perinatol* **2005**; 29:367-375.

60. **Koos BJ.** First-trimester screening: lessons from clinical trials and implementation. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **2006**; 18:152-155.
61. **Wenstrom KD.** Evaluation of Down syndrome strategies. *Semin Perinatol* **2005**; 29:219-224.
62. **Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK.** Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* **1999**; 341:461-467.
63. **Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Rudnicka A.** SURUSS in perspective. *Semin Perinatol* **2005**; 29:225-235.
64. **Benn P, Donnfeld AE.** Sequential Down syndrome screening: the importance of first and second trimester test correlations when calculating risk. *Journal of Genetic Counseling* **2005**; 14(6):409-413.
65. **Wald NJ, Rudnicka AR, Bestwick JP.** Sequential and contingent prenatal screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* **2006**; 26:769-777.
66. **Palomaki GE, Wright DE, Summers AM, Neveux LM, Meier C, O'Donnell A, Huang T, Knight GJ, Haddow JE.** Repeated measurement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in Down syndrome screening: A validation study. *Prenat Diagn* **2006**; 26:730-739.
67. **Wright DE, Bradbury I.** Repeated measures screening for Down's syndrome. *BJOG* **2005**; 112:80-83.
68. **Wald NJ, Bestwick JP, Morris JK.** Cross-trimester marker ratios in prenatal screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* **2006**; 26:514-523.
69. **Koster MPH, Pennings JLA, Imholz S, Rodenburg W, Visser GHA, Vries A, Schielen PCJI.** Bead-based multiplexed immunoassays to identify new biomarkers in maternal serum to improve first trimester Down syndrome screening. *Prenat Diagn* **2009**; 29:857-862.
70. **Litton C, Stone J, Eddleman K, Lee MJ.** Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *Mt Sinai J Med* **2009**; 76:521-528.
71. **Lo Y.** Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art. *BJOG* **2009**; 116:152-157.
72. **Wright CF, Burton H.** The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reproduction Update* **2009**; 15(1):139-151.
73. **Christiansen M, Spencer K, Laigaard J, Cowans NJ, Larsen SO, Wewer UM.** ADAM 12 as a second-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* **2007**; 27:611-615.
74. **Wortelboer EJ, Linskens IH, Koster MPH, Stoutenbeek P, Cuckle H, Blankenstein MA, Visser GHA, van Vugt JMG, Schielen PCJI.** ADAM12s as a first-trimester screening marker of trisomy. *Prenat Diagn* **2009**; 29:866-869.

75. **Laigaard J, Sørensen T, Fröhlich C, Pedersen BN, Christiansen M, Schiøtt K, Uldbjerg N, Albrechtsen R, Clausen HV, Ottesen B, Wewer UM.** ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat Diagn* **2003**; 23:1086-1091.
76. **Laigaard J, Christiansen M, Fröhlich C, Pedersen BN, Ottesen B, Wewer UM.** The level of ADAM12-S in maternal serum is an early first-trimester marker of fetal trisomy 18. *Prenat Diagn* **2005**; 25:45-46.
77. **Spencer K, Cowans NJ, Stamatopoulou A.** Maternal serum ADAM12s as a marker of rare aneuploidies in the first or second trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* **2007**; 27:1233-1237.
78. **Spencer K, Cowans NJ, Uldbjerg N, Tørring N.** First-trimester ADAM12s as early markers of trisomy 21: a promise still unfulfilled. *Prenat Diagn* **2008**; 28:338-342.
79. **Spencer K, Vereecken A, Cowans NJ.** Maternal serum ADAM12s as a potential marker of trisomy 21 prior to 10 weeks of gestation. *Prenat Diagn* **2008**; 28:209-211.
80. **Donalson K, Turner S, Wastell H, Cuckle H.** Second trimester maternal serum ADAM12 levels in Down's syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* **2008**; 28:904-907.
81. **Wang M, Lu S, Zhu Y, Li H.** ADAM12 is an effective marker in the second trimester of pregnancy for prenatal screening of Down syndrome. *Prenat Diagn* **2010**; 30:561-564.
82. **Frendo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovagrandi Y, Tarrade A, Porquet D, Blot P, Evain-Brion D.** Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**; 85:3700-3707.
83. **Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH.** The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Human Reproduction Update* **2004**; 10(6):541-548.
84. **Hult'en MA, Dhanjal S, Pertl B.** Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* **2003**; 126:279-297.
85. **Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K.** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2005**; 53:285-288.
86. **Gekas J, Berg DG, Durand A, Valle'e M, Wildschut HIJ, Bujold E, Forest JC, Rousseau F, Reinharz D.** Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities. *European Journal of Human Genetics* **2011**; 19:3-9.
87. **Shaffer LG, Bui TH.** Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **2007**; 145C:87-98.
88. **Faas BHW, Cirigliano V, Bui TH.** Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* **2011**; 16:81-87.

89. **Agnieszka S, Slézak R, Pesz K, Gil J, Sasiadek MM.** Prenatal diagnosis - principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* **2007**; 45:11-16.
90. **Alfirevic Z, Mujezinovic F, Sundberg K.** Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2003**; Issue 3.
91. **Centers for Disease Control and Prevention.** *Chorionic villus sampling and amniocentesis: recommendations for prenatal counseling.* MMWR **1995**; 44(No.RR-9).
92. **Şen C.** Amniosentez ve koryon villus örneklemesi. *Perinatoloji Dergisi* **2002**; 10(2):55-58.
93. **Özkaya O.** Kliniğimizde son 4 yılda yapılan amniyosentez vakalarının retrospektif analizi: tek hekim sonuçları. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg* **2009**; 16(3):19-22.
94. Zamani AG. Genetik tanı yöntemleri.
[Erişim:http://168.144.121.167/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/10_kongre_kurs/pdf/143_161_Genetik_Tani_Yontemleri.pdf](http://168.144.121.167/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/10_kongre_kurs/pdf/143_161_Genetik_Tani_Yontemleri.pdf) Erişim tarihi: 14.06.2011
95. **Bickmore WA.** Karyotype analysis and chromosome banding. Encyclopedia of Life Sciences, **2001**.
96. **Thein ATA, Abdel-Fattah SA, Kyle PM, Soothill PW.** An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. *4Prenat Diagn* **2000**; 20:275-280.
97. **Morris A, Boyd E, Dhanjal S, Lowther GW, Aitken DA, Young J, Menzies AL, Imrie SJ, Connor JM.** Two years' prospective experience using fluorescence in situ hybridization on uncultured amniotic fluid cells for rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies. *Prenat Diagn* **1999**; 19:546-551.
98. **Dudarewicz L, Holzgreve W, Jeziorowska A, Jakubowski L, Zimmermann B.** Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet* **2005**;46:207-215.
99. **Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW.** Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet* **1993**; 52:854-865.
100. **Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Tului L, Brambati B, Adinolfi M.** Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* **1999**; 36:300-303.
101. **Mann K.** Prenatal detection of chromosome aneuploidy by quantitative fluorescence-PCR. Elles R, Mountford R. *Methods in Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Genetic Diseases.* 2nd Ed., Totowa, NJ: Humana Press, **2002**: 141-156.
102. **Verma L, Macdonald F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hultén M.** Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* **1998**; 352:9-12.

103. **Mansfield ES.** Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* **1993**; 2:43-50.
104. **Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, Fuster C, Egozcue J.** Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod* **2001**; 7:1001-1006.
105. **Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J.** Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* **1997**; 17:1299-1311.
106. **Allingham-Hawkins DJ, Chitayat D, Cirigliano V, Summers A, Tokunaga J, Winsor E, Chun K.** Prospective validation of quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid detection of common aneuploidies. *Genet Med* **2011**; 13(2):140-147.
107. **Cirigliano V, Voglino G, Ordonez E, Marongiu A, Canadas MP, Ejarque M, Rueda L, Lloveras E, Fuster C, Adinolfi M.** Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn* **2009**; 29:40-49.
108. **Pertl B, Adinolfi M.** Diagnosis of chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. Lo YMD. *Methods In Molecular Medicine: Clinical Applications of PCR*. 1st Ed., Totowa, NJ: Humana Press, **1998**: 287-299.
109. **Aşcıoğlu F, Koluvaçık TS, Çetinkaya Ü, Akyüz F.** Kapiller elektroforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı: Geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma. *Adli Tıp Derg* **2002**; 16:88-93.
110. **Mann K, Ogilvie CM, Donaghue C, R Mountford, C McAnulty, J Warner, N Dunlop, L Levett, C Hardy, C McConnell, J Diack, F McKay.** QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines. *Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society* **2007**; v2.01
111. **Saadi AV, Kushtagi P, Gopinath PM, Satyamoorthy K.** Quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR) for prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. *Int J Hum Genet* **2010**; 10(1-3):121-129.
112. **Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, Hacklöer BJ, Kerber S, Kochhan L, Held KR.** Detection of aneuploidy in chromosomes X,Y,13,18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod* **2000**; 6(9):855-860.
113. **Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, Ogilvie CM.** Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* **2001**; 358:1057-1061.
114. **Ogilvie CM.** Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathologie Biologie* **2003**; 51:156-160.
115. **Leung WC, Waters JJ, Chitty L.** Prenatal diagnosis by rapid aneuploidy detection and karyotyping: a prospective study of the role of ultrasound in 1589 second-trimester amniocenteses. *Prenat Diagn* **2004**; 24:790-795.

116. **Soler A, Morales C, Badenas C, Rodríguez-Revenga L, Carrió A, Margarit E, Costa D, Borrell A, Goncé A, Milà M, Sánchez A.** A retrospective and theoretical evaluation of rapid methods for detecting chromosome abnormalities and their implications on genetic counseling based on a series of 3868 CVS diagnoses. *Fetal Diagn Ther* **2008**; 23:126-131.
117. **Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M.** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* **1999**; 5:1176-1179.
118. **Levett LJ, Liddle S, Meredith R.** A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2001**; 17:115-118.
119. **Vogliano G, Marongiu A, Massobrio M, Campogrande M, Todros T.** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies. *Lancet* **2002**; 359:442.
120. **Bili C, Divane A, Apessos A, T Konstantinos, A Apostolos, B Ioannis, T Periklis, L Florentin.** Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* **2002**; 22:360-365.
121. **Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MHY.** Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome? *Obstet Gynecol* **2003**; 101:856-861.
122. **Curcio C, Coviello DA, Calderone C, Nicolini U, Kustermann A, Pardi G, Travi M.** QF-PCR: a rapid prenatal detection of common chromosomes aneuploidies. *Abstracts of European Human Genetics Conference* **2004**.
123. **Andonova S, Vazharova R, Dimitrova V, Mazneikova V, Toncheva D, Kremensky I.** Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria-estimation of applicability of 6 STR markers on chromosomes 21 and 18. *Prenat Diagn* **2004**; 24:202-208.
124. **Quaife R, Wong LF, Tan SY, Chua WY, Lim SS, Hammersley CJN, Yeo HL.** QF-PCR based prenatal detection of aneuploidy in a southeast Asian population. *Prenat Diagn* **2004**; 24:407-413.
125. **Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KHA.** Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* **2003**; 40:907-912.
126. **Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, Vossebeld-Hoff I, Jansen R, van der Luijt RB, Sinke RJ, Page-Christiaens GCML, Ploos van Amstel JK, de Pater JM.** Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn* **2005**; 25:1032-1039.
127. **Gerdes T, Kirchhoff M, Lind A-M, Larsen GV, Schwartz M, Lundsteen C.** Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosomes 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* **2005**; 13:171-175.

128. **van Opstal D, Boter M, de Jong D, C van den Berg, HT Brüggewirth, HIJ Wildschut, A de Klein, RJH Galjaard.** Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet* **2009**; 17:112-121.
129. **Gerdes T, Kirchhoff M, Lind A-M, Vestergaard Larsen G, Kjaergaard S.** Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis-experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* **2008**; 28:1119-1125.
130. **Kooper AJ, Faas BH, Kater-Baats E, Feuth T, Janssen JCJA, van der Burgt I, Lotgering FK, van Kessel AG, Smits APT.** Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn* **2008**; 28:1004-1010.
131. **Yurdakul H, Durak B, Müslümanoğlu MH, Özdemir M, Çilingir O, Şener T, Artan S.** Performance of MLPA as a screening method for aneuploidy in uncultured amniocytes. *J Turkish-German Gynecol Assoc* **2010**; 11:199-203.
132. **Cho CKJ, Diamandis EP.** Application of proteomics to prenatal screening and diagnosis for aneuploidies. *Clin Chem Lab Med* **2011**; 49(1):33-41.
133. **Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M.** Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18000 consecutive clinical samples. *Molecular Human Reproduction* **2004**; 10(11):839-846.
134. **Grimshaw GM, Szczepura A, Hultén M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, Dhanjal S.** Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technology Assessment* **2003**; 7(10).
135. **Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M.** Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* **1999**; 19:1099-1103.
136. **Yoon HR, Park YS, Kim YK.** Rapid prenatal detection of Down and Edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeats. *Yonsei Med J* **2002**; 43:557-566.
137. **Dikensoy E, Balat Ö, Pehlivan S, Cebesoy FB, Kutlar Aİ, Sever T, Baltacı V.** Yanlış negatif QF-PCR ve trizomi 18-trizomi 9 mozaizm. *J Turk Soc Obstet Gynecol* **2011**; 8(1):67-70.
138. **Cho EH, Park BYN, Kang YS, Lee EH.** Validation of QF-PCR in a Korean population. *Prenat Diagn* **2009**; 29:213-216.
139. **Mouatassima SE, Beckera M, Kuziob S, Ronsinc C, Gild S, Nouchya M, Druardc L, Forestiera F.** Prenatal diagnosis of common aneuploidies using multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther* **2004**; 19:496-503.
140. **Ochshorn Y, Bar-Shira A, Jonish A, Yaron Y.** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, and X by quantitative fluorescence polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther* **2006**; 21:326-331.

141. **Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM.** Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn* **2005**; 25:65-72.
142. **Choueiri MB, Makhoul NJ, Zreik TG, Mattar F, Adra AM, Eid R, Mroueh AM, Zalloua PA.** The consanguinity effect on QF-PCR diagnosis of autosomal anomalies. *Prenat Diagn* **2006**; 26:409-414.
143. **Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, Waters JJ, Nicolaides KH.** Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. *BMJ* **2006**; 332:452-455.
144. **Kagan KO, Chitty LS, Cicero S, Eleftheriades M, Nicolaides KH.** Ultrasound findings before amniocentesis in selecting the method of analysing the sample. *Prenat Diagn* **2007**; 27:34-39.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeliha Özen GÜÇLÜTÜRK
Doğum Tarih ve Yeri : 09.07.1981
Medeni Durumu : Evli
Adres : Gazi mah. 1326 sok. Serttaş Apt. 14/8 MERSİN
Telefon : 0 506 532 76 28
Faks : -
E.posta : zozenozturk@yahoo.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Akdeniz Üniversitesi
Varsa Mezuniyet Derecesi : -
Görev Yerleri : Mersin, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji
Anabilim Dalı
Dernek Üyelikleri : Türk Biyokimya Derneği
Türk Klinik Biyokimya Derneği
Klinik Biyokimya Uzmanlar Derneği
Alınan Burslar : -
Yabancı Dil(ler) : İngilizce
Diğer Hususlar : -