

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN OLGULARDA
ARRAY CGH ANALİZİNİN YERİ VE ÖNEMİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Onur YILDIZ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatma SILAN

Çanakkale/2018

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN OLGULARDA
ARRAY CGH ANALİZİNİN YERİ VE ÖNEMİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Onur YILDIZ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatma SILAN

Çanakkale/2018

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı uzmanlık eğitimi
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Arş. Gör. Dr. Onur YILDIZ'ın Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/04/2018

TEZ KONU BAŞLIĞI

“Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Olgularda Array CGH Analizinin Yeri ve Önemi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma SILAN

Tez Jürisi Üyeleri:

Adı Soyadı

Prof. Dr. Fatma SILAN

Prof .Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Doç. Dr. Coşkun SILAN

İmzası

.....
.....
.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki
jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim
Kurulunun 17/05/2018 tarih ve 20.../4.. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tamer DEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında bilgisi ve sabrı ile her zaman yanımda olan, uzmanlık eğitimimde beni yönlendiren, her konuda bana yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Fatma SILAN' a çok teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimimde bilgi ve önerileri ile her zaman yanımda olan, beni yönlendirerek destek olan değerli hocam Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR' e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Uzman Dr. Mine URFALI, Asistan Dr. Barış PAKSOY, Asistan Dr. Taner KARAKAYA, yardımlarından dolayı arkadaşım Dr. Buse YÜKSEL'e çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Diğdem UYSAL' a, Şengül TÜRÜNZ' e, Merve ORDU' ya, Duygu KANKAYA' ya, Gaye ACAR' a, Hülya HAS' a çok teşekkür ederim.

Koşulsuz sevgi ve destekleriyle her zaman ve her durumda yanımda olan bana güç veren canım eşim Fatma YILDIZ' a ve üzerimde çok emeği olan anne ve babama çok teşekkür ederim.

Dr. Onur YILDIZ
Nisan 2018

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN OLGULARDA ARRAY CGH ANALİZİNİN YERİ VE ÖNEMİ

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Gebelik kayıplarının sebebini belirleyebilmek her zaman mümkün olmamaktadır ve günümüzde bile tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) öyküsüne sahip olguların %50'sinde hiçbir neden saptanamadığı bildirilmektedir. TGK öyküsüne sahip hastaların %3-8'inde Giemsa Tripsin (GTG) bantlama yöntemi ile analizi kromozom anomalileri saptanabilmektedir. Sitogenetik analizde ortalama 400-550 band düzeyinde analiz yapılabilmekte olup Array CGH (aCGH) yöntemi ile daha yüksek rezolüsyonda analiz yapılabilmekte ve submikroskobik delesyon-duplikasyonlar saptanabilmektedir. Bu hedefler doğrultusunda TGK öyküsü olan olgularda aCGH analizi ile tüm genom taranarak ilgili genlerin ve Kopya Sayısı Değişikliklerin (CNV) belirlenmesi amaçlanmaktadır.

YÖNTEM: Çalışmamızda laboratuvarımızda aCGH yapılmış olgular arasından 2 veya daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan 21 çift ve 22 tek olmak üzere, 32 kadın 32 erkek toplam 64 olgunun Agilent® 8x60K platformu kullanılarak yapılan aCGH analizleri retrospektif olarak değerlendirildi. Hasta grubumuzun verileri DGV (Database of Genomic Variants) veri tabanındaki sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı.

BULGULAR: TGK öyküsü olan 40 olguda (%62,5), 56 farklı bölgede toplam 83 CNV tespit edilmiştir. Saptanan bu CNV'ler değerlendirildiğinde; %36'sında (20/56) delesyon, %64'ünde (36/56) duplikasyon gözlenmiştir. 2 CNV bölgesinde patojenik delesyon saptanmıştır. 10q11.22 kromozom bölgesindeki GPRIN2, NPY4R, ANXA8 genlerini içeren heterozigot delesyon ve 1p36.22-p36.21 kromozom bölgesindeki TNFRSF8, TNFRSF1B, DHRS3 genlerini içeren heterozigot delesyon CNV değerlendirme ölçeğine göre patojenik olarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ: CNV saptanan genlerin DGV veritabanındaki toplum oranları ile karşılaştırılması yapılırken 2 ve daha fazla olguda saptanan genler değerlendirilmiş ve hasta grubumuzdaki LINC01237, LOC102723927,

ZRANB2-AS, LINC01566, NEGR1, FRG2DP, CYP2E1, DUSP22, CATSPER2 genleri DGV ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ancak genlerin fonksiyonu açısından TGK etiolojisinde anlamlı olabilecek UPK3B, POMZP3, PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4 genlerinin farklı bulunmaması DGV veritabanındaki olguların seçiminden kaynaklanıyor olabilir, bu genleri içeren CNVler için fertil sağlıklı kontrol gurupları ile çalışma yapılması gereklidir.

TGK etiolojisinde rol oynayabilecek genler çalışmamızda ortaya konmuş ve ileri analizlerin yapılması için yeni aday genler de literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca gebelik kayıplarında sadece anneye ait değil, babaya ait genetik faktörlerin de etioloji araştırmasının da önemli olduğu görülmüştür.

Gen içermeyen CNV'lerinde interkromozomal etki ile gametogenezi bozabildiği göz önüne alınırsa trombofili yanında aCGH ile CNV analizi, TGK ailelerinde olgularının eşleriyle birlikte analiz edilmesi durumunda %74'üne tanı konulabilmesini sağlayarak sebebi bilinmeyen oranını %50'den %26'ya indirmektedir. Olguların çift olarak değil de bireysel olarak analiz edilmesi durumunda %62'sine tanı konabilmiş ve idiopatik grup %38'e azalmıştır.

Tez çalışmamız literatürde TGK çiftlerinde aday genlerin de analiz edildiği ilk aCGH analizi olup bu konuda daha büyük hasta ve iyi seçilmiş kontrol gruplarıyla yapılacak çalışmalar TGK etiolojisinin aydınlatılmasına ve tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: aCGH, CNV, Tekrarlayan Gebelik Kaybı

THE IMPORTANCE AND DIAGNOSTIC VALUE OF ARRAY CGH ANALYSIS IN RECURRENT PREGNANCY LOSS COUPLES

SUMMARY

INTRODUCTION AND AIM: It is not always possible to determine the cause of pregnancy losses and even today it is reported that 50% of cases with recurrent pregnancy loss (RPL) have no reason to be detected. Chromosome anomalies can be determined by GTG banded analyse at a 3-8% percentage of the patients with RPL. Cytogenetic analysis can be performed at 550 bands resolution for detection the reason of RPL and higher resolution methods such as arrays can also be done, determining submicroscopic deletions- duplications. In our study; it is aimed to reveal the copy number variations (CNVs) of whole genome structure of RPL cases and the related genes by Array CGH (aCGH) analysis and carry out functional studies in the follow-up.

METHODS: We retrospectively again evaluated the data of 64 cases (32 women and 32 men) who applied to our clinic, 21 couples and 22 individuals, for the history of 2 or more recurrent pregnancy loss. aCGH analyses of all cases were performed with the Agilent® 8x60 K platform. Data from our patient group were compared with healthy controls in the DGV database.

RESULTS: A total of 83 CNVs were detected in 56 different regions in 40 cases (62.5%). When these CNVs are evaluated according to the regions; 36% (20/56) deletion, 64% (36/56) duplication were observed. In two CNV regions, pathogenic deletions were detected. Heterozygosity for a deletion in the chromosome 10q11.22 locus encompassed with GPRIN2, NPY4R, ANXA8 genes and in the chromosome 1p36.22-p36.21 locus flanking by TNFRSF8, TNFRSF1B, DHRS3 genes were evaluated as pathogenic according to CNV evaluation scale.

DISCUSSION AND CONCLUSION: While comparing the genes having CNV with the rates of the society received from DGV database, genes detected in two or more cases are analyzed and LINC01237, LOC102723927, ZRANB2-AS, LINC01566, NEGR1, FRG2DP, CYP2E1, DUSP22, CATSPER2 genes found in our patient group are statistically significantly different compared to

DGV database. UPK3B, POMZP3, PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4 genes that are found statistically insignificant even so might be considerable in RPL etiology in terms of genes' functions and it might be based on the selection of the cases from the DGV database. It is necessary to study with Fertile Healthy Control Groups for CNVs which include these genes.

Genes that can play a role in the etiology of recurrent pregnancy loss were shown in our study and new genes were added to the literature for further analysis. It was also found that not only maternal factors but also paternal factors are important in the etiology of RPL.

Considering CNV's not including genes may effect the gametogenesis by interchromosomal effect, CNV analysis with ArrayCGH along with trombophilia decreases the rates from 50% down to 26% of unknown reason rate and provides diagnosis of 74% in RPL families when analyzing cases with their mates. Cases when analyzing individually not as couples 62% can be diagnosed and the idiopathic group decreased down to 38%.

Our thesis study is the first aCGH analyze in literature in which the candidate genes are analyzed in RPL couples and studies conducted with greater and specially chosen control groups in this issue will contribute elucidating the RPL etiology and developing treatment protocols.

KEYWORDS: aCGH, CNV, Recurrent Pregnancy Loss

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
TABLolar	xi
ŞEKİLLER	xii
GRAFİKLER	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kromozom Anomalileri.....	3
2.1.1 İnsidans.....	4
2.1.2 Sayısal Kromozom Anomalileri.....	5
2.1.3 Yapısal Kromozom Anomalileri	6
2.1.4 Diğerleri.....	11
2.2 Gebelik Kaybı	13
2.2.1 Erken Gebelik Kaybı.....	13
2.2.2 Geç Gebelik Kaybı	13
2.2.3 İnsidans.....	13
2.2.4 Etiyoloji.....	14
2.3 Tekrarlayan Gebelik Kaybı.....	15
2.3.1 İnsidans.....	15
2.3.2 Etiyoloji.....	16
2.4 Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)	24
2.4.1 Array CGH'in Avantajları ve Dezavantajları.....	25
2.5 Kopya sayısı değişiklikleri (CNV)	26
2.5.1 Kopya sayısı varyasyonlarının yorumlanması	26
2.6 Tekrarlayan Gebelik Kaybı ile ilişkili Genler ve Çalışmalar	30
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	32
3.1 Hasta Grubu	32
3.2 Gereçler	32

3.2.1	Kullanılan Aletler	32
3.2.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.3	Yöntem	33
3.3.1	DNA İzolasyonu.....	33
3.3.2	Etiketleme öncesi gDNA hazırlığı	34
3.3.3	Array CGH Metodu ve Uygulanması	35
3.3.4	İstatiksel Analiz.....	43
4.	BULGULAR.....	44
4.1	Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri	44
4.2	Olguların Kromozom Analizleri	45
4.3	Kadın Olguların Trombofili Mutasyonları açısından analizleri	47
4.4	Olgularda Saptanan CNV'ler.....	48
4.5	Saptanan CNV'lerin Kromozomlara göre Dağılımları	53
4.6	Olguların Seçilen genler açısından CNV değişiklikleri	61
5.	TARTIŞMA	63
5.1	CNV bölgeleri ve içerdikleri genler	66
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
7.	KAYNAKLAR	86
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	100

KISALTMALAR

aCGH	(Array CGH) Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
APS	Antifosfolipid Antikor Sendromu
CNV	Copy Number Variation (Kopya Sayısı Değişilikleri)
COMU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyonu
F2	Faktör 2
FVL	Faktör V Leiden
gDNA	genomik DNA
GWAS	Genome-Wide Association Study
IVF	Invitro Fertilizasyon
Kb	Kilobaz
Mb	Megabaz
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (Çoklu prob bağlanmasına dayalı çoğaltma)
MTHFR	Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGD	Preimplantasyon Genetik Tanı
PKOS	Polikistik Over Sendromu
RPKM	Reads Per Kilobase per Million
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
TGK	Tekrarlayan Gebelik Kaybı
TIMP2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar

Tablo 2.1. 10.000 Gebeliğın İnsidans Sonuçları	4
Tablo 2.2. Habituel Abortusun Etiyolojik Sebepleri.....	16
Tablo 2.3. Bir CNV'nin Patojenitesinin Değerlendirilmesi	28
Tablo 3.1. Mikroarray başına gerekli gDNA hacmi ve miktarı	34
Tablo 3.2. Kesim karışımının hazırlanışı (8x mikroarray için).....	36
Tablo 3.3. Kesim için kullanılan ısı döngüsü programı	36
Tablo 3.4. Etiketleme karışımının hazırlanışı (8x mikroarray için)	37
Tablo 3.5. DNA etiketlemesinin ısı döngü programı	37
Tablo 3.6. Gerekli spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri	38
Tablo 3.7. Hibridizasyon Karışımı (8x mikroarray için)	38
Tablo 3.8. Hibridizasyon öncesi ısı döngü protokolü	39
Tablo 3.9. Yıkama Aşamasında gerekli olan bufferlar ve koşulları	40
Tablo 3.10. Enzimatik etiketlemenin kalite kontrol eşik değerleri	41
Tablo 4.1. TKG olgularının demografik ve ailesel verileri	45
Tablo 4.2. TKG olgularının Karyotip ve Gebelik Sonuçları	46
Tablo 4.3. Olguların Cinsiyetlere göre CNV, gen içeren ve gen içermeyen CNV dağılımı	48
Tablo 4.4. TKG olgularının aCGH Analiz Sonuçları	49
Tablo 4.5. Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı	53
Tablo 4.6. En az iki olguda saptanan CNV'lerin genlere göre dağılımı	57
Tablo 4.7. CNV saptanan genlerin DGV veritabanındaki toplum oranları ile karşılaştırılması	57
Tablo 5.1. CNV lerin prognostik faktör olarak değerlendirilmesi.....	83

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kromozom anomalilerinin sınıflandırması.....	3
Şekil 2.2. Yapısal kromozom anomali şekilleri	7
Şekil 2.3. Gebelik dönemleri spektrumu	13
Şekil 3.1. aCGH yöntemi basamakları	35
Şekil 3.2. SurePrint G3 ISCA V2 CGH 8×60K için Gasket slide.....	39
Şekil 3.3. Hibridizasyon Chamber	39
Şekil 3.4. Lam Tutucusu (Slide Holder).....	42
Şekil 3.5. aCGH Kalite Kontrol Raporu Örneği.....	42
Şekil 4.1. İki nolu olguda 1. kromozomun p36.22-p36.21 lokusundaki heterozigot delesyonun (792 Kb) aCGH görüntüsü.....	52
Şekil 4.2. Otuz yedi nolu olguda 7. Kromozomun q31.1 lokusundaki heterozigot delesyonun (398Kb) aCGH görüntüsü	52
Şekil 4.3. İkinci kromozomun q37.3 lokusundaki heterozigot delesyonun (150Kb) aCGH görüntüsü	55
Şekil 4.4. Onaltıncı kromozomun p11.2-p11.1 lokusundaki içeren heterozigot duplikasyonun (245Kb) aCGH görüntüsü.....	55
Şekil 4.5. İki nolu olguda 1p36.22-p36.21 bölgesinde yer alan TNFRSF1B geninde yer alan probun MLPA (SALSA MLPA P147 1p36 probemix) görüntüsü	56

GRAFİKLER

Grafik 4.1. CNV büyüklüklerine göre grupların delesyon ve duplikasyon durumuna göre dağılımı	51
Grafik 4.2. Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı.....	55
Grafik 4.3. TGK olan olguların en büyük gebelik kaybı haftasına göre CNV gen içerip içermeme dağılımı	59
Grafik 4.4. Gebelik kaybı sayısına göre CNV içeren olgu sayısı ve içerdiği CNV nin gen içerip ve içermemesine göre olgu sayısı dağılımı	60
Grafik 5.1. LINC01237 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	68
Grafik 5.2. ZRNAB2-AS2 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	68
Grafik 5.3. LINC01566 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	69
Grafik 5.4. TP53TG3HP geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	69
Grafik 5.5. FRG2DP geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	69
Grafik 5.6. SYCE1 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	71
Grafik 5.7. PIWIL3 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	71
Grafik 5.8. DUSP22 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	73
Grafik 5.9. CATSPER2 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	73
Grafik 5.10. PSG11 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	75
Grafik 5.11. ZNF595 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	75
Grafik 5.12. HAGLR geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	77
Grafik 5.13. ZFPM2 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	77
Grafik 5.14. ZFPM2-AS1 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	77
Grafik 5.15. ZDHHC14 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği	79
Grafik 5.16. FLJ36000 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	79
Grafik 5.17. LINC01208 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği.....	79

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gebelikte karşılaşılan en sık komplikasyonlardan biri de gebelik kayıplarıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), fetüsün doğum ağırlığının 500 g'dan az olduğu gebeliklerin sonlanmasını gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır (1). Gebeliklerin %15-25'i düşük ile sonuçlanır (2,3). Gebelik kayıplarının %3-5'i tekrarlayan tarzdadır (3). Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) ise klasik olarak 20. gebelik haftasından önce 2 veya daha fazla gebeliğin kaybı olarak tanımlanır. TGK etiyolojisinde yer alan başlıca nedenler arasında; anatomik faktörler, endokrin faktörler, kalıtılan trombofililer, immünolojik faktörler, enfeksiyöz faktörler, çevresel faktörler, erkek faktörü ve genetik faktörler sıklıkla yer almaktadır (2).

Abortus olgularının yaklaşık %60'ında genetik sebeplerin etkili olduğu düşünülmektedir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan olgulara kromozom analizi yapılmalıdır. Bu olguların birinde translokasyon saptanmış ise bir sonraki gebelik %68-80 oranında gebelik kaybı ile sonuçlanır. Böyle olguların tedavisinde PGD (Preimplantasyon Genetik Tanı) ile birlikte IVF (Invitro Fertilizasyon) ile kromozomal bozukluk taşımayan embriyoların transferi tedavide kullanılabilir. Gebelik kayıpların yaklaşık %50-70'i ölümcül kromozom anomalisine sahiptir (4).

Gebelik kayıplarının sebebini belirleyebilmek her zaman mümkün olmamaktadır. TGK öyküsüne sahip olguların %50'sinde hiçbir neden saptanamamıştır (5). Bu gruba idiopatik tekrarlayan gebelik kaybı olarak sınıflandırılır. Yapılan prospektif ve retrospektif çalışmalar önceki gebeliği kayıpla sonuçlanan kadınlarda bir sonraki gebelikteki kayıp riskinin arttığını ortaya koymaktadır.

Periferik kromozom analizinde 500-550 band düzeyinde analiz yapabilmektedir (5 Megabazdan daha küçük yapısal kromozom anomalileri saptanamayabilmektedir.). Ancak aCGH yöntemiyle daha yüksek çözünürlükte analiz yapabilmektedir (6). Tekrarlayan gebelik kaybı olan olguların konvensiyonel sitogenetik analizde saptanamamış submikroskopik kopya sayısı değişiklikleri saptamak amacıyla daha yüksek rezolüsyonda analiz yapılmalıdır. Bu çalışmamızda 2016-2017 yıllarındaki ÇOMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik

Tanı Merkezine 2 veya daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü nedeniyle başvuran 64 adet olguya ait yapılan Array CGH verileri değerlendirilecektir. Ayrıca retrospektif olarak olguların öyküleri, aile öyküleri, pedigrileri polikliniğimizdeki hasta formlarıyla, sitogenetik sonuçları, ve yapılan diğer moleküler analizleri değerlendirilecektir. Bu bilgiler sayesinde olguların daha ayrıntılı sonuçları saptanabilecektir.

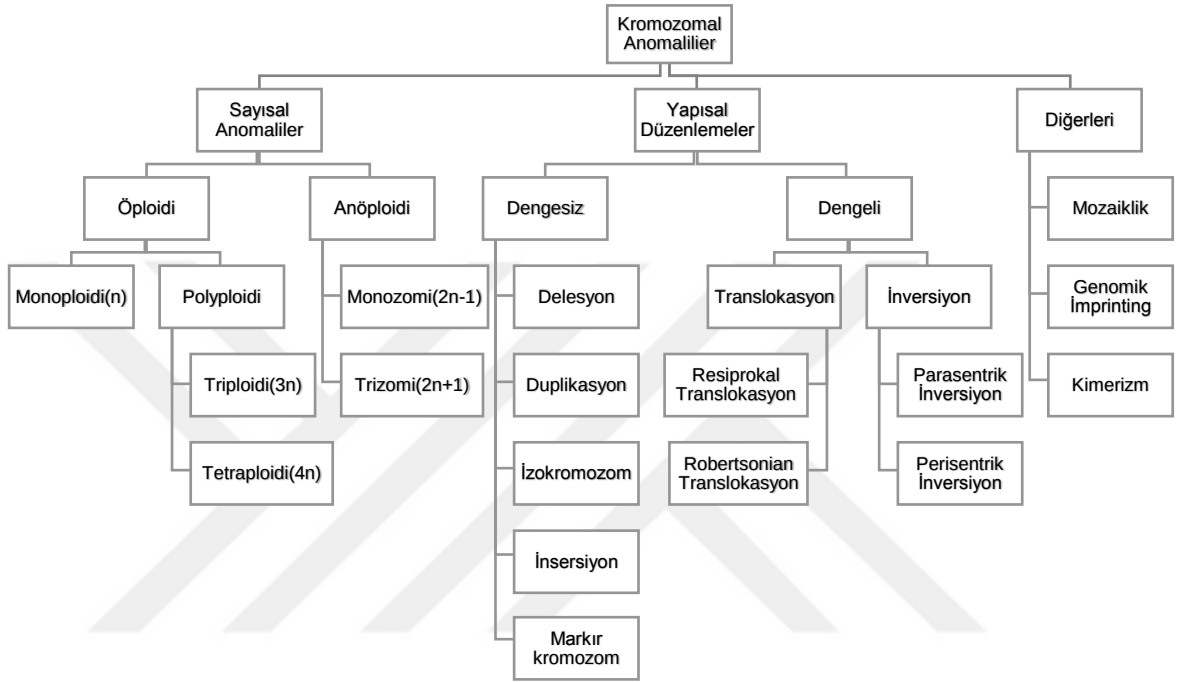
Bu çalışmamızda tekrarlayan gebelik kaybı olan ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran olgulara ait aCGH yöntemiyle elde edilen verilerin retrospektif olarak değerlendirilerek CNV içeren gen bölgeleri ile TKG arasındaki ilişkiyi belirlemeye dayalı bir çalışma planlanmıştır. Bu olguların genomunun yüksek çözünürlükle incelenmesi ve kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) belirlenmesi, klinik olarak anlamlı bölgelerin tespit edilmesine yol açacaktır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda saptanan kopya sayısı değişiklikleri, olguların sonraki gebelikleri açısından doğru bir şekilde yönlendirilmesine yardımcı olacaktır.

Ön planda TKG ile ilişkili (TIMP2, CTNNA3, SYCP3, ANXA5, FVL, NOS3, F2 vb.) genler açısından hastalar taranacak ve bu genlerdeki değişiklikler (delesyon-duplikasyon) DGV veritabanı kontrol olacak şekilde TKG ile ilişkisi belirlenecektir (7). Ayrıca olgularda saptanan CNV değişiklikleri (bizim taradıklarımız haricinde) tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi açısından diğer olgularda da taranarak DGV veri tabanındaki kontrol grubuna göre karşılaştırılması yapılacaktır.

Bu yöntem ile olgulardan 60 bin probun okunması ile ilgili verilerden belirlediğimiz lokuslar açısından değerlendirmeler yapılarak tekrarlayan gebelik kaybına sahip olgulardan retrospektif olarak kopya sayısı değişikliği saptananlarda hangi gen ve gen yollarını etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede tekrarlayan düşüklere sebep olan yeni aday genler bulunabilecektir. Saptanan genlerin hangi yollara ait olduklarının analizi (trombotik, immünolojik, plasental gelişim ile ilgili vb.) hastaların takibinde fayda sağlayabilecektir (7). Ayrıca aday genlerle ilgili yeni projeler geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bu şekilde bu hasta grubundaki olguların daha ileri ve etkin tanı almalarına olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kromozom Anomalileri



Şekil 2.1. Kromozom anomalilerinin sınıflandırması (8)

Bir kromozom anomalisi, doğrudan bir hastalık teşhisi ile ilişkili olabilir veya hastadaki fiziksel bir sorunu veya fenotipik anormalliği açıklayabilir (8). Bu nedenle, etkilenen bir kişinin, bilinen morfolojideki 23 kromozom çiftinin farklı bir kromozom yapısına sahip olup olmadığını belirlemek önemlidir.

Kromozom anomalileri sayısal ve yapısal olarak ikiye ayrılır ve bir veya daha fazla otozom, cinsiyet kromozomu veya her ikisini birden içerebilir. Kromozom anomalilerinin en yaygın tipi, ekstra veya eksik kromozoma bağlı olan anöploididir (13). Kromozom kuruluşu anöploid olan bireyler fiziksel ve/veya mental anomalilere sahip olabilirler.

Yapısal kromozom anomalileri (bir veya daha fazla kromozomu içeren yeniden düzenlemeler) nispeten daha yaygındır. Yapısal düzenlemeler genomik bir dengesizliğe yol açıp açmadığına bağlı olarak fenotipik bir etki

gösterebilir. Ayrıca dengeli kromozom abnormallikleri sonraki nesillerde dengesiz kromozomal anomalileri açısından yüksek bir risk taşımanın yanında kuşaklar boyunca hasta/anormal fenotipli birey ortaya çıkmadan da aktarılabileceklerinden dolayı önemlidir. TKG olan bireylerin, bir ya da daha fazla sağlıklı çocuklarının olması, bu kişilerin dengeli kromozom anomalisi taşımadıklarını göstermemektedir. Çiftlerde ve hatta hekimlerde böyle bir önyargı olmasına rağmen literatürde dengeli translokasyon taşıyıcısı olduğu halde 3 sağlıklı çocuğu olan olgu bildirilmiştir (9).

2.1.1 İnsidans

Yaşayan bireylerde gözlemlenen dengesiz kromozomal sayısal bozukluklar üç tane otozomal trizomi (trizomi 21, trizomi 18 ve trizomi 13) ve dört tane cinsiyet kromozomunun anöploidisidir (Turner sendromu (45,X), Klinefelter sendromu (47,XXY), 47,XYY ve 47,XXX). Triploidi ve tetraploidi kromozom kuruluşunda olan fetüsler genelde tipik olarak spontan düşük veya ölü doğum ile sonuçlanır ve çok az sayıda görülmektedir.

Tablo 2.1. 10.000 Gebeliğin İnsidans Sonuçları (11)

	Gebelik	Spotan Abortus (%)	Canlı doğum
Toplam	10.000	1.500 (15)	8.500
Normal karyotip	9.200	750 (8)	8.450
Abnormal karyotip	800	750 (94)	50
Spesifik anomaliler			
Triploid ve Tetraploid	170	170 (100)	0
45,X	140	139 (99)	1
Trizomi 16	112	112 (100)	0
Trizomi 18	20	19 (95)	1
Trizomi 21	45	35 (78)	10
Diğer trizomiler	209	208 (99.5)	1
47,XXY, 47,XXX, 47,XYY	19	4 (21)	15
Dengesiz düzenlemeler	27	23 (85)	4
Dengeli düzenlemeler	19	3 (16)	16
Diğerleri	39	37 (95)	2

2.1.2 Sayısal Kromozom Anomalileri

Bir kromozom kompleksi 46'dan farklı herhangi bir kromozom sayısına sahipse heteroploid olarak adlandırılır. Haploid kromozom sayısının (n) tam katlarına euploid ($n, 2n, 3n$ gibi) ve diğer kromozom sayıları anöploid ($n+1, n-1$ gibi) olarak adlandırılır.

1) Poliploidi (Tetraploid, triploid)

Normal somatik hücreler diploid ($2n$) hücrelerdir. Poliplodi, haploid sayının tam katı olan ve diploid sayıyı aşan kromozom sayısıdır. Abort materyallerde bazen triploid ($3n = 69$ kromozom) ve tetraploid ($4n = 92$ kromozom) hücreler gözlenmektedir.

Triploidi, gebeliklerin %1-3'ünde görülür (10). Triploid bebekler canlı doğabilirler, ancak uzun süre hayatta kalamazlar. Çoğunlukla bir yumurtanın iki sperm (dispermy) tarafından döllenmesiyle oluşur. Diğer durumlarda ise mayotik bölünmelerden birinin başarısızlığından kaynaklanır ve bu da diploid bir yumurta veya sperm oluşturur.

Bir triploid karyotipin fenotipik bulgusu, ekstra kromozom setinin kaynağına bağlıdır. Ekstra maternal kromozom seti olan triploidiler, gebelikte genellikle kendiliğinden erken dönemde düşük ile sonuçlanır veya süren gebeliklerde teratom saptanabilir; ekstra paternal kromozom setine sahip olanlar tipik olarak parsiyel mol hidatiform olarak adlandırılan anormal dejeneratif plasenta ve küçük bir fetusa sahiptirler. Triploidiler ileri hafta gebelik kayıplarında da ve ölü doğumlarda da saptanabilir.

Tetraploidler ise 92, XXXX veya 92, XXYY kromozom kuruluşuna sahip olup, zigotun erken bölünme başarısızlığından dolayı kaynaklanmaktadır.

2) Anöploidi

Haploid sayının tam katı sayıda olmazsa anöploidi olarak adlandırılır. Anöploidi, sayısal kromozom anomalilerinin en yaygın ve klinik olarak önemli bir türüdür. Klinik olarak tanı konulmuş tüm gebeliklerin en az %5'inde ortaya çıkmaktadır. Çoğu anöploidi vakasında, sıklıkla trizomi (bir kromozomun iki yerine üç tane bulunması) veya daha az sıklıkta monosomi (bir kromozomun iki yerine bir tane bulunması) bulunur.

Trizomi ya da monosomi ciddi fenotipik sonuçlara neden olabilir. Trizomi, genomun herhangi bir parçası için mevcut olabilir, ancak bir bütün kromozom için trizomi, genellikle yaşamla bağdaşmaz. Canlı doğan bebeklerde en yaygın tanısı konulan trizomi türü trizomi 21'dir. Canlı doğanlarda gözlenen diğer trizomiler, trizomi 18 ve trizomi 13'tür. Bu otozomların (13, 18, 21) üzerinde en az gen bulunan kromozomlar olması dikkat çekmektedir. Muhtemelen, daha çok gen içeren otozomlar için trizomi genellikle öldürücüdür (11). Tam bir kromozom içeren monozomiler hemen hemen her zaman öldürücüdür. Bununla birlikte, Turner sendromunda görüldüğü gibi X kromozomunun monozomisi bu durumun önemli bir istisnadır.

Anöploidi sıklıkla kardeş kromatidelerin anafazda ayrılmamasından dolayı yani **mayotik nondisjunctiondan dolayı** meydana gelmektedir (10). Bazende bu durum anafazda bir kromozomun geri kalmasından dolayı olabilir. Bu durum bir çift kromozomun, mayoz bölünme safhalarının birinde (genellikle mayoz I sırasında) düzgün şekilde ayrılmamasından dolayı kaynaklanmaktadır. Mayoz I ve mayoz II esnasında oluşan nondisjunctionun genomik sonuçları birbirinden farklıdır. Mayotik nondisjunction mayoz I sırasında olursa fazladan kromozomu olan gamet o kromozomun her iki homolog kromozomunu taşıyacaktır. Mayoz II sırasında olursa normal ve fazladan olan kromozom aynı olacaktır.

Ayrıca zigot oluştuktan sonra da mitotik bir bölünmede nondisjunction oluşabilir. Eğer bu erken bir bölünme evresinde olursa, klinik açıdan önemli bir mozaiklik ortaya çıkabilir. Bazı malign hücre serileri ve bazı hücre kültürlerinde, mitotik nondisjunction sonucu son derece anormal karyotiplere neden olabilir.

2.1.3 Yapısal Kromozom Anomalileri

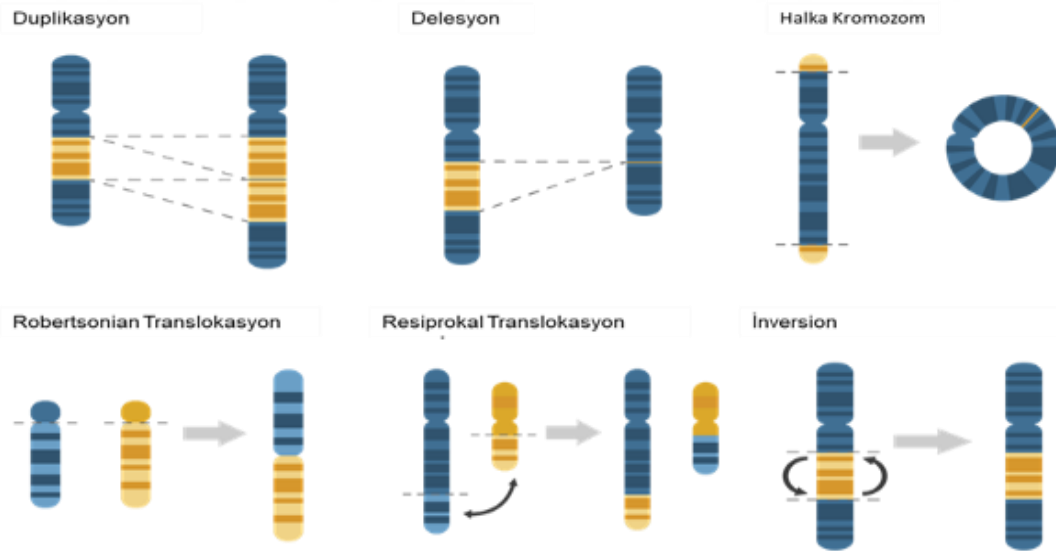
Genel olarak, yapısal anormallikler 375 yenidoğanın yaklaşık 1'inde mevcuttur. Yapısal yeniden düzenlenmeler, kromozom kırılması, parça değişimi veya rekombinasyondan kaynaklanır. Bir kromozom kırıldığında genellikle iki kararsız telomersiz yapışkan uç oluşur. Bunu takiben anormal kombinasyon yeniden yapılandırılır. Hem eşey hücrelerinde hem de somatik hücrelerde kromozom anomalilerinin çoğu rekombinasyon hatalarından dolayı oluşur. Özellikle tekrarlayan DNA bölgelerinde hatalı eşleşmeler görülebilir. Buda

yapısal anomalilere neden olabilir. Hâlbuki yeniden düzenlemeler pek çok yoldan olabilir olsa da, onlar anöplodiden daha az sıklıktadır.

Sayısal kromozom anomalilerinde olduğu gibi, yapısal yeniden düzenlenmeler bir kişinin tüm hücrelerinde veya mozaik formda olabilir. Yapısal yeniden düzenlenmeler dengeli (ekstra veya eksik kromozom parçası yoksa) ve dengesiz (ekstra veya eksik kromozom parçası varsa) olarak sınıflandırılır.

Yeniden düzenlemelerin bir kısmı stabildir (mitotik ve mayotik hücre bölünmelerini değiştirmeden geçme yeteneğine sahip) ve diğer bir kısmı ise anstabildir.

Açıkçası bu durumları saptayabilmek için yani özel bir yeniden düzenlemeyi analiz etmek için kullanılan yöntemin çözünürlüğü önemlidir. Örneğin yüksek çözünürlüklü bantlama düzeyinde dengeli kromozom kuruluşunda saptananlar, kromozomal mikrodizileme veya DNA dizi analizi ile çalışıldığında dengesiz kromozom kuruluşunda saptanabilir.



Şekil 2.2. Yapısal kromozom anomali şekilleri (12)

1) Dengesiz Yeniden Düzenlemeler

Dengesiz yeniden düzenlenmeler yaklaşık 1600 canlı doğumda 1 görülür. Birden fazla genin delesyonu ya da duplikasyonu ya da her ikisinin birden ortaya çıkması nedeniyle fenotipin, anormal olması muhtemeldir. Bir kromozomun bir kısmının duplikasyonu durumunda o segmentteki genler için parsiyel trizomi, delesyonu durumunda ise parsiyel monozomi olarak adlandırılır.

Genel bir kavram olarak, normal gen dozaj dengesini bozan herhangi bir değişiklik, anormal gelişime neden olabilir. Belirli bir vakada spesifik genlerin dozajı değiştirilmesine bağlı olarak, geniş bir fenotip aralığına neden olabilir.

En azından birkaç megabazlık dengesiz yeniden düzenlenmeler, yüksek çözünürlüklü karyotipleme de dahil olmak üzere rutin kromozom bandı seviyesinde tespit edilebilir. Daha küçük değişikliklerin saptanması için FISH veya kromozomal mikroyarray analizi gibi daha yüksek çözünürlüğe sahip yöntemler ile analiz yapılması gerekir.

a. Delesyon ve Duplikasyon

Sitogenetik olarak görünen otozomal delesyonlar, yaklaşık 7000 canlı doğumda 1 insidansa sahiptir. Delesyon bir kromozom segmentinin kaybedilmesi demektir ve bu durum kromozomun dengesiz olmasına neden olur. Bu durum basitçe kromozomun kırılması ve asentrik segmentin kaybı ile ortaya çıkabilir. Bir delesyon taşıyıcısı (bir normal kromozom ve bir delesif kromozom) normal kromozomun ilgili bölgesi açısından monozomiktir.

Klinik sonuçlar genelde haploinsufficiency (bulunan tek kopyanın iki kopya gibi işlevini yerine getirememesi) yansıtır. İncelendiğinde silinen segmentin boyutu, silinen spesifik genlerin sayısı ve fonksiyonu klinik sonuçların şiddetini hakkında bilgi verir. Daha küçük, submikroskopik delesyonlar mikroyarray analizi ile çok daha yaygın tespit edilir, ancak bu tür birçok varyantın klinik önemi henüz tam olarak belirlenememiştir.

Bir kromozomun sonunda (**terminal**) veya bir kromozom kolu boyunca (**interstisyel**) bir delesyon meydana gelebilir (13). Prenatal tanı, dismorfik veya zihinsel engelli hastaların incelenmesi sırasında birçok delesyon tespit edilmiştir. Genel olarak, duplikasyon delesyondan daha az zararlı görünmektedir. Aynı zamanda duplikasyon kromozomal dengesizliğe neden

olur. Bu kromozom kırıklarında genleri bozabilir ve çoğu zaman bazı fenotipik anormalliklere neden olur (14).

b. Marker ve Halka Kromozomlar

Çok küçük, tanımlanmamış kromozomlar marker kromozom olarak adlandırılır. Markır kromozomlarının prenatal sıklığı yaklaşık olarak 2500'de 1 olarak tahmin edilmektedir. Bu kromozomlar genelde kromozom hazırlığı sırasında görülür ve sıklıkla mozaik durumdadır. Bunlar genellikle normal kromozom kurulumuna ek olarak bulunur. Küçük boyutları nedeniyle, kesin olarak tanımlayabilmek için genellikle yüksek rezolüsyonlu genom analizi gereklidir.

Daha büyük markır kromozomlar, bir veya her iki kromozom kolundan genomik bölge içerir ve mevcut olan her gen için bir dengesizlik oluşturur. Markır kromozomun kökenine bağlı olarak fetal bir anormallik riski çok düşükten % 100'e kadar değişebilir. Tam olarak anlaşılamayan bir nedenden dolayı, bu markırların yüksek bir oranı kromozom 15 ve cinsiyet kromozomlarından kaynaklanmaktadır (15).

Çoğu markır kromozom telomer içermez ve bu kromozomlarda iki kırık oluşup, kırık uçları birleşerek halka kromozomu oluştururlar. Bazı halka kromozomlar mitozda güçlük yaşar. Halka kromozomun iki kardeş kromatidi anafazda ayrılma girişiminde karışıklığa neden olur. Bu kromozom kırılabilir, buna takiben füzyon gelişir ve böylece daha büyük ve daha Halka kromozomlar oluşturulabilir. Bu mitotik instabilite nedeniyle, Halka kromozomların hücrelerin yalnızca bir bölümünde bulunması nadir değildir.

c. İzokromozom

İzokromozom, bir kolun delesif olduğu ve diğer kolun ayna görüntüsü biçiminde çoğaltılan bir kromozomdur. Bu nedenle, bir izokromozom taşıyan 46 kromozomlu bir kişi, bir kolun genetik materyalinin tek bir kopyasına (parsiyel monosomi) ve diğer kolun genetik materyalinin üç kopyasına (parsiyel trizomi) sahiptir.

Bir dizi otozom için izokromozom tanımlansa da, en yaygın izokromozom, Turner sendromlu bireylerin bir kısmında saptanan i(X)(q10)'dur

(13). Aynı zamanda izokromozomlar hem solid tümör hemde hematolojik malignansi olan kişilerin karyotiplerinde görülür.

d. Disentrik Kromozom

Disentrik kromozom, sentromer içeren iki kromozom parçasının sentromeri bulunmayan parçalarını kaybederek uç uca eklenmesiyle oluşan nadir görülen bir kromozom anomalisidir. Disentrik kromozomlar iki sentromeri olmasına rağmen iki sentromerden bir tanesi epigenetik olarak baskılanırsa veya iki sentromer daima anafaz sırasında hareketlerini bir ya da diğer kutba koordine ederse bu kromozomlara psödodisentrik kromozomlar denir. En yaygın psödodisentrik kromozomlar cinsiyet kromozomları ve akrosentrik kromozomlardır.

2) Dengeli Yeniden Düzenlemeler

a. Translokasyonlar

Kromozom parçalarının kromozomlar arası yer değiştirmesidir. Bu değişim genelde etkisiz DNA kaybına yol açar ve genler açısından fonksiyonel kayba yola açmaz. Dengeli olduğu sürece translokasyona sahip bireyler genelde klinik olarak normaldir. Bu durumun riski bu bireylerin çocukları dengesiz bir yeniden düzenleme açısından risklidir. Üç tip translokasyon mevcuttur.

i. Resiprokal Translokasyon

İki kromozomun kırılan uçların distalinde kalan kromozom parçalarının bir biriyle parça değişimine denir. Bu şekilde olup dengeli taşıyıcılar sağlıklı olsada oluşacak gametler dengesiz olma ihtimali vardır. Dengesiz olan embriyo gebelik kaybı olabileceği gibi yaşaması durumunda mental motor retardasyon ve doğumsal anomalilere sahip olabilir. Dengesiz olma ihtimali saptananlarda bu durum daha fazladır, çünkü bu şekilde oluşan fetüslerin bir kısmı gebelik kaybı ile sonuçlanmaktadır. Genel olarak translokasyon taşıyıcı bireylerin çocukları kendi gibi taşıyıcı olması yanı sıra dengesiz bir translokasyon taşıyıcısı olabileceği gibi normal olma ihtimalide vardır (16).

ii. Robertsonian Translokasyon

İki akrosentrik kromozomun sentromeri ya da sentromerine yakın bir bölgeden kırılarak çapraz birleşmesiyle oluşur. Kromozom 13 ve kromozom 14'ün robertsonian translokasyonu en sık rastlanılan robertsonian translokasyonudur. Bunun kromozom 14 ve kromozom 21'in oluşturduğu translokasyon izler.

iii. İnversiyonal Translokasyonlar

Bir ya da iki kromozomda üç kırık oluşarak kromozomdan çıkan parça başka bir bölgeye gider ve oraya eklenerek oluşur. Buna inversiyonel tip translokasyon denir ve bu tip translokasyonlar 3 kırık gerektirdiği için çok sık görülmemektedir (16).

b. İnversiyon

İki noktadan kırılan kromozomun 180 derece dönerek aynı yere yapışması sonucu oluşan kromozomal anomalidir. Her iki kırılan bölge tek kol üzerinde oluşarak sentomer dahil olmaması durumuna parasentrik inversiyon denilmekle birlikte, eğer kırılmalar iki kolda oluşarak sentromerinde dahil olduğu durumda ise perisentrik inversiyon denir. Genel olarak bir anormalliğe yol açmamak ile birlikte dengesiz gamet oluşturma riski taşımaktadır.

2.1.4 Diğerleri

1) Mozaisizm

Mozaiklik, genetik varyantın ekspresyonundaki hücreye özgü farklılıklardan kaynaklanan bir hastalığın hücresel veya doku düzeyinde, heterojen ekspresyonunu ifade eder (17). Mozaiklik, tek bir döllenmiş yumurtadan meydana gelen bir kişide genetik olarak birbirinden farklı hücrelerin iki popülasyona sahip olduğu durumunu ifade eder. Gelişmekte olan bir blastokistin veya embriyonun bir hücresinden meydana gelen mozaiklik, birkaç mekanizmadan biriyle ortaya çıkabilir. Gelişim sırasında daha sonra meydana gelen etkiler hücrelerin daha küçük bir bölümünü ve hücre hatlarının daha sınırlı sayıda etkilenmesini sağlar. Mozaik bireyler genetik değişikliği gametlerde mevcutsa bu değişikliği bir sonraki kuşağa aktarabilir. Bir hastalık taşıyıcılığı için

mozaikliğe sahip bir birey, germline olarak ilişkili varyantı barındırıyorsa, bu taşıyıcılık, bu varyantı kalıtan çocuklarda yeni bir bulgu olarak ortaya çıkabilir (18).

2) Genomik İmprinting

İmprinting cinsiyete özgü epigenetik değişiklikler nedeniyle varyantın anne veya babadan kalıtılıp kalıtılmamasına bağlı olarak bir genetik varyantın ekspresyonundaki farklılıkları ifade eder (17). Bazı taşıyıcıların ekspresyonu, mutasyonların bir ebeveynden veya diğerinden kalıtılıp kalıtılmadığına bağlıdır. Parental imprintingin, gametogenez sırasında (döllenmeden önce) yumurta ve spermde yer alan DNA'nın epigenetik modifikasyonu yoluyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Dişi hattında devre dışı bırakılan (susturulan) genlerin maternal imprinted olduğu söylenir (yalnızca paternal olarak türetilen alel ifade edilir ve aktif olur); erkek hattında inaktif olan (susturulan) genlerin paternal imprinted olduğu söylenir (sadece maternal türev alel ifade edilir ve etkindir).

3) Kimerizm

Kimerizm, mozaikliğin aksine, iki veya daha fazla döllenmiş yumurtanın füzyonu sonucu nedeniyle genetik olarak farklı hücrelerin iki veya daha fazla popülasyona sahip olduğu nadir bir durumdur.

2.2 Gebelik Kaybı

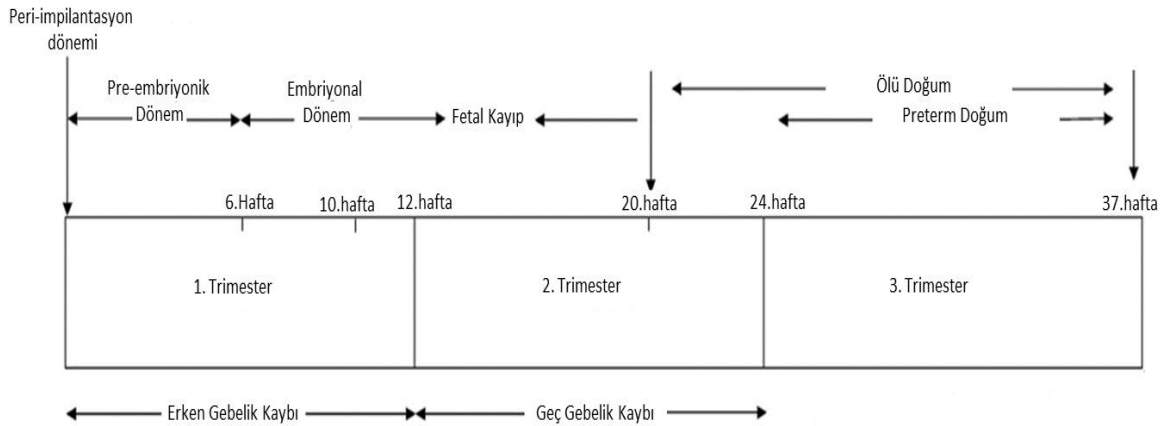
Gebeliğin ilk 6 haftalık dönemi pre-embriyonik periyottur. Embriyonik periyod 6. haftadan 10. haftaya kadar devam eder. Fetal periyod ise 10. haftadan başlar, gebeliğin sonuna kadar sürer. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), gebelik kaybını 500 gramdan küçük bir fetüs veya embriyonun (yaklaşık 20-22 haftalık) doğumu olarak tanımlanmaktadır (1). Gebelik kaybı erken ve geç gebelik kaybı olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.2.1 Erken Gebelik Kaybı

Gebeliğin ilk 12 haftasında olan düşüğe erken gebelik kaybı olarak adlandırılır ve gebelik kesesinin boş veya kardiyak aktivitesi olmayan bir fetüs bulunan gebeliği ifade eder (19).

2.2.2 Geç Gebelik Kaybı

Gebeliğin 12. haftasından 20-24. haftasına kadar olan düşüğe geç gebelik kaybı olarak adlandırılır.



Şekil 2.3. Gebelik dönemleri spektrumu (20)

2.2.3 İnsidans

Spontan gebelik kaybı şaşırtıcı derecede yaygın bir durumdur. Bütün gebeliklerin sadece %30'u canlı doğum ile sonuçlanır (21). Özellikle TKG ile karşı karşıya kalındığında spontan gebelik kaybı çiftler için fiziksel ve duygusal olarak ağır bir yüküdür. Tanısı konulmuş gebeliklerin %15-20'si gebelik kaybı ile

sonuçlanmaktadır (22,23). Gebelik kaybı haftasının üst sınırı genellikle 20-24 hafta olarak kabul edilmesine rağmen, bunların % 80'i gebeliğin ilk 12 haftasında görülür (19).

2.2.4 Etiyoloji

Geleneksel sitogenetik analiz, trizomi, monozomi veya poliploidi gibi sayısal kromozom hataları veya yapısal kromozom düzenlemelerinden dolayı oluşan gebelik kayıpları açısından yıllardır kullanılmaktadır. Gebelik kayıplarının yaklaşık %50-70'inde lethal kromozom aberrasyonları mevcuttur (24,25). Gebelik kayıplarının, letal submikroskopik değişikliklerden kaynaklanma ihtimali yüksektir.

Spontan düşüklerin kromozom anomalilerin genel sıklığı %40 ile %50 arasındadır ve kromozom anomalileri canlı doğanlarda görülenlerden farklıdır (13). Abortuslarda en sık görülen kromozom anomalisi 45,X olup, kromozomal anomalili spontan abortusların yaklaşık %20'sini, ancak kromozomal anomalli canlı doğumların %1'inden daha azını oluşturmaktadır. Trizomi 16 ise canlı doğumlarda hiç görülmemekle birlikte, trizomili abortusların yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır.

Her gebelik kaybı bir sonraki gebeliğin kayıpla sonuçlanmasını artırmakla birlikte artan maternal yaşta gebeliğin kayıp ile sonuçlanma riskini artırmaktadır (26). Gebelik kaybı, 18 yaşından genç ve 35 yaşından büyük kadınlarda daha yaygındır, önceki gebelik kaybı sayısı ile yükselir ve özellikle maternal yaşın ilerlemesiyle birlikte de bu risk yükselmektedir (19). Gebelik kaybı riski maternal yaşın 35'i geçmesi ile hızla yükselmektedir (27). 20-24 yaşındaki bireylerde %9,5 iken, 45 yaş ve üstünde %76'ya kadar yükselmektedir. Çoğunlukla artmış trizomi sıklığı nedeniyle olmaktadır.

Bir gebelik kaybı geçiren kadınların %90'ı daha sonra sağlıklı bir bebeğe sahip olabilirler, iki gebelik kayıbindan sonra ise %50-60'ında sağlıklı bir bebek sahibi olabilirler. Hatta üç kez düşük yapmış bir kadın bile, dördüncü kez başarılı bir hamilelik şansı ise yaklaşık %40'tır. Gebelik kaybı etiyolojik analizinin, çiftin sonraki gebeliklerindeki doğum öncesi bakımın da önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir (28).

Üreme hikâyesi gebeliğin devamı hakkında bizi yönlendirme konusunda önemlidir. Canlı doğum öyküsü olan bireyler, gebelik kaybı olan bireylere göre bir sonraki gebeliklerinin kaybı konusunda daha az risk taşırlar. Bununla birlikte canlı doğum gerçekleştirmiş bireyler bir sonraki gebeliklerinde sorunla karşılaşabilirler ancak sekonder tekrarlayan gebelik kaybı olan bireylere göre prognozları daha iyidir.

Geleneksel karyotiplendirme gebelik kaybında etiyolojiye yönelik olarak kullanılmaktadır, ancak hücre kültürü –metafaz analizi temelli bu tekniğin birçok sınırlaması vardır. Komperatif genomik hibridizasyon (aCGH) ya da tek nükleotid polimorfizm (SNP) genotiplendirmede kullanılarak daha yüksek çözünürlük sayesinde gelecekte geleneksel karyotipin yerini alabilir. aCGH, genom içinde 100 Kb'a kadar çözünürlüğe sahiptir. Bu yöntem ayrıca submikroskopik düzeydeki kopya sayısı artış veya kayıplarını (Copy Number Varyant, CNV) tespit eden DNA temelli bir tekniktir.

2.3 Tekrarlayan Gebelik Kaybı (TGK)

İki veya daha fazla gebelik kaybı olmasına tekrarlayan gebelik kaybı denir (29). Ancak bazı yayınlarda üç gebelik kaybını teşhis için öngörmektedir ve sonrasında değerlendirme önermektedir (20). Tekrarlayan gebelik kaybı, öncesinde canlı doğum gerçekleşip gerçekleşmediğine bağlı olarak primer veya sekonder bir süreç olarak sınıflandırılabilir.

Tekrarlayan gebelik kaybı, üreme tıbbındaki en belirsiz ve zor alanlardan biridir, çünkü etiyoloji genellikle bilinmemektedir ve kanıta dayalı tanı ve tedavi stratejileri yeterince mevcut değildir. Ayrıca, tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan çiftler yoğunlukla nüks ve tekrarlama riskini öğrenmek istemektedirler.

TGK, çiftler için sıkıntılı bir süreçtir, çünkü her gebelik kaybından sonraki gebeliğin düşükle sonuçlanma ihtimali yükselmektedir (30). TGK ile gebelik sürecindeki komplikasyon ihtimali de yükselmektedir (31).

2.3.1 İnsidans

TGK'ı gebelik planlayan çiftlerin yaklaşık %3-5'ini etkiler (20,32). Kapsamlı bir değerlendirme yapılmasına rağmen, çiftlerin %50'sinde herhangi bir faktör belirlenememiştir (4).

2.3.2 Etiyoloji

TGK ile ilişkili faktörler, genetik, trombofilik, çevresel, anatomik, endokrin ve otoimmün faktörlerdir (33). İmmün sistem disfonksiyonu ve trombofilik bozukluklar da dahil olmak üzere TGK riskini artırdığı bilinen bir dizi faktör olmasına rağmen, olguların yaklaşık yarısında altta yatan etiyoloji bilinmemektedir (34). Geç gebelik komplikasyonları (fetal büyüme geriliği, preterm doğum ve preeklamps gibi) da TGK ile ilişkili olabilmektedir (35).

Günümüze kadar, TGK'nın genetik yatkınlığına odaklanan çalışmaların çoğunluğu, birçok aday genin tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) ele almıştır. Son zamanlarda, CNV'ler TGK'ya etkisinin olabileceği önerilmiştir (36). TGK'lı olguları değerlendirirken hekim mevcut sınıflamanın farkında olmalı, önceki gebelik kayıplarının nedenini belirlemeli ve olası tüm riskleri değerlendirmelidir.

Tablo 2.2. Habituel Abortusun Etiyolojik Sebepleri

1. Genetik nedenler
I. Kromozomal anomaliler
II. Maternal yaşa bağlı anöploidiller
III. Parental dengeli translokasyonlar
IV. Tek gen hastalıkları
V. SNP ve CNV'ler
2. Trombofilik nedenler
I. FVL mutasyonu
II. Protrombin mutasyonu
III. MTHFR mutasyonu
3. İdiopatik nedenler
4. Endokrinolojik nedenler
I. Polikistik Over Sendromu
II. Hipotiroidi
III. Diabet
IV. Luteal Faz defekti
5. İmmünolojik nedenler
I. Antifosfolipit Antikor sendromu

II. Çölyak hastalığı
6. Yaşam tarzı ve Çevresel nedenler
I. Sigara
II. Kafein
III. Alkol
IV. Radyasyon
V. Obezite
VI. Stres
7. Anatomik nedenler
I. Konjenital Uterin anomaliler
II. Servikal yetmezlik
III. Kazanılmış uterin defektleri
a) Miyomlar
b) Adezyonlar
8. Enfeksiyöz nedenler

1) İdiopatik nedenler

TGK öyküsüne sahip olguların %50'sinde hiçbir neden saptanamamıştır (37–40). İdiopatik TGK genetik yatkınlığa işaret eden üç kanıt üzerinde durulmuştur (41).

1. İdiopatik TGK olgularının kardeşleri kontrol grubuna göre daha yüksek oranda spontan gebelik kaybı yaşamaktadır.
2. Spontan gebelik kaybının sayısı arttıkça riski de artar.
3. İdiopatik tekrarlayan gebelik kaybı çiftlerinin gebelik kaybının olduğu hafta genelde aynı dönem içindedir (%90'ı gebeliğin ilk 12 haftasından öncedir.).

İdiopatik gebelik kaybı hastalarının birinci derece yakınları arasında TGK prevalansı, genel popülasyona kıyasla 6 kat artmıştır (42). DNA metilasyonu, skewed X inaktivasyonu, kromozom heteromorfizmleri, sperm DNA fragmentasyonu gibi genetik faktörler test edilmiş ancak hiçbiri idiyopatik tekrarlayan gebelik kaybı açısından majör bir risk faktörü olarak kabul görmemiştir.

İdiopatik TGK olan kadınlarda saptanan genetik varyantların fonksiyonları göz önüne alındığında, genlerden bazıları immün yanıt (KIR2DS4, MBL, IFNG, IL10, KIR2DS2, KIR2DS3, TNF), pıhtılaşma (F5, F2, PAI-1, PROZ), metabolizma (GSTT1, MTHFR) ve anjiyogenez (NOS3, VEGFA) ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (41).

2) Genetik nedenler

Gebelik kayıplarının kromozomal nedenleri bilinen dengeli parental anomalilerin bir sonucu olarak embriyonik hataları veya normal karyotipleri olan ebeveynlerin de novo embriyonik hatalarından dolayı olabilir.

Genetik faktörler, erken spontan gebelik kaybının en yaygın nedenidir (%50-60) (43). Olguların yaklaşık yarısında anöploidler gibi kromozom anomalileri gözlenir (44). Kromozom anomalileri, birinci trimester gebelik kayıplarının %50'si, ileri hafta gebelik kayıplarının % 5'i ve canlı doğumların %0,5'inde görülür (45).

Blastosistte anöploidiye ve mozaikliğe yol açan kromozom anomalilerinin artışı genellikle annenin yaşıyla ilişkilidir. Normal karyotipi olmayan ve TGK olan çiftlerde daha sonra canlı doğum yapma olasılığı %66 iken, normal karyotipi olan çiftlerde canlı doğum yapma olasılığı %78'dir (46). TGK'nın ailesel segregasyonu genetik yatkınlığın katkısını göstermiştir (47).

TGK öyküsü olan çiftlerin yaklaşık %2-5'inde bir eş (sıklıkla kadın) genetik olarak dengeli bir yapısal kromozom anomalisine sahiptir (27,48), en sık olarak dengeli translokasyonlar saptanır. Normal popülasyondaysa bu oran %0,2'dir (49). %60 resiprokal ve %40 Robertsonian translokasyon taşıyıcılığı saptanır (45,50). TGK ile kromozomal inversiyonlar, insersiyonlar ve mozaizm gibi yapısal anomaliler ile ilişkilidir (27,51). Yapısal bir yeniden düzenlenme taşıyıcıları bu açıdan ebeveynlerdeki genetik anormallikleri açısından değerlendirmek önemlidir. Ancak, büyük çalışmalar, yapısal düzenlemesi olan taşıyıcıların yaklaşık %71'i canlı olarak doğduğunu göstermiştir (19).

TGK'nın diğer muhtemel genetik nedenleri, gross kromozom anormallikleri içermeyen blastokistin veya embriyonun gelişimsel kusurlarından

dolayı olabilir, fakat muhtemelen defektif bir maternofetal immünolojik durum veya bozuk uterin fonksiyondan dolayı kaynaklanabilmektedir.

TGK ile ilgisi bildirilen tek gen bozukluklarından biride otozomal dominant olarak kalıtılan myotonik distrofidir (52). TGK ile ilişkili genetik polimorfizmleri ele alan çok sayıda makale vardır. Ancak şimdiye kadar genetik polimorfizm analizi sınırlı sayıda gen üzerinde yoğunlaşmıştır.

3) Endokrin nedenler

TGK'nın yaklaşık %17-20'sini endokrin nedenler (Diabetes mellitus, luteal faz defekti, polikistik over sendromu (PKOS), tiroid hastalığı ve hiperprolaktinemi gibi) oluşturmaktadır (53). Hafif endokrin hastalıklar tekrarlayan düşük ile ilişkili değildir.

TGK olan olgularda antifosfolipid antikorlar (aPLs) ve anti-tiroid antikorları arasında belirgin bir ilişki bildirilmiştir (54). alışmalar TGK  yk s  olan kadınların en az % 40'ında PKOS bulgusu bulmuştur (23). Yapılan bazı çalışmalarda PKOS'ta plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)'de ve plazma homosistein düzeyinde artış saptanmıştır ve bunlar tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili bulunmuştur (55).

Kötü kontrollü diabetes mellitus ve belirgin tiroid işlev bozukluğu TGK ile ilişkilidir. Otoimmün tiroid hastalıkları aynı zamanda  tiroid olanlarla TGK ile ilişkilidir. Ancak, yüksek anti-tiroid antikor düzeyleri olan kadınlar, düşük antikor konsantrasyonlarına sahip olanlardakinden daha fazla gebelik kaybindan etkilenmemektedirler (56).

Günümüzde araştırmacıların çoğu, luteal yetmezliğin tekrarlayan spontan düşük nedeni olmasına rağmen nadir olduğunu düşünmektedir. Hiperprolaktinemi, gebelik kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Diğer hormonal anormalliklerin rolü hala tartışmalıdır.

4) Anatomik nedenler

Genel populusyonda müllerian anomali oranı %5 dolayındadır (49). Doğumsal uterin malformasyonlar, TGK  yk s  olan kadınların yaklaşık %10-15'inde tespit edilmektedir (27,57). Bunlar arasında konjenital uterin anomalileri, intrauterin adezyonlar ve uterin myomlar veya polipler bulunmaktadır.

Uterin septum, TGK ile en sık bağlantılı konjenital uterin anomalidir (19) ve etkilenen hastalarda spontan gebelik kaybı riski %76'dır (27). Septumda vasküler yetmezlikten dolayı kaynaklanmaktadır. Septum ne kadar uzun olursa, prognoz o kadar kötü olmaktadır. Diğer müllerian anomaliler TGK riskinde küçük artışlara neden olmaktadır (58).

Endometrial boşluğu deforme eden submukoz leiomyomalar, normal implantasyonu engelleyerek TGK'na neden olabilmektedir. Bununla birlikte, intramural, subseröz miyomlar ve gebelik kaybı arasındaki ilişki halen tartışma konusudur.

Adenomyozis infertilite ile ilişkili değildir. Bununla birlikte, son çalışmalar, adenomyozisin bir immünolojik mekanizmayla başarılı embriyo implantasyonuna müdahale ederek TGK neden olabileceğine işaret etmektedir (59).

Servikal yetmezlik, servikal kanalın asemptomatik olarak genişlemesi ile karakterizedir ve genelde gebeliğin ikinci trimesterinde meydana gelmektedir. İnsidansı 1/57-1730 gibi geniş bir aralığa sahiptir. Ayrıca İnterauterin adezyonlarda gebelik kaybı nedenleri arasındadır.

5) Enfeksiyöz nedenler

TGK'ında enfeksiyöz ajanların rolü daha az belirgindir ve insidans %0.5-5 oranındadır (53). Toksoplazma, Rubella, Sitomegalovirüs, Listeria, Klamidya, Mikoplazma, Ureaplazma, Herpes virüs ve Parvovirüsler spontan düşükle ilişkili olmasına rağmen, bakteriyel ve viral organizmalar ile tekrarlayan düşük arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bundan dolayı bu ajanların rutin olarak taranması ve tedavisi endike değildir.

6) Yaşam Biçimi ve Çevresel nedenler

Çiftler, sorumluluk ve suçluluk hissinden dolayı, çoğunlukla çevresel maruziyetlerin gebelik kayıplarına neden olabileceği ihtimalinden endişe duymaktadır. Çevresel maruziyetlerin gebelikte, özellikle TGK'da etkisi tartışmalı bir konudur ve bazı karışık faktörler güvenilir verileri elde etmeyi zorlaştırmaktadır.

Çevresel olarak sigara, alkol, kahve ve kafein kullanımı, çevresel toksinler, radyasyon ve manyetik alan maruziyeti ve yaşam biçimi açısından obezite, egzersiz, stres ve depresyon gibi faktörler mevcuttur. Sigara, alkol ve kafein olmak üzere maruz kalınan üç özel madde dikkat çekmiştir ve yaygın kullanımları ve değiştirilebilir nitelikleri göz önünde bulundurulduğunda özel olarak dikkate alınmalıdır. Baba tarafından sigara içilmesi de düşük yapma riskini artırır. TKG ile mesleki faktörler, stres, kimyasallara düşük seviyeli maruz kalma arasındaki ilişkiyi desteklemeyen bilgiler de mevcuttur (60).

Hayvan ve insan verileri, radyasyon maruziyetleri 5 rad'ın altında olanlarda düşükten yapma riski bulunmadığını göstermiştir. Dolayısıyla, 5 rad'dan birkaç kat daha düşük olan radyolojik yöntemler, düşük yapma olasılığını değiştirmemektedir (19). Stres bazı vakalarda uteroplasental fonksiyonu etkileyerek ileri gebelik haftasında gebelik kaybına neden olabilir ancak erken gebelik kaybıyla ilişkili değildir. TKG ile ilişkili depresyon için danışmanlık hizmeti alan kadınlar başarılı gebelik oranlarının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Obezite (vücut kitle indeksi > 29,9 kg / m²) gebelik kaybı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (61).

7) İmmünolojik Faktörler

Fetüs genetik olarak annesiyle aynı olmadığı için, annenin gebelik boyunca gebeliği süresince immün reaksiyon gelişmeden taşıması gerekmektedir. İmmünolojik mekanizmalardan dolayı hem sporadik hem de tekrarlayan gebelik kaybına yol açabilecek anormalliklerin olabileceği unutulmamalıdır. Bu konuya yönelik uygun tanı ve tedavide fikir birliği bulunmamaktadır.

Spesifik bir otoimmün bozukluk olan Antifosfolipid Antikor Sendromu (APS), TKG dahil birçok kötü obstetrik sonuçlarla açıkça bağlantılı olduğu için özel olarak dikkat gerektirmektedir. APS genel popülasyonda %3-5 prevalansı olan bir risk faktörüdür. APS'nin TKG'ya neden olduğu mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. TKG açısından değerlendirmek için antikardiyolipin antikorları ve lupus antikoagülanı için test yapılmalıdır (62).

Çölyak hastalığı gluten alerjisinin neden olduğu sistemik bir otoimmün hastalıktır ve gebelik kaybı ile ilişkilidir. Gebelik kaybı olan ve Çölyak hastalığı olan hastalar diyetlerine dikkat ettiklerinde düşük oranının azaldığı gösterilmiştir.

Birçok çalışma, tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerin birkaç HLA lokusunu araştırdı (63,64). Ancak soruna neden olan hiçbir şey tespit edilememiştir. Sonuç olarak, anormal immun cevaplar bazı hastaların tekrarlayan gebelik kaybı yapmasına neden olmaktadır, ancak hangi hastalar ve hangi terapiler şu anda bilinmemektedir (64). Bu nedenle, Th1 ve Th2 profilleri, ebeveyn HLA profilleri, natural killer hücreler ve antiparental sitotoksik antikorlar için testlerin bakılması önerilmemektedir.

8) Trombofilik nedenler

Başarılı bir gebeliğin vazgeçilmez ve hayati bileşeni, plasental vasküler yapının sağlıklı bir şekilde büyümesi ve gelişmesidir. Uteroplasental ara yüz maternal kalp debisinin yaklaşık %20'sini almaktadır. Annenin tromboza eğilimi varsa, plasentadaki bu trombojenik mikro ortam uteroplasental ara yüzde birden fazla küçük enfarktüs oluşturarak yoğunlaşabilir. Bu şekilde plasentanın mikrovasküler yapısında tromboz olması nedeniyle gebelik kaybı oluşabilmektedir. Trombofilik faktörler tekrarlayan gebelik kaybıyla ilişkilendirilmiştir (65,66). İkinci trimester ve geç gebelik kaybıyla daha kuvvetli bir ilişkisi mevcuttur (19,67). Trombofilik faktörler genetik nedenler içinde yer alsa da edinsel olarak da olabildiği için ayrı bir başlık altında inceledik.

Hem kalıtsal hem de kombine edilmiş kalıtsal/edinilmiş trombofiller yaygın olup, beyaz popülasyonun %15'inden fazlası kalıtsal trombofilik bir mutasyon taşımaktadır (68). Bunların en yaygın olanı Faktör V Leiden mutasyonu, Protrombin geninin promotör bölgesindeki mutasyon ve Metilen Tetra Hidro Folat Redüktazı (MTHFR) kodlayan genin mutasyonlarıdır. Faktör V Leiden ve protrombin gen mutasyonları gebelik kaybı riskini artırdığı gösterilmiştir. MTHFR mutasyonlarının vasküler hastalıkla ve TKG ilgisi olup olmadığı net değildir (69,70).

Faktör V Leiden mutasyonu Avrupa popülasyonunda prevalansı yaklaşık %5'tir. Bu mutasyon Faktör V proteini üzerindeki 506. pozisyonundaki arginin yerine glutamin geçmektedir. Faktör V Leiden'in heterozigot mutasyonu gebelik

kaybı için 2-5 kat artan relatif risk ile ilişkili olduğunu göstermektedir (71,72). Genel olarak, homozigot kadınlarda bile, başarılı bir gebelik sonuç olasılığı yüksektir.

Diğer bir mutasyonda protrombin genin 3' untranslated bölgesindeki fonksiyon kazandıran G20210A mutasyonudur. Avrupa popülasyonunda prevalansı yaklaşık %3'tür (73). Bu mutasyonun heterozigotluğu gebelik kaybı için iki üç kat artan relatif risk ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (74,75). Ayrıca, antitrombin ve protein S gibi daha ciddi trombofilik bozukluklar popülasyonda çok daha az sıklıktadır.



2.4 Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)

aCGH, DNA dizisindeki kopya sayısı varyasyonlarını (CNV) tespit etmek için genom çapında bir tarama testidir (8). Array teknolojisi, moleküler karyotipleme olarak adlandırılan, konvansiyonel karyotipleme için alternatif bir yöntemdir. Daha yüksek rezolusyon ve daha hızlı raporlamadan dolayı ön plana çıkmaktadır (76).

Genom seviyesinde kromozomal dengesizliklerin saptanmasını sağlar. Hasta ve referans DNA farklı şekilde etiketlenir ve genomik fragmanları içeren dizilere hibridize edilir. Çözünürlük bu nedenle dizideki genetik fragmanların sayısına ve boyutuna bağlıdır. Şu anda bütün genomu kapsayan 1.000.000 genomik parçaya kadar rezolusyonlu olan kitler ticari olarak temin edilebilir. Bu yöntem artık iyi bilinen bir tekniktir ve açıklanamayan gelişimsel gerilik, mental retardasyon, otizm spektrum bozuklukları ve çoklu konjenital anomalileri olan hastalar için birinci kademe klinik genetik test haline gelmektedir.

aCGH yöntemi genomik anomalilerin tanımlanmasına, diğer yöntemler tarafından algılanamayacak kadar küçük değişikliklerin saptanmasını sağlar ve birçok hastada daha önce nedeni bilinmeyen anomalilerinin teşhisi açısından yardımcı olmaktadır.

FISH, kromozomal anormallikleri saptama oranını büyük ölçüde artırmıştır, ancak bazı hastalarda klinik bulgulara sahip olmasına rağmen konvansiyonel kromozom analizi ve FISH analizlerinde herhangi bir değişiklik saptanamamıştır. Birçok çalışma mikroarrayin (%15-20) geleneksel karyotiplemeye (%3, Down sendromu ve diğer tanınabilir kromozomal sendromlar hariç) kıyasla daha yüksek tanısal veriminin olduğunu açıkça göstermiştir (76). Bununla birlikte, kromozom analizi bazı dezavantajlara sahiptir; hücreleri kültürleri oluşturmak, kromozomların boyanması, taranması ve analizini yapmak 10 gün ile üç hafta arasında sürmektedir. Bir konvansiyonel kromozom analizinin çözünürlüğü sınırlıdır, 5-10 Mb boyutundan küçük kromozom anomalileri yorumlama güçlüklerine neden olabilmektedir (77). Bununla birlikte, tüm yöntemlerde olduğu gibi, aCGH’te tüm durumlar için mükemmel bir çözüm değildir. aCGH, translokasyonlar ve inversiyonlar da dahil olmak üzere dengeli kromozom yeniden düzenlemeleri tespit etmede yararlı

değildir. Bazı bulunan CNV'ler ise klinik önemi bilinmeyen polimorfik varyantlar olacaktır. Bu nedenle, bulunan anomalinin hastanın klinik problemiyle ilişkili olduğundan kesin olarak emin olunamayabilmir. Bu yüzden kopya sayısı varyasyonlarının yorumlanmasında ortaya çıkan zorluklar vardır.

Prenatal teşhiste aCGH yönteminin uygulanması, karyotipleme için cazip bir alternatiftir ve yaklaşık 400 kb'lık bir çözünürlük kullanıldığında genomik dengesizlikler bilinen tüm tekrarlayıcı mikrodelsiyon/mikroduplikasyon sendromlarının saptanmasına olanak sağlamaktadır. Bu yöntem dengesizliklerin daha kesin bir şekilde tanımlanmasına izin vererek fenotipe veya hastalığın ciddiyetine ilişkin daha iyi bir tahminde bulunmamızı sağlamaktadır. Genomik bir dengesizliğin daha kesin tanımlanmasıyla fenotipin aynı bölgede dengesizlik gösteren diğer hastalarla karşılaştırılmasına ve fenotipin bölgedeki genlerle ilişkilendirilmesine olanak verimektir (78).

Bu sınırların üstesinden gelen yeni bir teknoloji olan aCGH ya da başka bir deyişle aCGH tabanlı genomik kopya sayısı analizi, gelecek yıllarda konvensiyonel kromozom analizinin yerini alması muhtemel olarak görülmektedir.

2.4.1 Array CGH'in Avantajları ve Dezavantajları (20,79)

1) Avantajları

1. Bütün genomu taramak amacıyla kullanılır (Tek bir çipte bağımsız, multipl FISH analizine eşdeğer olan hedef dizileri kullanmak mümkün).
2. Yüksek rezolüsyon (1 Kb'a kadar)
3. Dengesiz yapısal kromozomal anomalilerin başarıyla tespiti (Delesyon, duplikasyon, sub-mikroskopik delesyon ve duplikasyonlar)
4. Bütün kromozom anöploidilerinin tespiti
5. Telomerik düzenlemeleri tespit etmede daha başarılı
6. Otomatik, objektif analiz, kalite kontrolü
7. Hızlı dönüş süresi
8. Kültür kontaminasyonunun önlenmesi
9. Bölünmeyen hücreler ile test edilebilir
10. Daha az numune kullanılabilir

2) Dezavantajları

1. DNA içeriğinde bir kaybın olmadığı durumlarda dengeli inversiyonları veya translokasyonları tespit etmekte başarısızdır.
2. Pahalı
3. Benign olan kopya sayısı varyantlarının saptanması durumunda klinik öneminin belirsizliği ve bunun sonucunda hastalara yeterli genetik danışma verilemezse kaygı oluşturabilmesi
4. Mozaikliğin % 20'nin altında ise saptama ihtimali düşük olması
5. Diagnostik olarak kullanılacak Optimum array seçimindeki belirsizlik

2.5 Kopya sayısı değişiklikleri (CNV)

İnsan polimorfizmlerinden biri de kopya sayısı değişiklikleri (CNV)'dir. Kopya sayısı değişikliklerinin çoğu herhangi bir fenotipik değişikliğe yol açmaz, ancak allelik olmayan homolog karşılıklı eşleşmeleri aracılığıyla kromozom yeniden düzenlemelerini başlattıkları için önem taşırlar ve bu submikroskopik delesyon ve duplikasyonlar yüksek çözünürlüklü aCGH ile belirlenebilmektedir.

Kopya sayısı değişikliği 10 Kb'dan 1 Mb çiftine kadar bir aralıkta olduğu belirtilir. 2 veya daha fazla alleli mevcuttur. Genellikle 2, 3, 4 veya daha fazla kopyanın tandem duplikasyonu olmasına rağmen 200 bp ile 1,5 Mb DNA bölümlerinin varlığı veya yokluğuyla da olabilmektedir. Genel popülasyonda bireylerin% 5-10'unda 500 kb'den büyük varyantlar bulunurken, 1 Mb'den büyük varyantlar %1-2'lik kısımda bulunmaktadır (13). Herhangi iki insanın genom içeriği CNV lokusundaki kopya sayısı farklılıkları nedeniyle 50-100 Mb kadar farklılık gösterebilir.

2.5.1 Kopya sayı varyasyonlarının yorumlanması

Genomik CNV'ler çok yaygın polimorfizm kaynağı olduğu bildirilmiştir (80). Bazı CNV'ler popülasyonda çok yaygın olarak saptanmaktadır ve bazıları benign varyantlar olarak kabul edilirken, bazıları ise analiz edilen hastanın fenotipinde içerip içermediği ve fenotipik sonuçların neler olabileceği bilinmeyen çok sayıda nadir CNV'ler de mevcuttur. Sonuç olarak, klinik önemi bilinmeyen nadir varyantların yorumlanması büyük bir zorluğa neden olmaktadır. Şu anda, 'sınıflandırılmamış varyantlar' olarak adlandırılan bu grubun fenotipik etkisini

tahmin etmek güçtür. Bu açıdan mümkün olduğunca çok veri toplamak ve bilgiyi uzmanlar arasında paylaşmak için uluslararası veri tabanları kurulmuştur. Bu veri tabanları, CNV'lerin daha iyi yorumlanması açısından uzmanlara yardımcı olacaktır.

Buna ek olarak, normal bireylerin çalışılmasıyla, iyi bilinen hastalık kaynaklı CNV'lerin zaman zaman tolere edilebileceği ve normal insan fenotipik spektrumunun bir parçası olduğu açıkça görülmektedir. Örneğin, bazı raporlar, daha önce gelişimsel anormalliklere neden olduğu düşünülen birkaç subtelomerik dengesizliğin her zaman fenotipik anomalilere yol açmayabileceğini göstermektedir (76).

Sadece benzer fenotipler ve genotipe sahip bazı hastaların toplanması, henüz sınıflandırılmamış varyantların benign veya patojen olarak sınıflandırılmasını sağlayacaktır. Şu anda, birden fazla konjenital anomalisi bulunan hastalar için bu verileri toplayan çeşitli veritabanları mevcuttur (DECIPHER (81), ISCA).

Bununla birlikte, saptanan CNV ne başvurunun nedeni, ne de gözlenen fenotip ile ilişkili olmayabilir, daha farklı olarak geç başlangıçlı bozukluklar, infertilite, nörolojik veya kanser yatkınlık lokusları ile ilişkili olabilirler. Günümüzde, hastanın sonucu hakkındaki tüm bilgiler verilmesi ve ya sadece medikal durumu hakkında yarar sağlayacak bilgiler verilmesi şeklinde etik açıdan iki farklı yaklaşım vardır. Yüksek çözünürlüklü genom tabanlı aCGH'teki beklenmedik bulgular hakkında bilgilendirilip bilgilendirilmemesi açısından karar vermesine yönelik test öncesi danışmanlık sağlamak da subjektif bir koruma yöntemidir. Bilgilendirmenin daha iyi olması için daha fazla sosyoetik araştırma yapılmalıdır. Ayrıca bu durum toplumlar arasında farklılık da gösterebilmektedir.

'Unwanted varyasyonlar' tespiti ile ortaya çıkan güçlükleri önlemek için, birkaç grup mental retardasyon, doğum anomalileri ile ilişkili kromozomal dengesizliklere yönelik genom bölgelerini kapsayan array platformları bildirilmiştir. Bu şekilde kaygının azaltılabileceği iddia edilmektedir. Ayrıca Postnatal tanıda mikroarray yöntemine dayanarak, nedeni bilinmeyen dengesizliklerin çoğunun nadir olduğu ve nüksetmediği, bu nedenle target array tarafından kapsanmayan bölgelere düştüğü bildirilmektedir (82).

CNV'ler raporlanırken hastaların kliniği de incelenmelidir. Patojenik, VOUS (Variants of Uncertain Significance) ya da benign CNV'leri tanımlamada kullanılabilecek değerlendirme tabloda belirtilmiştir (83).

Tablo 2.3. Bir CNV'nin Patojenitesinin Değerlendirilmesi^a (83)

Birincil Kriterler	CNV'nin muhtemel durumu	
	Patojenik	Benign
1. a. Saptanan CNV sağlıklı bir ebeveynden kalıtılmış ^b		X
b. Bir ebeveynden kalıtılmış CNV nin değişmesi veya genişlemesi	X	
c. Saptanan CNV etkilenmiş bir ebeveynden kalıtılmış	X	
2. a. Sağlıklı bir akrabada benzer bir CNV saptamak		X
b. Etkilenmiş bir akrabada benzer bir CNV saptamak	X	
3. Yüksek rezolüsyonlu teknoloji tarafından tanımlanmış sağlıklı bireylerin olduğu CNV veri tabanı hastanın genomik dengesizliğini tamamen içeren bir CNV saptanması		X
4. Saptanan CNV, yüksek çözünürlük teknolojisi ile tanımlanan bir CNV veritabanında MR / GG, OSB veya MKA'lı hastalar için tanımlanan genetik bir dengesizlik ile örtüşürse	X	
5. Saptanan CNV, bilinen bir genomik-dengesizlik sendromu için örtüşürse (yani önceden tanımlanmış delesyon veya duplikasyon sendromu)	X	
6. Saptanan CNV morbid OMİM genlerini içerirse ^c	X	
7. a.Saptanan CNV genden zengin bir bölgedeyse	X	
b.Saptanan CNV genden fakir bir bölgedeyse		X
Genel Bulgular^d		
1. a. Saptanan CNV bir delesyonsa	X	
b. Saptanan CNV bir homozigot bir delesyonsa	X	
2. a. Saptanan CNV bir duplikasyonsa (bilinen dozaj-duyarlı genler yok)		X
b.CNV bir amplifikasyonsa (1 kopyadan daha fazla artış)	X	
3. Saptanan CNV, bilinen düzenleyici elementleri içermiyorsa		X

^aTekli kopya sayı değişikliği

^bEtkilenmemiş bir ebeveynden kalıtılan resesif bir morbid OMİM genindeki delesyon, diğer ebeveynden kalıtılan trans alel üzerinde bir nokta mutasyonuyla birlikte patojenik olabilir.

^cCNV, OMİM hastalığına neden olduğu bilinen mutasyon tipinin aynısını üretmelidir (örneğin bir heterozigot delesyon, genellikle bir heterozigot inaktive edici mutasyonun neden olduğu bir OMİM hastalığına neden olabilir) ve üretilen bu fenotip bu OMİM hastalığı için beklenmelidir.

^dGörülen her durumun istisnaları

Mental Retardasyon (MR) ; Gelişme geriliği (GG) ; Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) ; Multipl konjenital anomali (MKA)

KULLANILAN VERİTABANLARI

- **DGV:** Bu veri tabanının amacı, insan genomunda yapısal değişikliklerin kapsamlı bir özetini sunmaktır. Fenotipik verilerle genomik değişiklikleri ilişkilendirmeyi amaçlayan bir proje olup uzmanlara çalışmalarında kontrol verisi sağlamaktadır. Veri tabanının içeriği sağlıklı kontrol örneklerinde tanımlanan yapısal varyasyonlarından oluşmaktadır. Bu veri tabanı, incelenen çalışmalardan elde edilen yeni verilerle sürekli olarak güncellenmektedir.
- **ClinVar:** Genotipik değişikliklerin fenotipler arasındaki ilişkileri sunan bir arşivdir. Böylece ClinVar, bu değişikliklerin ve gözlemlenen sağlık durumu arasındaki ilişkilere erişimi ve ulaşılmasını kolaylaştırır. ClinVar, hasta örneklerinde bulunan değişiklik raporlarının, klinik önemleri ile ilgili bilgileri, gönderen hakkında bilgi ve diğer destekleyici verileri sunmaktadır. Amacı hem genotiplerin hem de verilerin yeniden değerlendirmesini sağlamak, varyasyonlar ve ilişkili fenotiplerle ilgili bilginin devam eden değişimini ve gelişimini sağlamaktır.
- **DECIPHER:** Genomik varyantların yorumlanmasına yardımcı olmak için tasarlanmış bir takım araçları içeren etkileşimli bir veritabanıdır. Olgularda bulunan varyantla ilgili çeşitli biyoinformatik kaynaklardan bilgi alınarak klinik tanıyı geliştirir ve hem normal varyasyon hem de o lokusta rapor edilen patojenik varyasyon bağlamında görüntülemeyi sağlayarak yorumlamayı kolaylaştırır. Ayrıca, genomik varyantın sonuçlarının analizi (örneğin fonksiyon kaybı veya fonksiyon kazanımı), hastalığın mekanizması ve potansiyel terapötik hedefler hakkında bilgi sağlar.
- **OMIM:** Genlerin ve genetik fenotiplerin kapsamlı bir özetidir. OMIM'deki tam metin referanslı bilgiler, bilinen tüm mendelian bozukluklar ve 15.000'in üzerinde gen hakkında bilgi içerir. OMIM, fenotip ve genotip arasındaki ilişkiye odaklanır. Günlük olarak güncellenir ve girişler diğer genetik kaynaklara çok sayıda referans içerir.
- **GENE:** Çok çeşitli türlerden bilgileri birleştirir ve kayıt, terminoloji, Referans Dizileri (RefSeqs), haritalar, yollar, varyasyonlar, fenotipler ve dünya çapında genom, fenotip ve lokus spesifik kaynaklara bağlantılar içermektedir.

2.6 Tekrarlayan Gebelik kaybı ile ilişkili Genler ve Çalışmalar

TGK'nın genetik ve genomik çalışmalarının üç ana amacı vardır.

1. Bir çiftin TGK riskini direkt olarak önceden tahmin edebilecek DNA/RNA tabanlı markırlar tanımlamak
2. Başarılı veya başarısız gebeliğin oluşmasını içeren gen ve protein ekspresyon profilleri, pathwayleri ve ağları saptamak.
3. Erken gebelik komplikasyonları için uygulanabilen yeni invaziv olmayan biyolojik belirteçleri belirlemektir.

TGK bağlamında en sık incelenen genler, gelişen immüntolerans ve inflamasyon ile ayrıca maternal metabolizma ve kan pıhtılaşma değişiklikleri ile ilişkilidir. Neredeyse 90 farklı genin polimorfizmleri araştırılmıştır. Klinik olarak en popüler incelenen polimorfizmler FVL mutasyonu, faktör II (protrombin), G20210A mutasyonu ve MTHFR C677T mutasyonlarıdır (84,85). TGK da incelenen genleri sınıflayacak olursak:

Tromboz ile ilişkili olarak incelenen genler ACE, ACHE, AGT, ANXA5, APOB, APOE, AT1R, EPCR, F2,F5, FGB, F12, F13A, GPIa, GPIIIa, HMOX1, JAK2, MTHFD1, MTHFR, PAI-1, PZ, SELP, TAFI, TGFB1, TM, TSER, VEGF, ZPI'dir (38,86).

İnflamasyon ile ilişkili olarak incelenen genler IFNG, IL1B, IL1RN, IL1R1, IL4, IL6, IL10, IL12B, IL18, IL21, TNFa, TNFb, TNFR1'dir (86).

Detoksifikasyon sistemi ile ilişkili olarak incelenen genler AHR, ARNT, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2D6, GSTM1, GSTP1, GSTT1, NAT2'dir (87).

Kromozomal segregasyon ile ilişkili olarak incelenen gen SYCP3'dir (88).

İmmün Cevap ile ilişkili olarak incelenen genler CCR5, CTLA4, CXCR1, HLA-A,B, HLA-C, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DR, HLA-E, HLA-G, INDO, KIR, MBL'dir (89).

Plasental fonksiyon ile ilişkili olarak incelenen genler ACP1, ADA, ADRA2B, ANGPT2, CD14, EG-VEGF, PKR1, PKR2, H19, IGF-2, KDR, MCP, MMP9, NOS3, P53, PAPPA, PGM1, STAT3, TPH1'dir (90). Genel olarak TGK olan olguları aydınlatmak için maternal, paternal, plasenta ve/ve ya fetüs değerlendirilmiştir (86).

Şimdiye kadar, TKG'ya yönelik ortak risk varyantlarının tanımlanması için hipotez içermeyen genom wide association çalışmaları (GWAS) yapılmamıştır. Bir veya birkaç lokusu içeren kopya sayısı varyasyonlarının (CNV) SNP'lere kıyasla fenotip üzerinde daha güçlü bir etki göstermesi beklenir. CNV'ler gebelik erken döneminde kritik olan genlerin dozajını etkileyebilir veya kromozomların segregasyonunu bozabilir, bunun sonucunda muhtemelen anöploidi oluşturabilir. Halen, TKG ile ilişkili potansiyel risk taşıyan CNV'ler hakkındaki literatür bilgileri yeterli değildir.

aCGH tabanlı bir çalışmada maternal kan ve plasenta çalışılmış olup TIMP2 (86 kb duplikasyon) ve CTNNA3 (72 kb delesyon) genlerinin maternal imprinting olduğu gösterilmiş olup bu genler trofoblast invazyonunu düzenlemektedir ve plasentada yalnızca maternal allelden eksprese edilmektedir (4). Çiftlerin büyük perisentromerik ve subtelomerik CNV'leri TKG'ya yatkınlık gösterebilir. TKG olgularının genomlarında, kontrollere kıyasla neredeyse iki kat fazla CNV'ler (> 300 kb) saptanmıştır. Özellikle, TKG'lı olgularda bulunan bu büyük CNV'lerin (> 300 kb) %63'ü perisentromerik ve subtelomerik bölgelerdedir, buna karşın kontrol ebeveyn genomlarındaki saptanan büyük CNV'lerin sadece %33'ü perisentromerik ve subtelomerik bölgelerdedir (7). Bu pilot çalışmalar, nadir ve yaygın CNV'lerin, TKG için risk faktörleri olarak ileri tetkiklerinde yardımcı olacaktır.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1 Hasta Grubu

Bu çalışmamızda tekrarlayan gebelik kaybı olan ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran olgulara ait aCGH yöntemiyle elde edilen verilerin olan CNV'ler açısından retrospektif olarak değerlendirildi. CNV içeren gen bölgeleri ile TKG arasındaki ilişkiyi belirlemeye dayalı bir çalışma planlandı. Bu amaçla 2016-2017 yıllarında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik polikliniğine 2 veya daha fazla TKG nedeniyle başvuran 64 olgunun elde edilen verileri değerlendirildi.

Hastaların yaşı, gebelik kaybı sayıları, gebelik kayıplarının haftası, sistemik hastalık varlığı (diabetes mellitus, hipertansiyon, otoimmün hastalıklar gibi), eşi ile akraba evliliği olup olmadığı hasta dosyalarından not edildi. Bu olguların tümüne önceden yapılmış olan kromozom analizi sonuçları not edildi. Kadın olguların retrospektif olarak trombofili sonuçları değerlendirildi. Aynı zamanda retrospektif olarak diğer moleküler sonuçlarının verileri ve hastalara ait anamnezleri, aile ağaçları değerlendirildi.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 13.12.2017 tarihinde 20-06 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır (Ek 1).

3.2 Gereçler

3.2.1 Kullanılan Aletler

- AGT-G4900DA SureScan Microarray Scanner
- Vakum konsantrator cihazı (Christ RVC 2-18 CD Plus Vacuum Concentrator)
- Nanofotometre (implen P330)
- Slide Holder
- Kapak ısıtmalı termal cycler
- Hibridizasyon Chamber
- Agilent hibridizasyon fırını
- 2 adet Manyetik Karıştırıcı

3.2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- AgilentCGH Wash Buffer 1
- AgilentCGH Wash Buffer 2
- 1.5 mL'lik Eppendorf tüpleri
- 0.2 mL'lik PCR tüpleri
- Oligo aCGH Hybridization Kit
- Hybridization gasket slides
- Referans DNA-Male ve Female (250 ng/uL)
- Asetonitril CAS 75-05-8 (LiChrosolv®)
- SurePrint G3 Human CGH Bundle, 8×60K
- Oligo aCGH Wash Buffer 1 and Oligo aCGH Wash Buffer 2
- TBE Buffer
- SureTag DNA Labeling Kit Purification Columns
- Agilent 8×60K Gasget Slide
- Human Cot-1 DNA
- SureTag Complete DNA Labeling Kit

3.3Yöntem

3.3.1 DNA İzolasyonu

Her hastanın kanı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda DNA izolasyon kiti ile izole edildikten sonra kayıt altına alınmıştır. Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde QIAamp® DNA Mini Kit kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır.

İzolasyon protokolü

- 1,5 mL'lik eppendorf tüplere 200 µl kan, 200 µl Buffer AL 20 µl Proteinaz K, eklendi ve 15 saniye vortekslenerek karışması sağlandı.
- Karışım, 10 dakika 56°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyondan sonra tüpe 200 µl %96–100 etanol eklendi ve 15 saniye vorteks yapıldı. (70°C ısıtıcıya elution buffer konuldu.)

- Tüpün içindeki karışım dikkatlice filtrelili kolana aktarıldı ve sonra 8000 devir/dakika'da 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Kolonun dibindeki filtratlı tüp atıldıktan sonra filtre yeni bir tüpe aktarıldı.
- Filtreye Buffer AW1'den 500 µl miktarında eklendi ve ardından 1 dakika 8000 rpm'de santrifüjlendi.
- Kolonun dibindeki filtrat atıldı. Filtre yeni bir 2 mL'lik tüpe alındı.
- Bu filtreye Buffer AW2'den 500 µl eklendi ve 14000 devir/dk'da 3 dakika santrifüj edildi.
- Kolonun dibinde toplanan sıvı atıldı ve boş olarak 14000 devir/dk'da 1 dakika santrifüj edildi
- Kolon 1,5 mL'lik eppendorfun içine yerleştirildi.
- Buffer AE 30 µl miktarında eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi
- 1 dakika 8000 rpm santrifüj edildi.
- Kolon atıldı ve eppendorfun içindeki DNA -20°C'de saklandı.

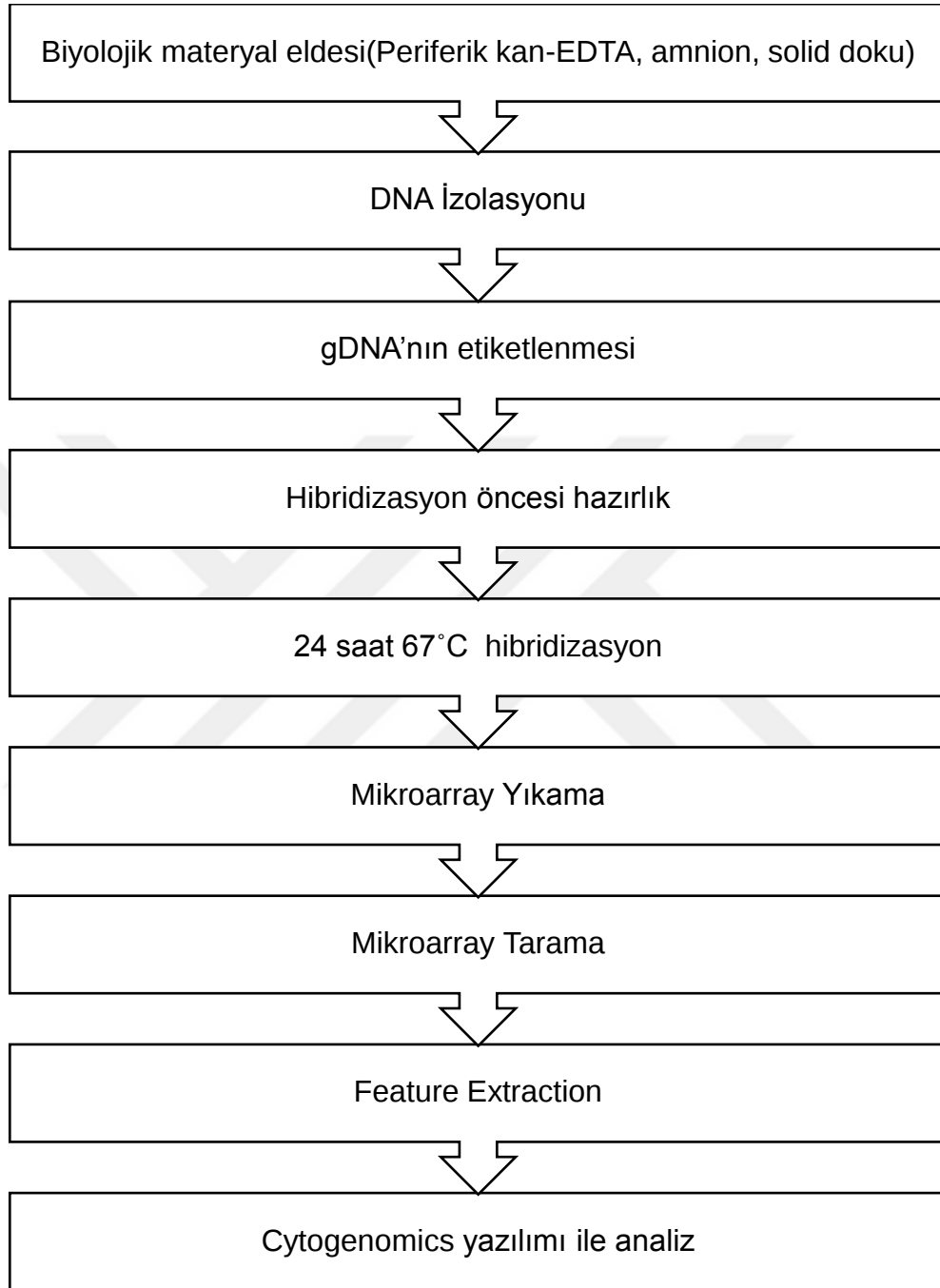
3.3.2 Etiketleme öncesi gDNA hazırlığı

Tablo 3.1. Her örnek için gerekli gDNA hacmi ve miktarı

Mikroarray formatı	Gerekli gDNA miktarı(µg)	Kesimli gDNA hacmi (µL)
8x mikroarray	0.2 – 0.5	10.1

Genomik DNA'nın izolasyonundan sonra hasta DNA'ları ve referans DNA örnekleri (Agilent) ve Nanofotometre (Nanodrop implem P330) cihazında ölçümler yapılarak 50 ng olacak şekilde ayarlanmıştır. Eğer gDNA konsantrasyonu > 350 ng / µL ise, suda veya önerilen tamponlardan birinde 1: 2 oranında seyreltilmiştir. Daha sonra miktarın doğru olduğundan emin olmak için yeniden ölçüm yapılmıştır. aCGH lamı 8 örneklik olduğu için, 8 hasta gDNA'sı ve 8 referans gDNA'sı toplam 16 tüpte hazırlanarak işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.3.3 Array CGH Metodu ve Uygulanması



Şekil 3.1. aCGH yöntemi basamakları

1) Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi

Reaksiyon tüpüne her bir örnek için 2,9 µl master mix eklenmiştir. Her bir örnek DNA'sı, master mix ile birlikte toplam 13 µl olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 3.2. Kesim karışımının hazırlanışı (8x mikroarray için)

Komponentler	1 Reaksiyon için (µL)	16 Reaksiyon için (µL)
Distile Su	1	17
10x Enzim kesim buffer	1.3	22.1
BSA	0.1	1.7
Alu I	0.25	4.25
Rsa I	0.25	4.25
Toplam Son Hacim	2.9	49.3

Tablo 3.3. Kesim için kullanılan ısı döngüsü programı

Kademe	Sıcaklık	Süre
1.Kademe	37°C	2 saat
2.Kademe	65°C	20 dakika
3.Kademe	4°C	∞

İlk olarak 2 saat 37°C'de ve ardından 20 dakika 65°C'de olacak şekilde PCR programı uygulanmıştır.

DNA denatürasyon ve fragmentasyonu için toplam hacmi 13 µL olan her bir PCR tüpüne 2.5 µL rastgele primer (random primer) eklenerek toplam hacim 15.5 µL'ye ulaşmıştır. 98°C'de 3 dakikalık bir PCR yapılmıştır. Süre sonunda tüpler buz içerisinde bekletilmiştir.

PCR işlemlerinde istenilen bölge çoğaltılması için primerler kullanılmaktadır ancak bu çalışmada spesifik bölge çoğaltması yapılmadığı için random primerler kullanır. Random primerler her yere bağlanabilir özelliğe sahiptir.

2) Genomik DNA'nın Floresan İşaretlemesi

Siyanin-3 (Mavi/Referans) ve Siyanin-5 (Pembe/Hasta) için iki ayrı reaksiyon mixi hazırlandı. Her bir olgunun PCR ürününe 9.5 µl Siyanin-5 (Cy5) ile hazırlanan master mix dağıtıldı. Ayrı ayrı hazırlanmış olan referans PCR örneklerine Siyanin-3 (Cy3) ile hazırlanan karışım her birine 9.5 µl olacak şekilde dağıtıldı. 2 saat 37°C'de ve ardından 10 dakika 65°C'de olmak üzere PCR işlemi yapıldı. PCR işleminden sonra elde edilen ürün -20 °C'de saklanabilir.

Tablo 3.4. Etiketleme karışımının hazırlanışı (8x mikroarray için)

Komponentler	1 Reaksiyon için (µL)	8 Reaksiyon için (µL)
5x Reaksiyon Buffer	5.0	42.5
10x dNTP	2.5	21.25
Siyanin-3 dUTP veya Siyanin-5 dUTP	1.5	12.75
Exo (-) Klenow	0.5	4.25
Toplam Son Hacim	9.5	80.75

Tablo 3.5. DNA etiketlemesinin ısı döngü programı

Kademe	Sıcaklık	Süre
1.Kademe	37°C	2 saat
2.Kademe	65°C	10 dakika
3.Kademe	4°C	∞

3) Etiketlenmiş gDNA'nın Pürifikasyonu

Her bir reaksiyon tüpüne 1x TE Buffer 430 µl eklendi (pH 8.0). Tüplerin içerisine kolonlar yerleştirildi ve sonrasında kolonların içerisine örnekler yüklendi.

On dakika 12000 rpm santrifüj basamağından sonrasında alttaki sıvı atıldı ve sonrasında aynı işlemler tekrar uygulandı ve sonrasında kolonlar yeni 2 mL'lik tüpler ters çevirilip konulduktan sonra 1 dakika 3200 rpm santrifüj yapıldı.

4) Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması

Bu adımdan sonra elde ettiğimiz örneklerin işaretlenmesi yapıldı ve ardından spesifik aktivitelerinin ölçülmesi yapıldı. “DNA Konsantrasyonu (ng/μL) x Örnek hacmi (μL) /1000 ng/μg=Ürün (μg)” formülü kullanıldı.

$$\text{Spesifik Aktivite} = (\mu\text{L boya başına pmol}) / (\mu\text{L gDNA başına } \mu\text{g})$$

Tablo 3.6. Gerekli spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri

Başlangıç gDNA	Ürün Miktarı	Cyanin-3 işaretlilerin spesfiki	Cyanin-5 işaretlilerin spesfiki
		aktivite değeri (pmol/μg)	aktivite değeri (pmol/μg)
0.2 - 0.5	2.5 - 3	15 – 25	15 - 20

5) Örneklerin Kurutulması

Her bir işaretlenmiş hasta ve referans DNA'ları birleştirilerek 1,5 mL RNAase free tüplere yüklendi. Tüpler toplam hacim 16 μL olacak şekilde vakum konsantratör cihazında 1 saat boyunca 55°C'de buharlaştırıldı.

6) gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması

İlk olarak 10x Blocking Agent 1.350 μl saf su ve liyofilize halde olan 10x aCGH Blocking Agent'a eklenerek hazırlandı. Sonrasında 60 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Vorteks karıştırıcıda döndürüldükten sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanabilir.

7) Mikroarray Hibridizasyonu

Tablo 3.7. Hibridizasyon Karışımı (8x mikroarray için)

Komponentler	1 Reaksiyon için (μL)	8 Reaksiyon için (μL)
Cot-1 DNA (1mg/mL)	2	17
10x aCGH bloklama ajanı	4.5	38.25
2HI-RPM Hibridizasyon buffer	22.5	191.25
Toplam Son Hacim	29	246.5

Oluşan her örnek için üzerine hibridizasyon mixinden 29 µL eklenerek toplam hacmi 45 µL olan yeni 8 tüpe aşağıdaki PCR programına konulmuştur. 2x HI-RPM Hibridizasyon Buffer'ın vizkozitesi yüksek olması nedeniyle en son olarak pipetaj yaparak paylaştırıldı.

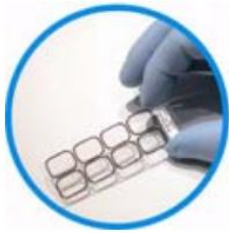
Tablo 3.8. Hibridizasyon öncesi ısı döngü protokolü

Kademe	Sıcaklık	Süre
1.Kademe	95°C	3 dakika
2.Kademe	37°C	30 dakika

3 dakika 98 °C'de, ardından 30 dakika 37 °C'de denatürasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra 1 dakika santrifüj edildi.

8) Hibridizasyon Örneklerinin Array Slaytlarına Yüklenmesi

8x60K mikrodizini, cam lam üzerine yazılmıştır. Lamın örneklerin yüklenecek tarafı doğru bir şekilde seçilmelidir. Kullanılacak olan array platformu SurePrintG3 ISCA V2 CGH 8×60K olduğu için örnekler 40 µl hacimde gasket slide üzerindeki 8 bölgeye yüklendi sonrasında problemlerin olduğu lamın "Agilent" etiketli yüzüne basılı olduğu için bu yüz aşağıda olacak şekilde gasket slide üzerine yerleştirilmiştir. Hibridizasyon Chamber'ı kapatılıp mandal döndürülerek sıkılmıştır.



Şekil 3.2. Projede kullanılan SurePrint G3 ISCA V2 CGH 8×60K için Gasket slide.



Şekil 3.3. Hibridizasyon Chamber

Chamber döndürülerek lamalar tamamen karışım ile temas ettirilerek baloncukların hareketi kontrol edilmiştir. Aksi durumda baloncuklar hareket etmemesi durumunda problemlerin hibridizasyonu gerçekleşmemektedir. Kapatılmış hibridizasyon chamber'ı Agilent hibridizasyon fırınına yerleştirildi ve 67°C'de 24 saat süreyle dakikada 20 devir dönecek şekilde bırakıldı.

9) Yıkama

Hibridizasyon sonrası yıkama işlemlerinin gerçekleştirileceği malzemeler asetonitril solüsyonu ile yıkanmıştır. Asetonitril ile yıkanmış olan malzemeler distile sudan geçirilerek malzemelerden asetonitril uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.9. Yıkama Aşamasında gerekli olan bufferlar ve koşulları

Kap Numarası	Wash Buffer Numarası	Koşul	Süre	Sıcaklık
1.	1			Oda sıcaklığı
2.	1	Manyetik karıştırıcı üzerinde	5 dakika	Oda sıcaklığı
3.	2	Manyetik karıştırıcı üzerinde	1 dakika	37°C

Yıkama aşamasına yönelik olarak AgilentOligo aCGH/ChIP on Chip Wash Buffer 1 ve 2 kullanıldı. 37 °C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı üzerine ısı kaybını engellemek amacıyla bir cam kap içerisine sıcak su dolduruldu ve içinde Wash Buffer 2 olan kap bu kabın içine yerleştirildi. Bir gece öncesinde 37 °C'ye ayarlanmış etüve cam kap içinde Wash Buffer 2 bırakılmıştır.

Hibridizasyon fırınından çıkarılan kapatılmış lam haznesi içindeki array slaytı ve gasket slide 1. kap içerisindeki sıvıya yerleştirildi. Bu sıvı içerisinde gasket slaytla array slaytı pens yardımı ile birbirinden ayrıldı. Gasket slayt 1. kabın içinde bırakılarak ve SurePrint G3 ISCA V2 CGH 8×60K slayt oda sıcaklığındaki Wash Buffer 1 bulunduğu 2. kap içerisine yerleştirildi ve 5 dk bu sıvı içerisinde bekletildi

Sonrasında array slaytının olduğu şale Wash Buffer 1 içinden çıkarıldıktan sonra, Wash Buffer 2 içine konuldu ve 1 dk bekledikten sonra Wash Buffer 2'dan da çıkarıldı.

Yıkama safhasındaki birinci yıkama işlemi yüzeysel bir yıkama sağlar fakat 2. ve 3. yıkama işlemleri uygun sıcaklık ve dalгада olmasına dikkat edildi

ve hızlı davranılarak ozondan mümkün olduğunca daha az etkilenmesi sağlandı.

Array slaytı, lam tutucusuna "Agilent" yazısı üst tarafa bakacak şekilde yerleştirildi, ozon bariyer lam kapağı slaytın üzerine uygun şekilde yerleştirilerek slayt tutucusu kapatılmıştır.

Tarama aşamasından önce slayt tutucu içerisine yerleştirilen slayt bilgisayardan komut verilerek açılan tarayıcı kasetleri içerisine yerleştirildi.

10) Mikroarray Taraması

Bilgisayar üzerinden "Agilent Microarray Scan Control" yazılımıyla tarama yapılması sağlandı.

11) TIFF Dosyalarının Analizi

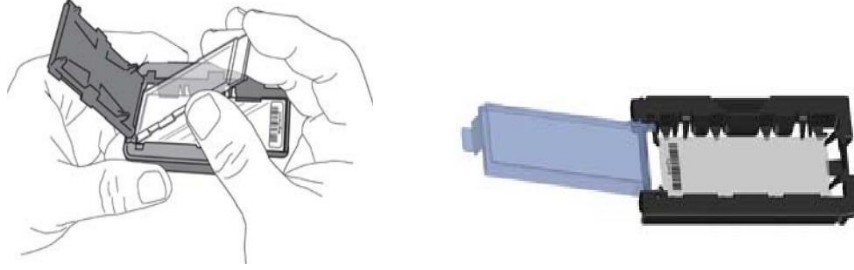
Tarama işlemi bittikten sonra tiff dosyasından ve log oranlarına dönüştürme işlemi yapmak amacıyla Feature Extraction 12.0.1.1 yazılımı kullanılmıştır. Feature Extraction 12.0.1.1 yazılımı deneyin kalitesi ile ilgili kalite kontrol raporu vermektedir.

Tablo 3.10. Enzimatik etiketlemenin kalite kontrol eşik değerleri

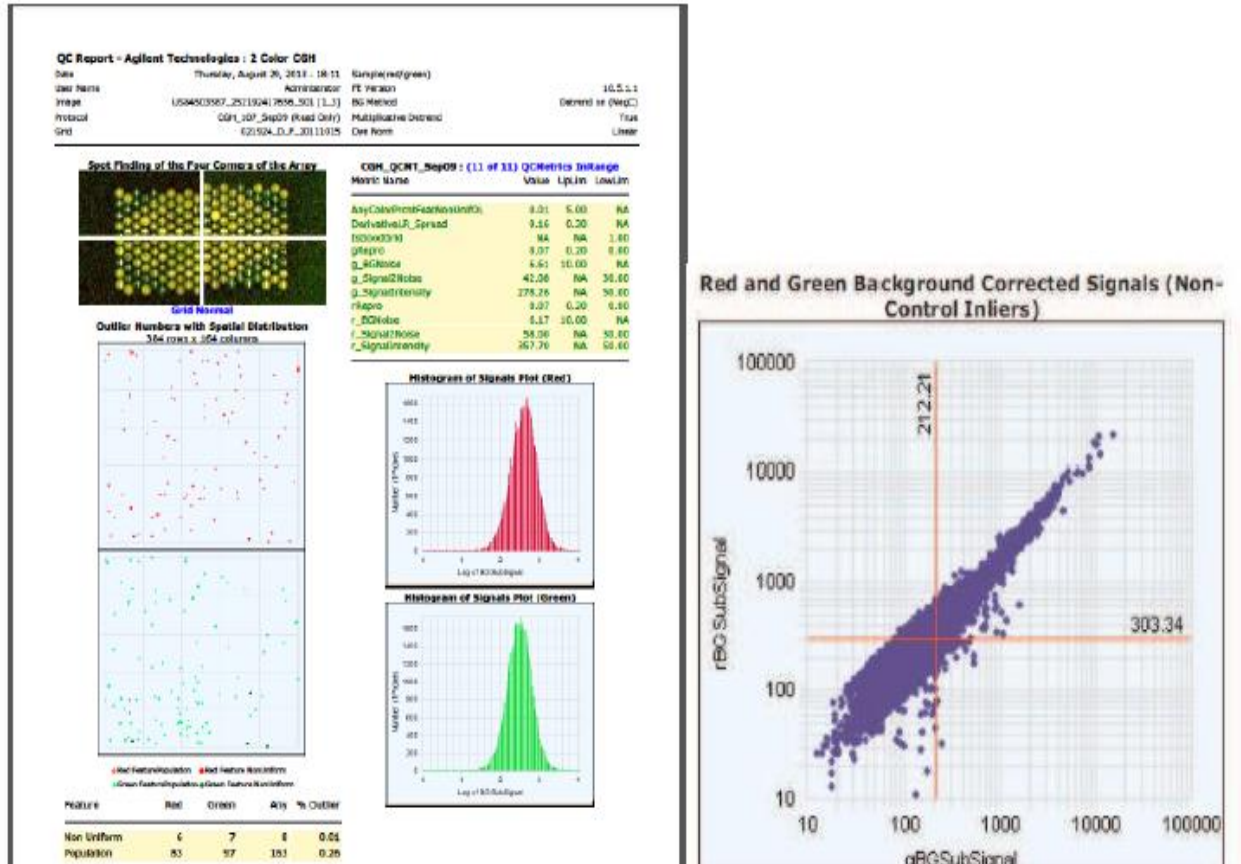
	Mükemmel	İyi	Şüpheli
Arka Plan Gürültüsü	<10	10 - 20	>20
Sinyal yoğunluğu	>150	50 - 150	<50
Sinyal/Gürültü	>100	30 - 100	<30
Tekrarlanabilirlik	<0.05	0.05-0.2	>0.2
DerivativeLRSpread	<0.2	0.2 - 0.3	>0.3

12) Analizde kullanılan Yazılım

Analizde kullanılan Yazılım Agilent CytoGenomics 4.0'dır



Şekil 3.4. Lam Tutucusu (Slide Holder)



Şekil 3.5. aCGH Kalite Kontrol Raporu Örneği

13) Yazılımda saptanan CNV ı Anlamlı kabul etme kriterlerimiz:

Ardışık olarak en az 3 probun ortalama log ratiosu duplikasyon açısından $>0,5$ ve delesyon açısından $<-0,5$ olmalıdır. Her hastada saptanan değişiklikler

o çalışma içinde bizim grubumuzda olmayan 2 örnek ile değerlendirilerek bu bölgeler açısından probdan kaynaklı hatalar önlenmeye çalışılmıştır.

14) Raw datalardan genler açısından tarama

Önceden OMİM'de gebelik kaybı ile ilişkisi olduğu bildirilen ve yayınlarda önceden gebelik ile ilişkisi olduğu bildirilen toplam 39 gen açısından öncelikli olarak array platformu açısından olduğu bölgeler prob sıklığı açısından değerlendirildi.

Analiz Kriterlerimizden biri olan en az 3 prob içermesi yönünden ilk olarak CORIN, CTNNA3, JAK2, PROS1, F9, FMN2 genleri içerisindeki en az 3 probun sonrasında tek prob içeren F5, MTHFR, POM121, STOX1, TIMP2, F13A1, CBS genlerindeki prob ile öncesi ve sonrasındaki problemler göz önüne alınarak değerlendirildi. ANXA5, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-G, KHDC3L, NLRP7, NOS3, POMZP3, SYCP3, UPK3B, SERPINC1, PROC, HRG, PLAT, HABP2, F2, THBD, TDO2, SPHK1, SPHK2, FGF20, FOXP3, TAC3, TDO2 ve GNRHR genlerinin sınırları içerisinde prob bulunmamasından dolayı bu genler açısından değerlendirme yapılamadı.

3.3.4 İstatiksel Analiz

Veriler SPSS Paket Program 20.0 sürümü ile analiz edildi. Tanımlayıcı verilerin sunumunda sayı, yüzde, ortanca, ortalama, standart sapma, minimum, maksimum kullanıldı. Analiz sonucu elde ettiğimiz CNV bölgelerinin kontrol popülasyonu ile karşılaştırılmasında Binomial Test kullanıldı. Saptanan CNV'ler, DGV veritabanında fenotip olarak normal bireylerden oluşan kontrol popülasyonlarında saptanan CNV'ler ile karşılaştırıldı. TGK olan olgulara ait CNV'lerin kontrol popülasyonları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda $p < 0,05$ olan bölgeler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Yapılan bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde değerlendirilen ve 64 tane TKG olan olguda aCGH'in tanısal yeri ve önemi açısından değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu açıdan öncelikli olarak TKG olan ve aCGH yöntemi ile analiz edilen hastalar taranarak hastaların ham verilerinin tekrar analizi yapılmıştır. Hedef doğrultusunda etiyolojide rol oynayan diğer durumlar da hastaların poliklinik dosyalarından taranmıştır. Diğer etiyolojik faktörlerinde farklılık saptansa dahi (Örn. FVL mutasyonu gibi) TKG multifaktoriyal olması açısından hasta grubuna alınmıştır.

4.1 Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya dâhil edilen 64 TKG olan olgunun tamamı TKG öyküsüne sahip bireyler olup, çalışma grubunun yaş ortalaması $33,9 \pm 6,6$, ortancası 33,5 (min: 22,0; maks: 55,0)'dır. TKG olan kadın olgu sayısı 32, yaş ortalaması 32, erkek olgu sayısı 32 ve yaş ortalaması 36'dır (Tablo 4.1). Bu olgulardan ilk 42 tanesi çift olarak (karı-koca) değerlendirilmiştir. Diğer 22 tanesi tek olarak değerlendirilmiştir.

Hastaların kaç yıllık evli olduğu, kaç tane gebelik kaybı öyküsü olduğu, sağlıklı çocuk sahibi olup olmadığı, ailesinde başka TKG olan olgunun olup olmadığı, ailesinde konjenital anomali, mental retardasyon olan birey olup olmadığı, hasta grubumuzun eşiyle akrabalık öyküsünün olup olmadığı, TKG olan kadın olguların otoimmün hastalık, uterin anomali ve PCOS öyküsünün olup olmadığı hakkındaki veriler hasta dosyasından taranmıştır.

Yaşayan çocuğu olan olgu sayısı 27'dir. Çocuğu olan fakat çocuğunda otizm ve sağırılık olan 1 çift (2 olgu) ve çocuğunda multikistik displastik böbrek öyküsü olan 1 çift (2 olgu) mevcuttur. Ailesinde TKG öyküsü olan 8 olgu, ailesinde konjenital anomalisi olan 12 olgu, ailesinde mental retardasyonu olan 6 olgu mevcuttur. Tüm olguların 12 tanesinde akraba evliliği mevcuttur (Tablo 4.1). Kadın olgulardan 3 tanesinde PKOS öyküsü ve 6 tanesinde adet düzensizliği öyküsü vardır.

Tablo 4.1. TKG olgularının demografik ve ailesel verileri

Değişkenler	n (%)
Cinsiyet	
Kadın	32 (50,0)
Erkek	32 (50,0)
Eğitim Durumu	
Okuryazar değil	1 (1,7)
İlkokul	10 (16,9)
Ortaokul	8 (13,6)
Lise	19 (32,2)
Üniversite	21 (35,6)
Yaşayan çocuk	
Var	27 (42,9)
Yok	36 (57,1)
Ailede TKG öyküsü	
Var	8 (12,5)
Yok	56 (87,5)
Ailede konjenital anomali	
Var	12 (18,8)
Yok	52 (81,3)
Ailede MR öyküsü	
Var	6 (9,4)
Yok	58 (90,6)
Akrabalık	
Var	12 (18,8)
Yok	52 (81,3)

?: Sütun yüzdesi

4.2 Olguların Kromozom Analizleri

Çalışmamızdaki olguların hepsinin GTG bantlama sonrası metafazdan kromozom analizi yapılmıştır. Olgulardan 25 tane kadının ve 28 tane erkeğin toplam 53 tane olgunun kromozom analizi normal olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2’de görüldüğü üzere 11 olgunun kromozom analizleri 7 kadın olgunun 5 tanesi 46,XX,9qh+, 2 tanesi 46,XX,21ps+, 4 erkek olgunun 3 tanesi 46,XY,9qh+ ve 1 tanesi 46,XX,21ps+ olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2. Araştırmada analiz edilen TKG olgularına ait bazı demografik bulgular

Olgu no	Cinsiyet	Yaş	Kromozom Analizi Sonucu	Gebelik Kaybı Haftası	Gebelik Kaybı Sayısı	Yaşayan Canlı Çocuk
1	Kadın	27	46,XX	12-12-12-19	4	+
2	Erkek	32	46,XY	12-12-12-19	4	+
3	Erkek	46	46,XY	4-5-6-6	4	-
4	Kadın	34	46,XX,9qh+	4-5-6-6	4	-
5	Erkek	34	46,XY	6-6-18-6-16	5	-
6	Kadın	33	46,XX	6-6-18-6-16	5	-
7	Kadın	27	46,XX,21ps+	6-8	2	+
8	Erkek	27	46,XY	6-8	2	+
9	Kadın	26	46,XX,9qh+	11-20	2	-
10	Erkek	27	46,XY	11-20	2	-
11	Erkek	42	46,XY	7-16-28	3	-
12	Kadın	36	46,XX	7-16-28	3	-
13	Erkek	33	46,XY	6-7	2	+
14	Kadın	25	46,XX	6-7	2	+
15	Erkek	55	46,XY	7-9	2	+
16	Kadın	36	46,XX	7-9	2	-
17	Kadın	31	46,XX	17-20-17	3	-
18	Erkek	33	46,XY	17-20-17	3	-
19	Erkek	38	46,XY	5-8	2	+
20	Kadın	38	46,XX	5-8	2	+
21	Kadın	22	46,XX	16-12	2	+
22	Erkek	29	46,XY	16-12	2	+
23	Kadın	33	46,XX,9qh+	8-6-6	3	+
24	Erkek	35	46,XY	8-6-6	3	+
25	Kadın	38	46,XX	7-7-7-7-10	5	+
26	Erkek	39	46,XY	7-7-7-7-10	5	+
27	Kadın	36	46,XX,9qh+	4-6	2	-
28	Erkek	40	46,XY	4-6	2	-
29	Kadın	37	46,XX	6-12-13-32	4	-
30	Erkek	32	46,XY	6-12-13-32	4	-
31	Kadın	36	46,XX	7-16-12*-4	4	+
32	Erkek	47	46,XY	7-16-12*-4	4	+
33	Kadın	33	46,XX	7-8	2	-
34	Erkek	39	46,XY	7-8	2	-
35	Kadın	39	46, XX	18-20-28-32	4	-
36	Erkek	35	46,XY,9qh+	18-20-28-32	4	+
37	Erkek	43	46,XY	19-19-8-8	4	-
38	Kadın	33	46,XX	19-19-8-8	4	-
39	Erkek	27	46,XY	5-5-7	3	-

40	Kadın	26	46,XX	5-5-7	3	-
41	Erkek	39	46,XY	8-10-25	3	+
42	Kadın	35	46,XX	8-10-25	3	+
43	Erkek	27	46,XY	6-6-6	3	-
44	Kadın	35	46,XX,9qh+	6-6	2	+
45	Erkek	33	46,XY	8-8-8-14	4	-
46	Erkek	40	46,XY	8-6	2	-
47	Kadın	38	46,XX	9-10-18	3	+
48	Kadın	23	46,XX	4-6-9	3	-
49	Kadın	29	46,XX	8-14	2	-
50	Kadın	25	46,XX	5-7	2	-
51	Kadın	40	46,XX	6-6	2	-
52	Kadın	27	46,XX	5-6	2	+
53	Kadın	33	46,XX	6-12	2	+
54	Erkek	48	46,XY,9qh+	7-7	2	+
55	Erkek	32	46,XY	5-6	2	-
56	Erkek	28	46,XY,9qh+	7-7	2	-
57	Kadın	31	46,XX	5-8	2	-
58	Erkek	41	46,XY	10-10	2	-
59	Kadın	23	46,XX	5-5-13	3	-
60	Erkek	35	46,XY,21ps+	5-7-8	3	-
61	Kadın	34	46,XX,9qh+	5-6-7-10	4	+
62	Erkek	31	46 XY	5-6	2	-
63	Erkek	38	46,XY	8-12-22	3	-
64	Erkek	24	46,XY	4-9	2	-

*İkiz gebeliktir.

4.3 Kadın Olguların Trombofil Mutasyonları açısından analizleri

Kadın olgular FVL, Protrombin, faktör X III, PAI, MTHFR C677T, MTHFR A1298C mutasyonları açısından değerlendirilmiştir.

FV Leiden R506Q mutasyonu açısından 30 olgu wild olarak değerlendirilirken 2 olgu(12. ve 49. Olgu) heterozigot mutasyon saptanmıştır ve hiçbir olguda homozigot mutasyon saptanmamıştır. FVL Mutasyonu saptanan olgularda CNV saptanmamıştır.

Protrombin (FII) G20210A mutasyonu açısından 32 olgu wild olarak değerlendirilirken hiçbir olguda heterozigot mutasyon veya homozigot mutasyon saptanmamıştır.

MTHFR C677T (Ala222Val) mutasyonu açısından 16 olgu wild olarak değerlendirilirken 12 olgu heterozigot mutasyon ve 4 olguda homozigot mutasyon saptanmıştır.

MTHFR A1298C (Glu429Ala) mutasyonu açısından 15 olgu wild olarak değerlendirilirken 15 olgu heterozigot mutasyon ve 2 olguda homozigot mutasyon saptanmıştır.

FXIII V34L (Val34Leu) mutasyonu açısından 19 olgu wild olarak değerlendirilirken 11 olgu heterozigot mutasyon ve 2 olguda homozigot mutasyon saptanmıştır.

PAI (Plasminogen activator inhibitor-1) geninin promoter bölgesindeki 4G / 5G olarak bilinen polimorfizmi (5G alleli 4G'den biraz daha az transkripsiyonel etkiye sahiptir.) açısından 8 olgu wild olarak değerlendirilirken 14 olgu heterozigot mutasyon ve 10 olguda homozigot mutasyon saptanmıştır.

4.4 Olgularda Saptanan CNV'ler

Kopya sayısı değişiklikleri toplam 64 olgunun 40'ında (~%62) saptanmıştır. Tablo da görüldüğü üzere 40 örnekte 56 farklı bölgede toplam 83 CNV tespit edilmiştir. Agilent CytoGenomics 4.0 analiz programındaki CNV görüntülerine ait örnekler Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

Saptanan CNV'ler tiplerine göre değerlendirildiğinde; %36'sının (20/56) delesyon, %64'ünün (36/56) duplikasyon gözlenmiştir.

Tablo 4.3'te belirtildiği üzere 40 olgunun 11'inde (6., 15., 33., 35., 36., 44., 46., 47., 54., 57., 64. olgular) 5'i erkek, 6'sı kadın olmak üzere CNV saptanan bölgesi gen içermemektedir ve 3 olgusu (36., 47., 54. olgular) 2'si erkek 1'i kadın olmak üzere saptanan CNV bölgeleri sadece gen içermeyen bölgelerdir.

Tablo 4.3. Olguların cinsiyetlere göre CNV, gen içeren ve gen içermeyen CNV dağılımı

	CNV Saptanmayan n (%)	CNV saptanan n (%)	Gen İçeren CNV n (%)	Gen İçermeyen CNV n (%)	Hem Gen İçeren hem Gen İçermeyen CNV n (%)
Olgu Sayısı	24 (37,5)	40 (62,5)	37 (57,8)	3 (4,6)	11 (17,1)
Erkek Olgu Sayısı	10 (15,6)	22 (34,3)	20 (31,2)	2 (3,1)	5 (7,8)
Kadın Olgu Sayısı	14 (21,8)	18 (28,1)	17 (26,5)	1 (1,5)	6 (9,3)

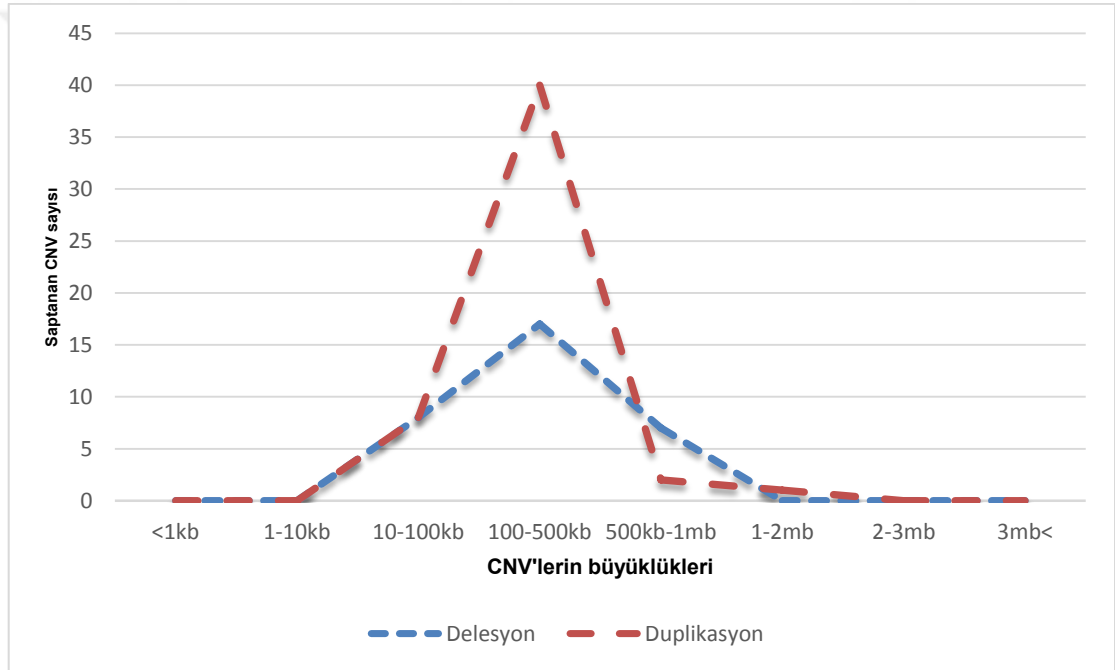
Tablo 4.4. TGK olgularının aCGH Analiz Sonuçları

Olgu Nu	Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Del/Dup	Omim Genleri	
					Morbid	Diğer
1	8p23.1	12241093	12467543	Dup	-	FAM86B2
2	1p36.22-p36.21	12120119	12912625	Del	-	TNFRSF8, TNFRSF1B, DHRS3,
2	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-
2	6q27	168364343	168557983	Dup	-	MLLT4, KIF25
2	8p23.1	11541950	11702150	Dup	GATA4,	FDFT1, CTSB,
3	12q22-q23.1	96111082	96428347	Dup	HAL,	NTN4, SNRPF, LTA4H
3	15q15.3	43916972	43951301	Del	-	CATSPER2
4	6p25.3	259318	339802	Del	-	DUSP22
4	16p13.11	15048751	15416681	Dup	-	PDXDC1, NTAN1, RRN3
6	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-
6	11q25	134647002	134700853	Dup	-	-
6	16p11.2-p11.1	34482042	34682448	Dup	-	-
7	2p12	80810986	80922693	Dup	-	CTNNA2
7	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-
7	6q25.3	157728230	157968773	Dup	-	-
9	8p23.1	7165283	7752586	Del	-	DEFB103A, DEFB4A
11	1p31.1	71564987	71864539	Dup	-	-
11	10q23.1	84679418	84705055	Dup	-	NRG3
11	15q12	26870749	26906560	Dup	GABRB3	-
11	22q11.23	25078164	25342402	Dup	-	PIWIL3
13	17p11.2-p11.1	21529568	22205821	Dup	-	-
14	2q37.3	242856588	242980297	Del	-	-
14	4q25	112939140	113303929	Dup	-	ALPK1
15	1p31.1	71644631	71876032	Dup	-	NEGR1
15	3q26.32	176221801	176409474	Dup	-	-
15	8q12.3	63059191	63219403	Dup	-	NKAIN3
15	8q24.13	124982301	125093611	Dup	-	-
15	10q22.3	80246881	80381611	Dup	-	-
15	22q11.23	25162700	25280657	Dup	-	PIWIL3,
17	6p25.3	294420	389334	Del	-	DUSP22
18	7q35	146259229	146271983	Del	CNTNAP2	-
19	10q26.3	135243049	135358905	Dup	-	CYP2E1
20	22q11.21	18718296	19000760	Del	PRODH	DGCR6,
21	4p16.3	69699	165369	Del	-	-
22	7p21.2-p21.1	16111821	17470499	Dup	ISPD	SOSTDC1, TSPAN13, AGR2, AGR3, AHR,

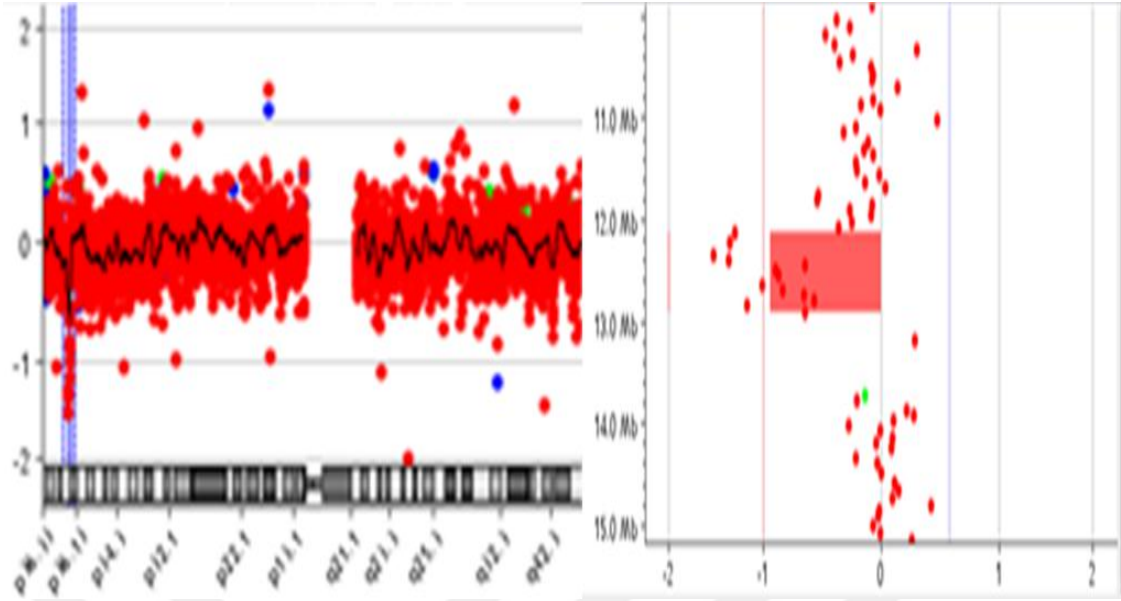
22	10q26.3	135288547	135353728	Dup	-	CYP2E1
24	10q26.3	135274570	135379166	Dup	-	CYP2E1, SYCE1
31	2q31.1	177041329	177051997	Del	-	-
31	8q21.13	80863913	81267401	Del	-	MRPS28, TPD52
31	19q13.2-q13.31	43242795	43741310	Dup	-	PSG3, PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4,
32	10q11.22	46997942	47639999	Del	-	GPRIN2, NPY4R, ANXA8
32	16p11.2-p11.1	34482042	34727349	Dup	-	-
32	19q13.2-q13.31	43253223	43736892	Dup	-	PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4,
33	4p16.3	45882	71992	Dup	-	-
33	14q11.2	22500231	23011311	Del	-	-
35	1q31.1	188849004	189275487	Dup	-	-
35	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-
36	1q31.1	188769500	189212256	Dup	-	-
37	7q31.1	110792866	111190869	Del	-	IMMP2L
39	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-
40	12p12.3	15993788	16117364	Del	-	STRAP
44	2p11.2	87771588	87954920	Dup	-	-
44	6q16.3	103703918	104289410	Del	-	-
46	7q11.23	76139282	76351578	Del	-	UPK3B, POMZP3
46	9p23	12031727	12196201	Del	-	-
46	10p13	12373413	13077734	Dup	-	CAMK1D
46	14q11.2	22598026	23011311	Del	-	-
47	16q21	63736586	64006142	Dup	-	-
50	15q15.3	43927359	43949572	Del	-	CATSPER2
52	7q11.23	76139282	76558024	Del	-	UPK3B, POMZP3
54	5p14.3	20895983	21402998	Del	-	-
56	10q23.1	84062345	84094466	Del	-	NRG3
57	1p31.1	71644631	71876032	Dup	-	NEGR1
57	3p24.2-p24.1	26340714	26484885	Dup	-	-
57	8q23.1	106814267	106978629	Dup	ZFPM2	-
57	10q22.3	80246881	80381611	Dup	-	-
57	16q21	61464017	61641525	Dup	-	-
58	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-
58	10p14	8588248	8717319	Dup	-	-
58	12q24.32	127960536	128217368	Dup	-	-
58	17q22	56848361	57048222	Del	-	-
60	16p11.2-p11.1	34467363	34757461	Dup	-	-
61	6q27	170687555	170774867	Dup	-	FAM120B
62	2q37.3	242856588	243007359	Del	-	-

63	10q11.22	47026021	47655146	Del	-	NPY4R, ANXA8,
63	16p11.2-p11.1	34482042	34727349	Dup	-	-
64	1p31.1	71644631	71876032	Dup	-	NEGR1
64	8q24.13	124982301	125093611	Dup	-	-
64	10p14	8588248	8808613	Dup	-	-
64	10q23.31	91294861	91393360	Dup	SLC16A12	PANK1, MIR107
64	12q21.31	82546274	82730083	Dup	-	-
64	13q31.1	85127264	85279653	Dup	-	-
64	22q11.23	25207339	25280657	Dup	-	-

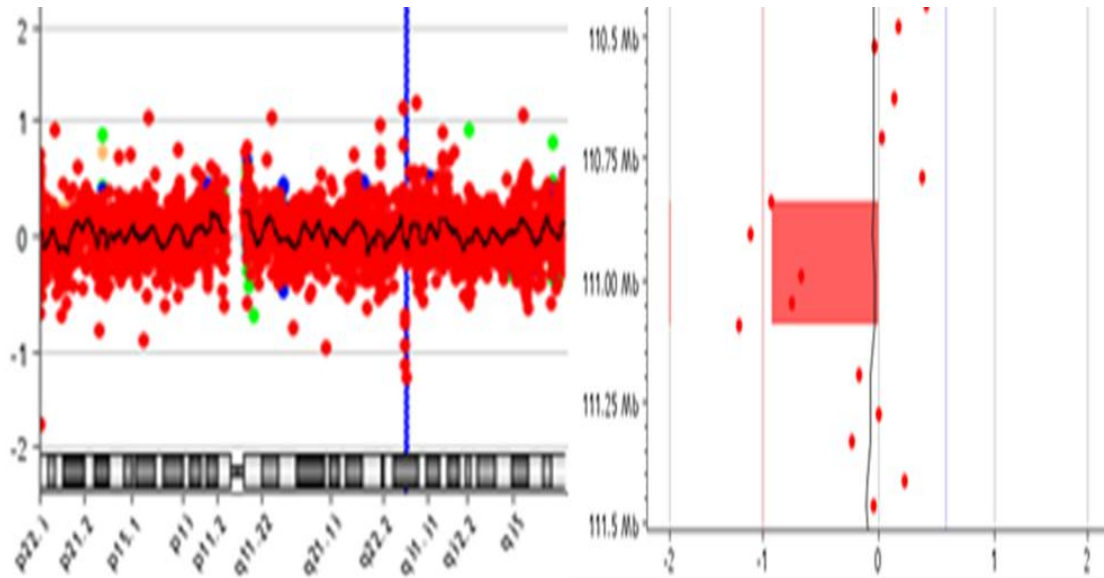
*Tabloda koyu olarak yazılı CNV bölgeleri gen içermemektedir.



Grafik 4.1. CNV büyüklüklerine göre grupların delesyon ve duplikasyon durumuna göre dağılımı



Şekil 4.1. İki nolu olguda 1. kromozomun p36.22-p36.21 lokusundaki TNFRSF8, TNFRSF1B, DHRS3, MIR7846, MIR4632, VPS13D, SNORA59A, SNORA59B, MIR6730, AADACL4, AADACL3, C1orf158, PRAMEF12, PRAMEF1, PRAMEF11, HNRNPCL1, HNRNPCL3, HNRNPCL4 genlerini içeren heterozigot delesyonun (792 Kb) aCGH görüntüsü



Şekil 4.2. Otuz yedi nolu olguda 7. Kromozomun q31.1 lokusundaki IMMP2L genini içeren heterozigot delesyonun (398Kb) aCGH görüntüsü

4.5 Saptanan CNV'lerin Kromozomlara göre Dağılımları

Kromozomlardaki CNV'lerin kromozom bölgelerine göre bakıldığında 18 tanesinin delesyon, 34 tanesinin duplikasyon ve 2 tanesinin de hem delesyon hem duplikasyon tipinde olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.5. Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı

Kromozom	Kromozom Bölgesi	Delesyon / Duplikasyon	Sıklığı (%)	Saptanan Olgu sayısı (n)
1	p31.1	dup	4,82	4
	p36.22-p36.21	del	1,20	1
	q31.1	dup	2,41	2
2	p11.2	dup	1,20	1
	p12	dup	1,20	1
	q31.1	del	1,20	1
	q37.3	del	9,64	8
3	p24.2-p24.1	dup	1,20	1
	q26.32	dup	1,20	1
4	p16.3	del-dup	2,41	2
	p25	dup	1,20	1
5	p14.3	del	1,20	1
6	p25.3	del	2,41	2
	q16.3	del	1,20	1
	q25.3	dup	1,20	1
	q27	dup	2,41	2
7	p21.2-p21.1	dup	1,20	1
	q11.23	del	2,41	2
	q31.1	del	1,20	1
	q35	del	1,20	1
8	p23.1	del-dup	3,61	3
	q12.3	dup	1,20	1
	q21.13	del	1,20	1
	q23.1	dup	1,20	1
	q24.13	dup	2,41	2
9	p23	del	1,20	1
10	p13	dup	1,20	1
	p14	dup	2,41	2
	q11.22	del	2,41	2
	q22.3	dup	2,41	2
	q23.1	del-dup	2,41	2
	q23.31	dup	1,20	1
	q26.3	dup	3,61	3

11	q25	dup	1,20	1
12	p12.3	del	1,20	1
	q21.31	dup	1,20	1
	q22-q23.1	dup	1,20	1
	q24.32	dup	1,20	1
13	q31.1	dup	1,20	1
14	q11.2	del	2,41	2
15	q12	dup	1,20	1
	q15.3	del	2,41	2
16	p11.2-p11.1	dup	4,82	4
	p13.11	dup	1,20	1
	q21	dup	2,41	2
17	p11.2-p11.1	dup	1,20	1
	q22	del	1,20	1
19	q13.2-q13.31	dup	2,41	2
22	q11.21	del	1,20	1
	q11.23	dup	3,61	3

Grafik 4.2’te görüldüğü üzere 18, 20, 21, X ve Y kromozomlarında CNV saptanmadı.

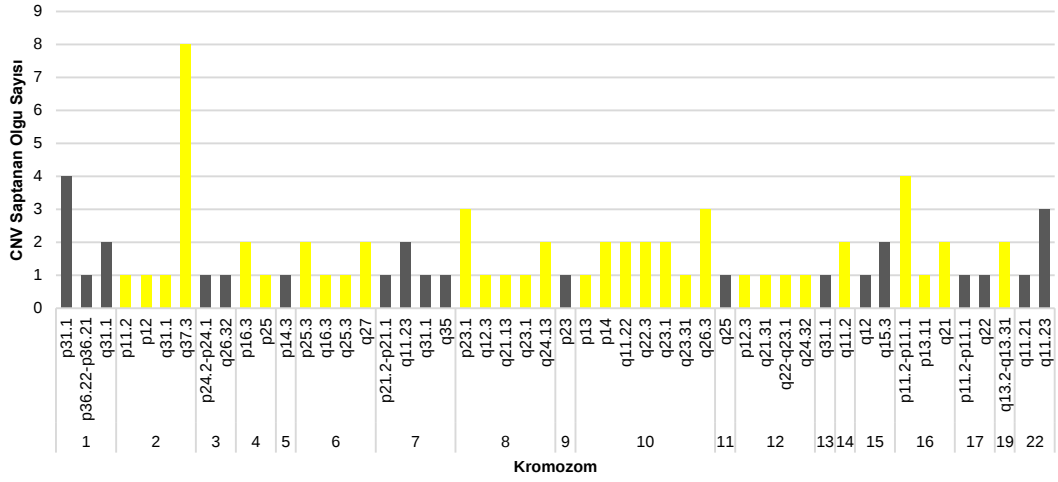
Tablo 4.5’te ifade edildiği gibi 2q37.3 kromozom bölgesindeki LINC01237, LOC102723927 genlerini içeren heterozigot delesyon 8 olguda (%9,64) gözlenmiştir (Şekil 4.3).

1p31.1 kromozom bölgesinde NEGR1 (Neuronal Growth Regulator 1), ZRNAB2-AS2 genlerini içeren duplikasyon 4 olguda (%4,82) gözlenmiştir.

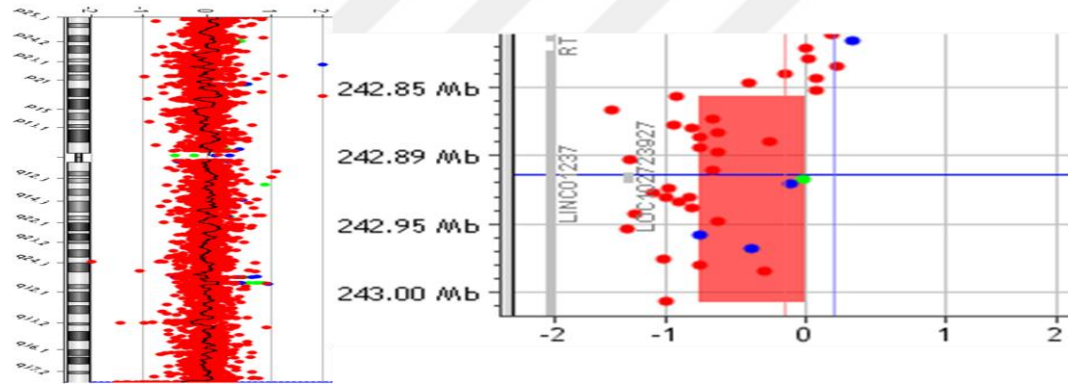
16p11.2-p11.1 kromozom bölgesinde LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP genlerini içeren duplikasyon 4 olguda (%4,82) gözlenmiştir (Şekil 4.4).10q26.3 kromozom bölgesinde CYP2E1, SYCE1, SCART1 genlerini içeren duplikasyon 3 olguda (%3,61) gözlenmiştir.22q11.23 kromozom bölgesinde PIWIL3, TOP1P2, SGSM1, TMEM211 genlerini içeren duplikasyon 3 olguda (%3,61) gözlenmiştir.

Olgularda saptanan CNV’lerin confirmasyon çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. 2 nolu olguda saptanan delesyonun confirmasyonu MLPA ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3).

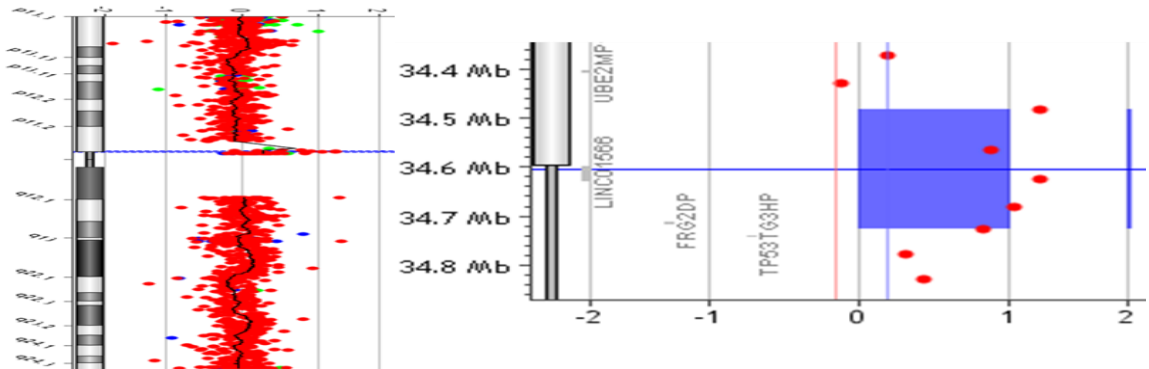
Tablo 4.6’da gösterildiği üzere en sık CNV saptanan genler LINC01237, LOC102723927’dir. Sonra 4 olguda duplikasyonu saptanan ZRANB2-AS2, LINC01566 genleri gelmektedir.



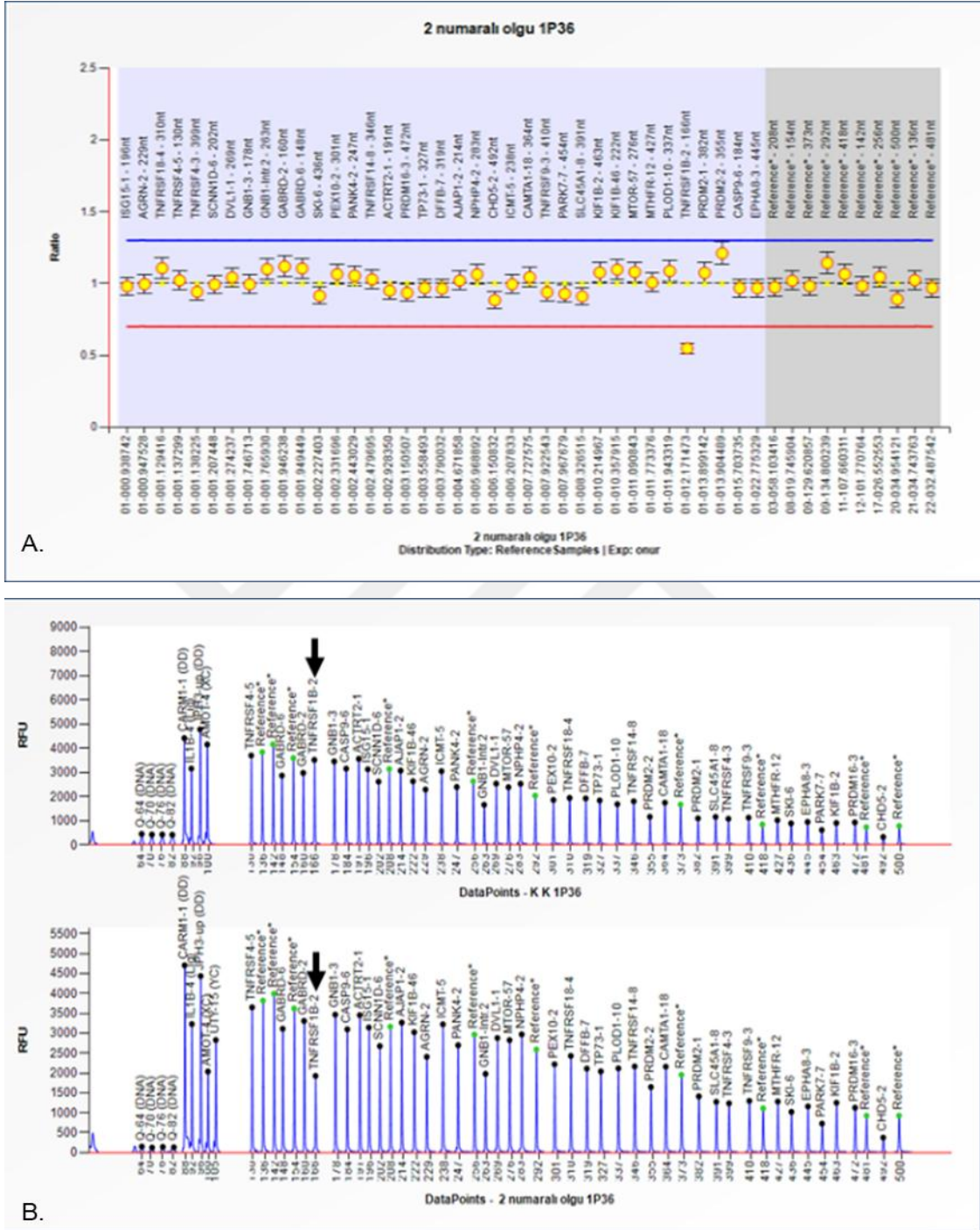
Grafik 4.2. Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı



Şekil 4.3. İkinci kromozomun q37.3 lokusundaki LINC01237, LOC102723927 genlerini içeren heterozigot delesyonun (150Kb) aCGH görüntüsü



Şekil 4.4. Onaltıncı kromozomun p11.2-p11.1 lokusundaki LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP genlerini içeren heterozigot duplikasyonun (245Kb) aCGH görüntüsü



Şekil 4.5. İki nolu oliguda 1p36.22-p36.21 bölgesinde yer alan TNFRSF1B geninde yer alan probun MLPA (SALSA MLPA P147 1p36 probemix) görüntüsü(A,B)

Tablo 4.6. En az iki olguda saptanan CNV'lerin genlere göre dağılımı

Saptanan Olgu Sayısı	Genler	Del-Dup
8	LINC01237, LOC102723927	Del
4	ZRANB2-AS2	Dup
4	LINC01566	Dup
3	NEGR1	Dup
3	FRG2DP	Dup
3	CYP2E1	Dup
3	PIWIL3	Dup
2	ZNF595, ZNF718	del-dup
2	DUSP22	Del
2	UPK3B, POMZP3	Del
2	FER1L6, FER1L6-AS1, FER1L6-AS2	Dup
2	LOC105376398	Dup
2	NPY4R, ANXA8,	Del
2	NRG3	del-dup
2	CATSPER2	Del
2	PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11 PSG2, PSG5, PSG4	Dup

En büyük gebelik kaybı 4-12 hafta arasında olan olgularda saptanan CNV saptanan olgu sayısı 24 (%64) ve bu olguların 23 (%62) tanesinde saptanan CNV bölgeleri gen içermekte olup 7 (%18) olguda ise gen içermeyen CNV bölgeleri mevcuttur. Bu olguların 6 tanesinde saptanan CNV bölgeleri hem gen içeren bölgede hemde gen içermeyen bölgede saptanmıştır(Grafik 4.3).

En büyük gebelik kaybı 13-24 hafta arasında olan olgularda saptanan CNV saptanan olgu sayısı 13 (%68) ve bu olguların 12 (%63) tanesinde saptanan CNV bölgeleri gen içermekte olup 2 (%10) olguda ise gen içermeyen CNV bölgeleri mevcuttur. Bu olguların 1 tanesinde saptanan CNV bölgeleri hem gen içeren bölgede hemde gen içermeyen bölgede saptanmıştır (Grafik 4.3).

Tablo 4.7. CNV saptanan genlerin DGV veritabanındaki toplum oranları ile karşılaştırılması

GENLER		Saptanan/Toplam Olgu sayısı	Toplum oranı	p	Referans
LINC01237, LOC102723927	del	8/64	41/771	0,020*	dgv165e55
ZRANB2-AS2	dup	4/64	1/112	0,003*	nsv818211
LINC01566	dup	4/64	13/29084	0,0001*	dgv2963n100
NEGR1	dup	3/64	2/1557	0,0001*	dgv19n27
FRG2DP	dup	3/64	189/29084	0,009*	dgv2965n100
CYP2E1	dup	3/64	110/29084	0,002*	dgv1001n100
DUSP22	del	2/64	84/29084	0,015*	dgv5878n100
UPK3B, POMZP3	del	2/64	3/112	0,514	dgv63n64
CATSPER2	del	2/64	17/29084	0,002*	dgv2585n100
PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4	dup	2/64	16/771	0,384	dgv140e55

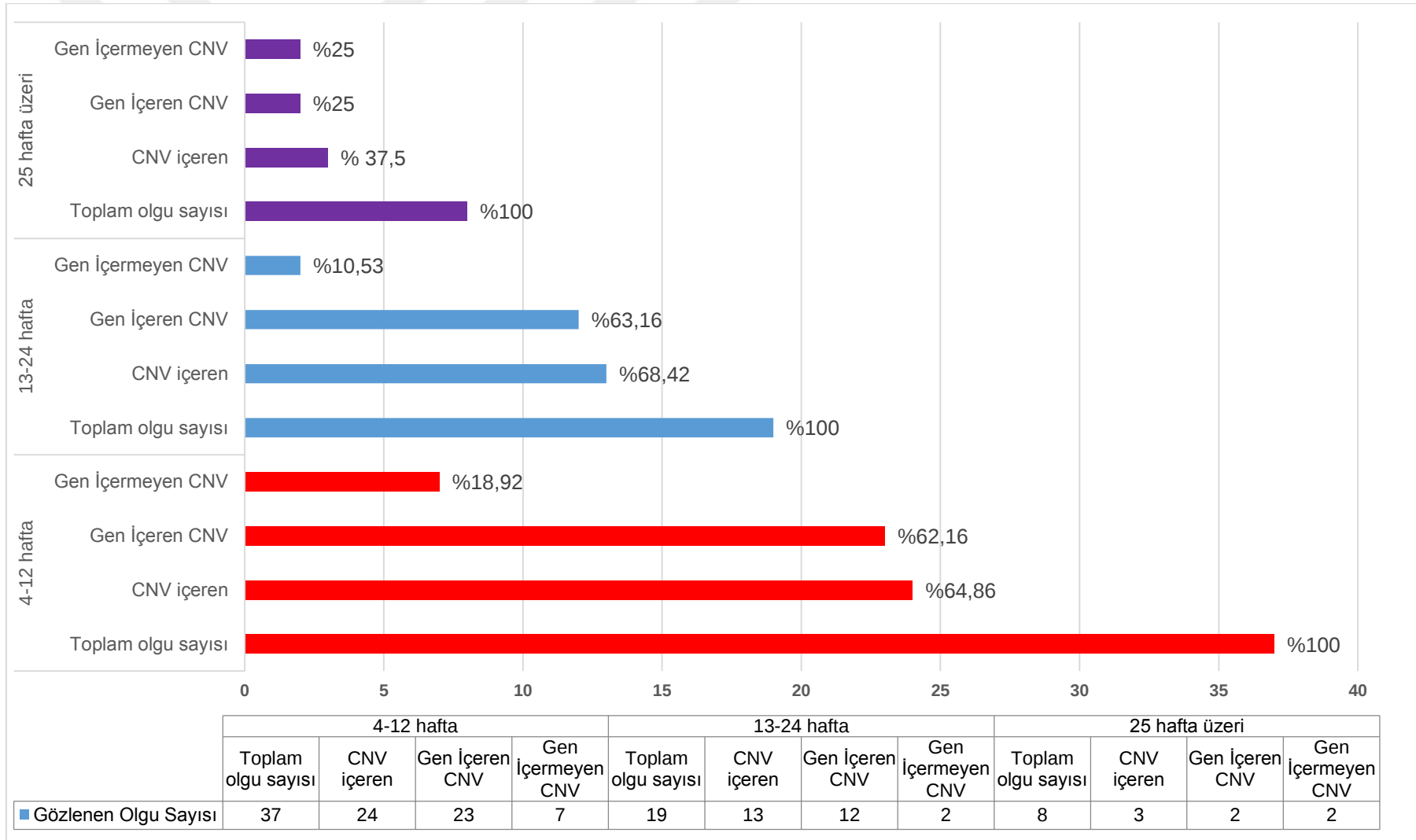
p: Binomial Test

* p<0.05 – Database of Genomic Variants (DGV)

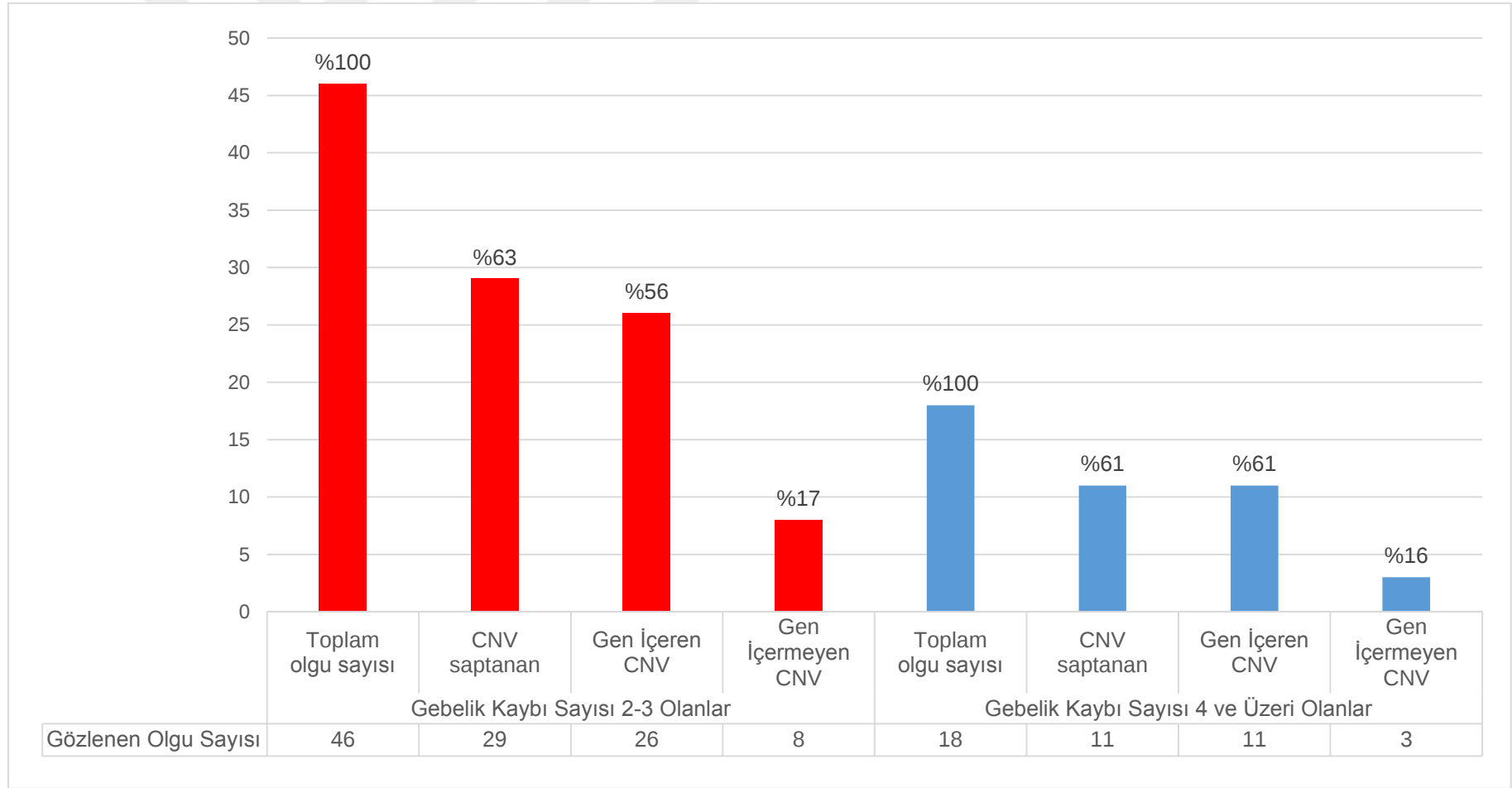
En büyük gebelik kaybı 25 hafta ve üzeri olan olgularda saptanan CNV saptanan olgu sayısı 3 (%37) ve bu olguların 2 (%25) tanesinde saptanan CNV bölgeleri gen içermekte olup 2 (%25) olguda ise gen içermeyen CNV bölgeleri mevcuttur. Bu olguların 1 tanesinde saptanan CNV bölgeleri hem gen içeren bölgede hemde gen içermeyen bölgede saptanmıştır (Grafik 4.3).

Gebelik kaybı 2-3 olan olgularda saptanan CNV saptanan olgu sayısı 29 (%63) ve bu olguların 26 (%56) tanesinde saptanan CNV bölgeleri gen içermekte olup 8 (%17) olguda ise gen içermeyen CNV bölgeleri mevcuttur. Bu olguların 5 tanesinde saptanan CNV bölgeleri hem gen içeren bölgede hemde gen içermeyen bölgede saptanmıştır.

Gebelik kaybı 4 ve üzeri olan olgularda saptanan CNV saptanan olgu sayısı 11 (%61) ve bu olguların 11 (%61) tanesinde saptanan CNV bölgeleri gen içermekte olup 3 (%16) olguda ise gen içermeyen CNV bölgeleri mevcuttur. Bu olguların 3 tanesinde de saptanan CNV bölgeleri hem gen içeren bölgede hemde gen içermeyen bölgede saptanmıştır.



Grafik 4.3. TKG olan olguların en büyük gebelik kaybı haftasına göre CNV gen içirip içermeme dağılımı



Grafik 4.4. Gebelik kaybı sayısına göre CNV içeren olgu sayısı ve içerdiği CNV nin gen içerip ve içermemesine göre olgu sayısı dağılımı

4.6 Olguların Seçilen genler açısından CNV değişiklikleri

TGK olan olgularımızda CORIN, CTNNA3, JAK2, PROS1, F9, FMN2, F5, MTHFR, POM121, STOX1, TIMP2, F13A1, CBS genlerinin en az 3 prob olacak şekilde ortalama log ratioları hesaplanmıştır. CORIN (Corin, Serine Peptidase) fenotipik olarak Preeklampsi/eklampsi 5 ile ilişkilidir. Cui ve arkadaşları CORIN geni ile preeklampsi arasında ilişki saptamıştır (91). En fazla kalpte eksprese edilmektedir. CTNNA3 (Catenin (Cadherin-Associated Protein), Alpha 3) Rajcan-Separovic ve arkadaşlarının gebelik kaybı etiolojine yönelik yaptığı çalışmada TIMP2 (Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 2) ile birlikte CNV olarak saptanmıştır(4). CTNNA3 en fazla kalpte ve TIMP2 ise en fazla over ve endometriumda eksprese edilmektedir. STOX1 (Storkhead Box 1, C10orf24 (Chromosome 10 Open Reading Frame 24)) van Dijk ve arkadaşları preeklampsi ile arasında ilişki saptamıştır (92). En fazla beyinden eksprese edilmektedir. JAK2 (Janus kinase 2) Mercier ve arkadaşları açıklanamayan gebelik kaybı JAK2 geni arasında ilişki saptamıştır (93). PROS1 (Protein S (Alpha)) geni ile trombofili arasında ilişki saptanmıştır (94). En fazla karaciğerden eksprese edilmektedir. F9 (Koagulasyon Faktör IX), Bezemer ve arkadaşları bu genle trombofili arasında ilişki saptamıştır (95). En fazla karaciğerden eksprese edilmektedir. FMN2 (Formin 2), Leader ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TGK ile arasında ilişki saptamıştır (96). En fazla beyinden eksprese edilmektedir. F5 (Koagulasyon Faktor V), Martinelli ve arkadaşları bu genle TGK arasındaki ilişkiyi saptamıştır (97). En fazla karaciğer ve plasentadan eksprese edilmektedir. MTHFR (Methylene Tetra Hydro Folate Reductase) Hobbs ve arkadaşları bu genle gebelik kaybı arasında ilişki saptamıştır (98). Yaygın olarak eksprese edilmesi yanı sıra en fazla akciğerden eksprese edilmektedir. POM121 (POM121 Transmembrane Nucleoporin) yaygın olarak eksprese edilmesi yanı sıra en fazla kemik iliğinden eksprese edilmektedir. F13A1 (Coagulation Factor XIII A Chain), Reiner ve arkadaşları bu genle kanama arasında ilişki saptamıştır (99). En fazla plasentadan eksprese edilmektedir. CBS (Cystathionine-Beta-Synthase) mutasyonları homosisteini yükselterek tromboza yatkınlığa neden olabilmektedir (100). En fazla karaciğer

eksprese edilmektedir. İncelenen bu gen bölgelerinde genin tamamını kapsayan delesyon veya duplikasyon saptanmamıştır.



5. TARTIŞMA

Çocuk istemi olan çiftlerin %1-3'ü tekrarlayan gebelik kaybı sorunu ile karşı karşıyadır. TKG poligenik mültifaktöriyel bir sağlık sorunu olup endokrin, immünolojik, anatomik, trombofilik, kromozomal, genetik, enfeksiyöz, çevresel faktörler etiolojide saptanabilmektedir (101). Tüm bu faktörler tetkik edilse bile TKG etiolojisinin yaklaşık %50'si halen idiopatik olarak kalmaktadır. Bu nedenle tekrarlayan gebelik kayıplarında etiolojinin saptanmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

TKG etiolojisini aydınlatmak için günümüzde yapılan genetik tetkiklerden başlıcaları kadın ve erkek periferik kandan kromozom analizi, kadından ise ayrıca trombofili açısından FVL ve F2 genlerine yönelik SNP açısından tetkikidir (102). Dengeli translokasyon yada yapısal kromozomal anomali taşıyıcılığı saptandığında preimplantasyon veya prenatal tanı yapılabilen; trombofili saptanması durumunda ise düşük molekül ağırlıklı heparin kullanılarak gebelik kayıpları anlamlı bir şekilde artmakta ve eve canlı bebek götürme olasılığı artmaktadır (43,103,104).

aCGH ya da diğer adıyla kromozomal karyotipleme, DNA dizisindeki CNV'leri tespit etmek için genom çapında kapsamlı ve yüksek rezolüsyonlu bir analiz yöntemidir. CNV'lerin büyük kısmı polimorfiktir. Herhangi iki insanın genom içeriği CNV polimorfizmi nedeniyle 50-100 Mb kadar farklılık gösterebilir. Gen içerip içermemeleri fenotipi etkileyebildiği gibi kromozom yeniden düzenlemelerinde etkili oldukları için de önem taşırlar.

Ayrıca CNV'ler raporlanırken hastaların klinik bulguları da değerlendirilmelidir. CNV'ler patojenik, VOUS ya da benign olarak sınıflandırılmaktadır. CNV'ler açısından çok veri toplamak ve bu verileri paylaşmak çok önemlidir. Bu şekilde CNV'lerin daha iyi yorumlanması mümkün olabilecektir.

Bugüne kadar TKG olan olgularında CNV'leri değerlendirmek açısından yapılan, sonuçlandırılmış sadece üç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar: Rajcan-Separovic ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışma, Nagirnaja ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışma, Kasak ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmalardır.

Rajcan-Separovic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Agilent 105 K oligonukleotit aCGH yöntemi ile toplam 22 birey çalışılmıştır. 8 çift 13 fetal materyal üzerinde kalıtılmış 11 tane daha önce saptanmamış CNV saptanmıştır. Bizim çalışmamızda bu çalışmada saptanan CNVler ile aynı bölgelerde CNV saptanmamıştır (4). Bu durum vaka sayısının az olmasından kaynaklanabileceği gibi popülasyonlarımız arasındaki etnik farklılıktan da kaynaklanıyor olabilir.

Nagirnaja ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada toplam 558 TKG olgusu ve 205 tane sağlıklı kadın kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Erkek sağlıklı kontrol çalışmaya alınmamıştır. Yaptıkları çalışmada 5p13.3 bölgesinde yeni bir duplikasyon saptanmış. PDZD2 ve GOLPH3 genlerinin ekspresyonundaki değişikliklerin gebelik komplikasyonlarını artırıcı bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (105). Bizim çalışmamızda bu bölgelerde de değişiklik saptanmamıştır. Nagirnaja ve arkadaşlarının çalışması literatürdeki en büyük hasta ve kontrol grubu olup bizim örneklem grubumuz göreceli olarak daha küçüktür.

Kasak ve arkadaşlarının yaptığı çalışma TKG olan 25 olgu dahil edilmiştir. İdiopatik TKG olgularına yönelik olarak anne-baba-plasenta ve anne-plasenta şeklinde çalışılmış. NUP98 ve MTRR genleri TKG olan olgularda etkili olduğu gösterilmiş ve ayrıca büyük perisentromerik ve subtelomerik CNV'lerin TKG açısından risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (7). Bizim çalışmamızda bu genler de normal bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda 2 olgumuzda muhtemel patojenik CNV saptanmıştır. Tablo2.3'te de gösterilen CNV değerlendirme ölçeğine göre 10q11.22 kromozom bölgesindeki heterozigot delesyon ve 1p36.22-p36.21 kromozom bölgesindeki heterozigot delesyon patojenik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.1 ve Şekil 4.5). Ayrıca CLINVAR'da bu bölgelerdeki CNV'ler açısından likely patojenik olarak değerlendirilmiştir. Bu patojenik CNV ler ilk kez bizim çalışmamızda TKG olgularında saptanmıştır. Bu hastada mental retardasyon ve dismorfik bulgu yoktu, 4 gebelik kaybı ve bir yaşayan çocuğu mevcuttu.

CNV'ler farklı mekanizmalarla TKG etiolojisinde yer alabilirler; CNV bölgesinin içerdiği genlerin fonksiyon kaybı veya kazancı sebebiyle embriyolojik ve/veya plasental gelişim bozulabilir; özellikle heterozigot CNV'ler mayoz bölünme esnasında sinaps ve krosing over oluşumunu bozarak oluşan gametlerin daha büyük ve patojenik delesyon veya duplikasyonlara sahip olmalarına yol açabilirler; ayrıca gen içermeyen bölgelerin non homolog CNV'leri bile interkromozomal etki nedeniyle fetal anöploidilere neden olarak gebelik kaybına neden olabilir.

CNV saptamaya yönelik yapılan çalışmalar sıklıkla fetal materyale yöneliktir. TKG olan olgulara yönelik çalışmalar genelde SNP saptamak amacıyla yapılmıştır. Bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak fetal materyal yerine TKG olan çiftlerin CNV'lerine yöneliktir. Bu şekilde saptayacağımız etiyojolojiyi aydınlatacak CNV bölgeleri etiyojolojiye katkıda bulunarak bu açıdan müzdarip olan bireylere yardımcı olabilecektir.

Analiz edilen 43 aileden sadece 4 çift ve 7 tekli olgu (eşi test edilmemiş) olmak üzere 15 bireyde hiç CNV saptanmamış olup kalan ailelerde trombofili ve aCGH analizi ile 32 ailede anlamlı sonuç elde edilmiştir.

Gen içermeyen CNV'lerinde interkromozomal etki ile gametogenezi bozabildiği göz önüne alınırsa trombofili yanında aCGH ile CNV analizi, TKG ailelerinde olgularının eşleriyle birlikte analiz edilmesi durumunda %74'üne tanı konulabilmesini sağlayarak sebebi bilinmeyen oranını %50'den %26'ya indirmektedir. Olguların çift olarak değil de bireysel olarak analiz edilmesi durumunda %62'sine tanı konabilmiş ve idiopatik grup %38'e azalmıştır.

Tablo 2.1'de görüldüğü üzere sitogenetik olarak dengesiz görülen yapısal anomalilerin %85'i abortusla sonuçlanırken, dengeli görünen anomalilerde bile %16'ya varan oranda abortus görülmesi bu anomalilerin de submikroskobik düzeyde dengesiz olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmamızda ilk olarak kromozom analizleri ve trombofili açısından ilgili SNP'ler değerlendirildi. Trombofili açısından FVL ve protrombin mutasyonu taşıyıcısı olan 2 olguda hiç CNV saptanmadı. Tüm genomu yönelik genomik kopya sayısı değişimleri, çözünürlüğü daha yüksek olan aCGH analizi ile değerlendirilmiştir.

TGK olgularında gebelik kaybı haftası ve CNV'ler arası bağlantıya bakıldığında (Grafik 4.3) 4-12 hafta kayıpları ile 13-24 hafta kayıpları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, her iki grupta da % 62-63 gen içeren CNV olduğu ve CNV'si olan olguların oranının %64-68 olduğu gözlenmiştir. Gen içermeyen CNV oranı 25 hafta üzeri kayıplarda en fazla (%25), ikinci sırada 4-12 hafta ve en az 13-24 hafta kayıpları olan ebeveynlerde saptanmış olup muhtemelen olgu sayısının az olması nedeniyle sapmalara olabilir, bu konuda daha büyük hasta ve kontrol grupları ile çalışılması önerilir.

Hasta grubumuzda CNV saptanan genlerin oranını DGV veri tabanındaki toplum oranları ile karşılaştırdığımızda özellikle UPK3B, POMZP3 delesyonu kontrol grubunda da yüksek oranda saptandığından (3/112) aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının nedeni olabilir. Bununla birlikte bu durum kontrol grubunun infertilite/abortus açısından özellikle belirlenmemiş olmasından kaynaklı olabilir, bu kontrol grubu infertilite/ abortus çiftleri olup olmadığı hakkında bilgiye ulaşılamamıştır. Bu konuda daha doğru bir değerlendirme yapılabilmesi için fertil ve hiç abortus öyküsü olmayan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması gerekmektedir.

Saptanan CNV'lerin büyüklükleri değerlendirildiğinde (Grafik 4.1) bizim çalışmamızda saptanan CNV'lerin genellikle 100-500kb arasında olduğu, 10 kb altında ve 2mb üstünde hiç CNV saptanmadığı görülmüştür. Kasak ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada saptanan CNV aralığı bizim çalışmamızla uyumludur (106). 10 kb nin altındaki CNVler ardışık 3 prob denk gelmediği için saptanamadığından 2 mb nin üstündeki delesyon ve duplikasyonlar ise muhtemelen MKA/MR fenotipine yol açtığından bizim çalışmamızda ve benzeri çalışmalarda saptanamamıştır.

Gebelik kaybı sayısı ile CNV içeren olgu sayısı ve bu CNV'lerin gen içerip içermemesi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (%63-61, %56-61, %17-16) CNV açısından analiz yapılacaksa 2-3 gebelik kaybı olması yeterlidir, 4 ve üzeri gebelik kayıplarını beklemek anlamlı bir katkı sağlamayacaktır.

5.1 CNV bölgeleri ve içerdikleri genler

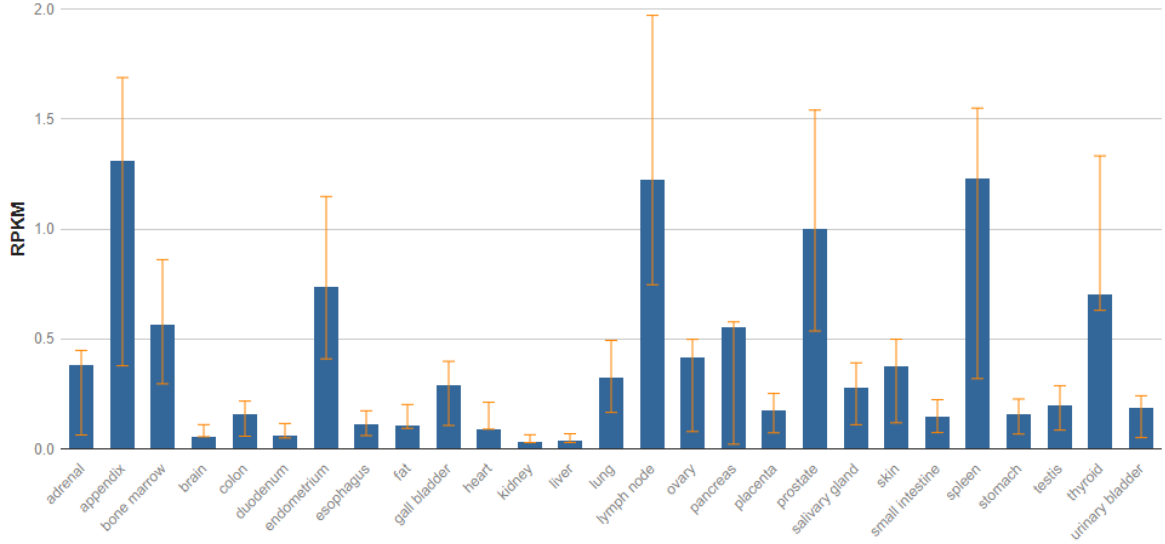
Toplam 8 olguda (2, 6, 7, 14, 35, 39, 58, 62. olgular) kromozom 2q37.3 bölgesinde yaklaşık 150 kb büyüklüğünde heterozigot delesyon saptanmıştır.

Bu bölgede OMIM geni mevcut olmayıp, LINC01237, LOC102723927 genleri mevcuttur. LINC01237 geni appendiks, lenf nodu, dalak, tiroid ve endometrium dokularında yoğun olarak eksprese edilmektedir. LOC102723927 gen bölgesindeki delesyonun klinik önemi tam saptanamamış olup kontrolsüz gestasyonel diabetes ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (3). Bu genler, Long non coding RNA genleri olup; LINC01237 geninin appendix, lenf nodu ve dalakta eksprese olması immun sistemde rolü olabileceğini düşündürmektedir (Grafik 5.1). Endometriumda da yoğun olarak eksprese olması gebelik kayıplarının etiolojisinde özellikle önemli bir aday gen olabileceğini desteklemektedir. Bu delesyonun saptandığı olguların 6'sının kadın olması endometrial ve immünolojik etiolojilerle bağlantılı olabileceğini desteklemektedir. Bu delesyonu taşıyan 6 kadının toplam 19 düşüğünden 2 tanesi 24 hafta üzeri (immünolojik?) 6 tanesi 12 ve üzeri, 13 tanesi ise 4-10 hafta aralığında olup endometrial faktör olarak ta rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

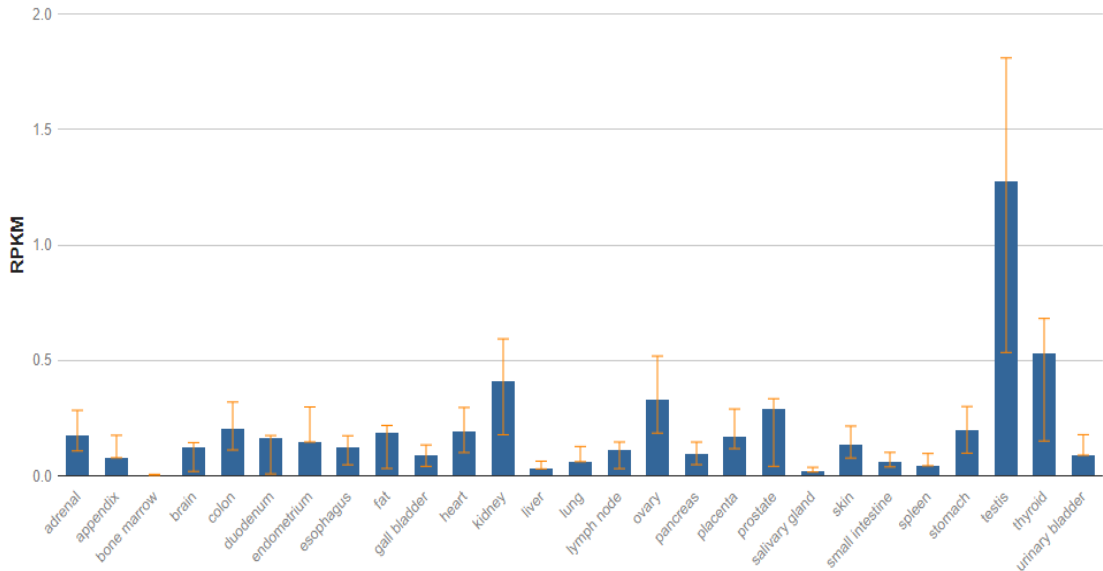
Toplam 4 olguda (11, 15, 57, 64. olgular) 1p31.1 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge NEGR1 (Neuronal Growth Regulator 1), ZRNAB2-AS2 genlerini içermektedir. Grafik 5.2'de görüldüğü üzere ZRNAB2-AS2 geni ekspresyonu en yoğun olarak testisten ve NEGR1 geni ekspresyonu ise yoğun olarak beyinden gerçekleşmektedir. Bu bölge CLINVAR'da likely benign olarak değerlendirilmiştir. Saptanan bu genler açısından literatürde TKG ile ilişkili doğrudan bir bilgi yoktur. Bu delesyonların ikisi erkeklerde olup 7-28 hafta arası kayıplara sebep olması anöploidi olabileceğini düşündürmektedir. ZRNAB2-AS2 delesyonu spermatogenezini etkileyerek abortus etiolojisinde paternal faktör olarak rol alabilir.

Toplam 4 olguda (6, 32, 60, 63. olgular) 16p11.2-p11.1 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP genlerini içermektedir. Bu bölge CLINVAR'da benign olarak değerlendirilmiştir. LINC01566 (Grafik 5.3), TP53TG3HP (Grafik 5.4) genleri ekspresyonu neredeyse sadece testisten ve FRG2DP (Grafik 5.5) yoğunlukla testisten ve ciltten gerçekleşmektedir. Saptanan bu genler açısından literatürde

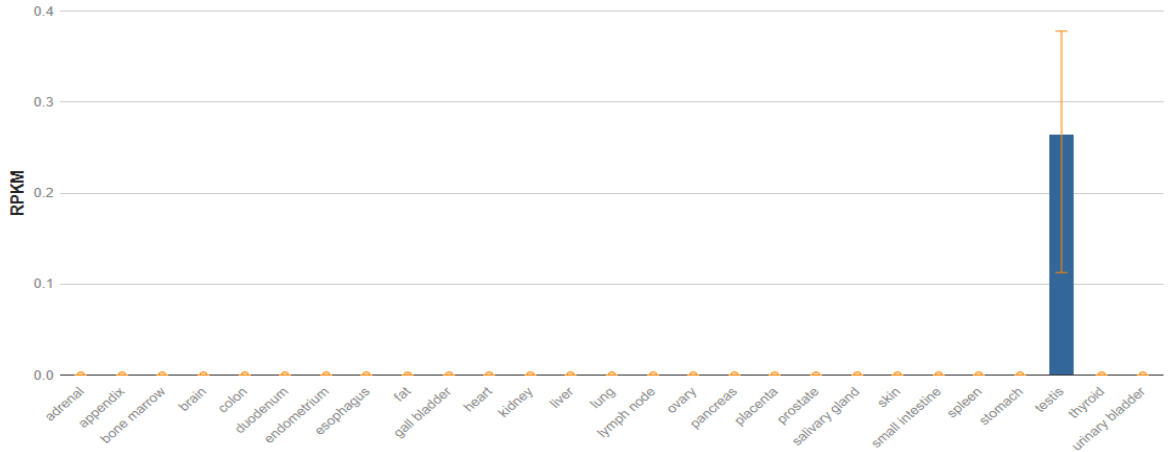
TGK ile ilişkili doğrudan bir bilgi yoktur. Bu vakaların 3'ü erkek olup gebelik kayıpları 4-25 hafta arasındaydı. LINC01566, FRG2DP genlerinin nerdeyse sadece testiste eksprese olmaları spermatogenezde rol aldıklarını düşündürmektedir. LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP genlerinin duplikasyonu da spermatogenez etkilereyere, muhtemelen kromozom anomalilerine neden olarak, abortus etiolojisinde paternal faktör olarak etkili olabilir.



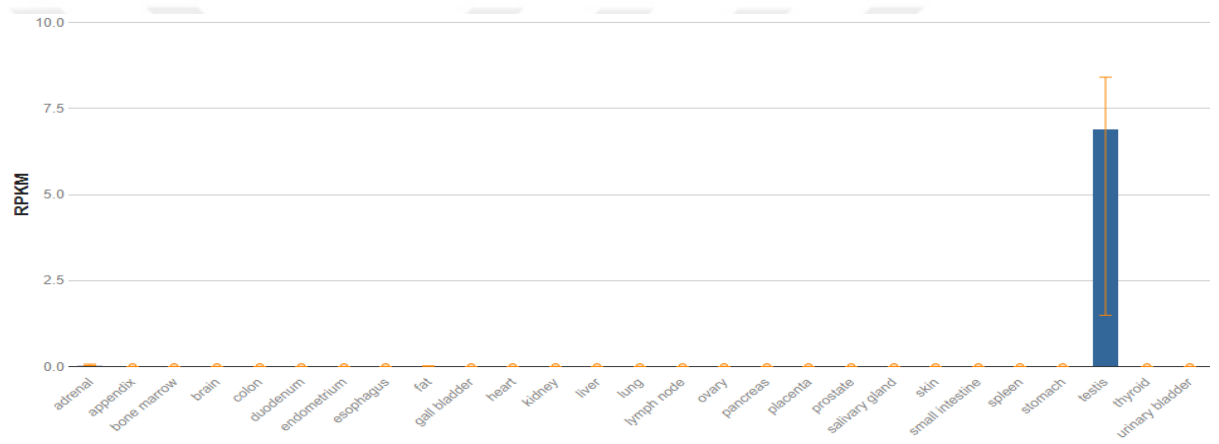
Grafik 5.1. LINC01237 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



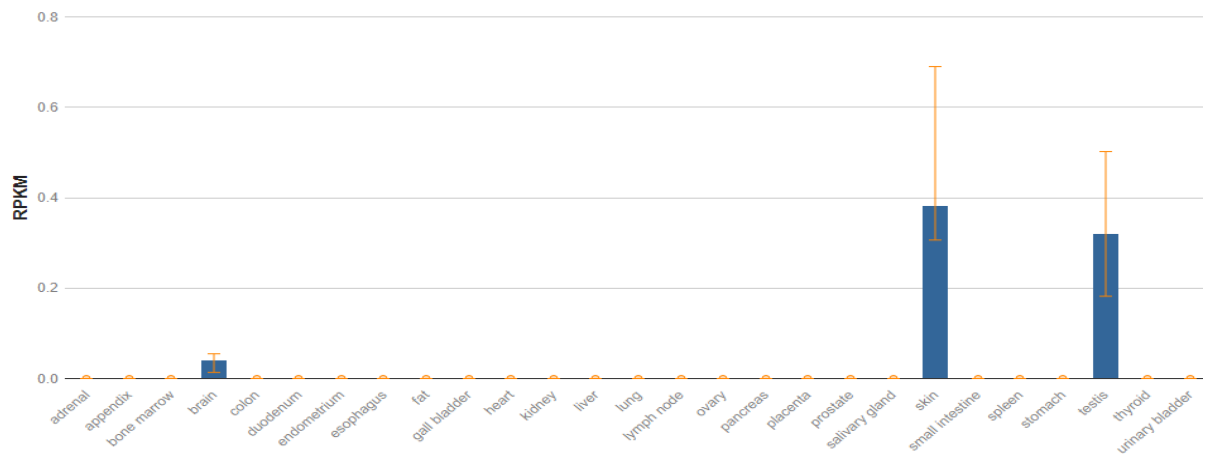
Grafik 5.2. ZRNAB2-AS2 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



Grafik 5.3. LINC01566 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



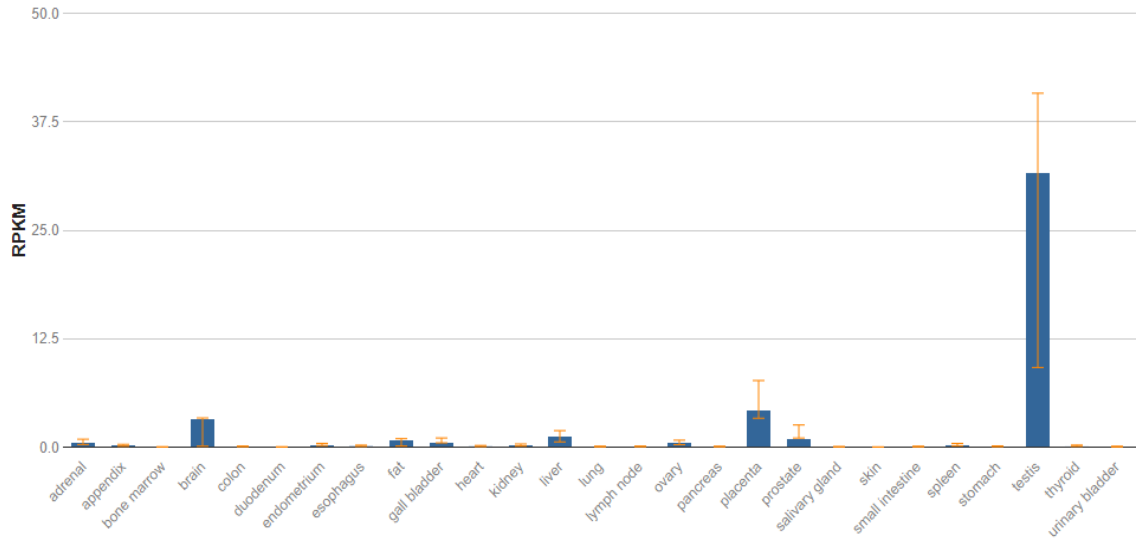
Grafik 5.4. TP53TG3HP geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



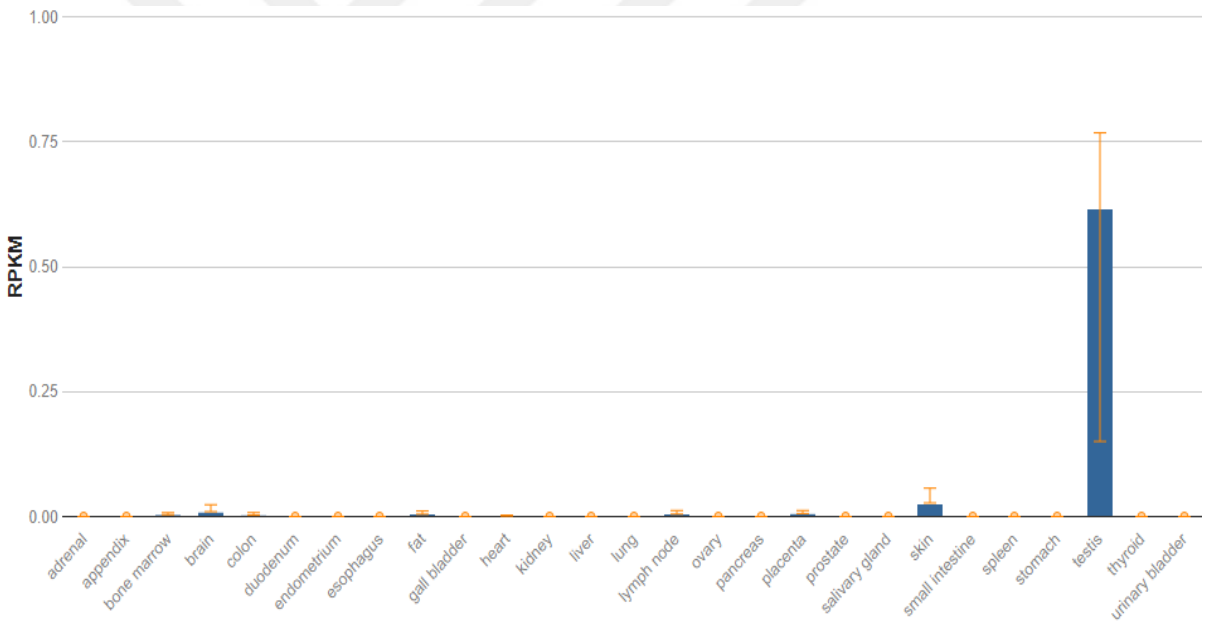
Grafik 5.5. FRG2DP geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

Toplam 3 olguda (19, 22, 24.olgular) 10q26.3 kromozom bölgesinde CYP2E1, SYCE1 (Synaptonemal Complex Central Element Protein 1), SCART1 genleri mevcut olup bu bölgede duplikasyon saptanmıştır. Grafik 5.6'da görüldüğü üzere SYCE1 geni ekspresyonu en yoğun olarak testisten ve sınırlı olarak sırasıyla plasenta, beyin ve prostattan gerçekleşmektedir (108). Bu bölge CLINVAR'da klinik olarak önemi belirlenememiş olarak sınıflandırılmış olup preeklampsi öyküsü ve normal doğum yapan olgularda saptanmıştır (106). Vries ve arkadaşları 2014 yılında prematür ovaryan yetmezlikli 2 kız kardeşte SYCE1 geninde nonsense homozigot mutasyon (Q205X) saptamıştır (109). Maor-Sagie ve arkadaşları 2015 yılında 2 İranlı erkek kardeşte SYCE1 geninde homozigot mutasyon saptamıştır ve spermatogenez hatası ile ilişkilendirmiştir (110). Huang ve arkadaşları non obstruktif azospermili 970 Çinli erkekte yapılan çalışmada 3 bireyde 134kb'lik delesyon saptamış ve non obstruktif azospermi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (111). Bu duplikasyonun saptandığı olguların hepsinin erkek olması ve 5-12 hafta kayıplarına sebep olması da spermatogenez kaynaklı anomalilere sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bu bölgedeki genler ve özellikle SYCE1 geni hem paternal faktör olabilir hem de maternal (oogenez) ve plasental kaynaklı gebelik kayıplarından sorumlu olabilirler.

Toplam 3 olguda (11, 15, 64. olgular) 22q11.23 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup en geniş CNV PIWIL3, TOP1P2, SGSM1, TMEM211 genlerini içermektedir. CLINVAR'da bu bölge açısından veri bulunmamaktadır Grafik 5.7'de görüldüğü üzere PIWIL3 geni ekspresyonu en yoğun olarak testisten ve az olarakta ciltten gerçekleşmektedir. Saptanan bu genler açısından literatürde yeterli bilgi saptanmamıştır. Bu duplikasyonun saptandığı olguların da ikisi erkek ve kayıpların 7-28 hafta arası olması da spermatogenez kusurlarını ve anöploidiyi düşündürmektedir. Bu bölgedeki genler de paternal faktör olabilir.



Grafik 5.6. SYCE1 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



Grafik 5.7. PIWIL3 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

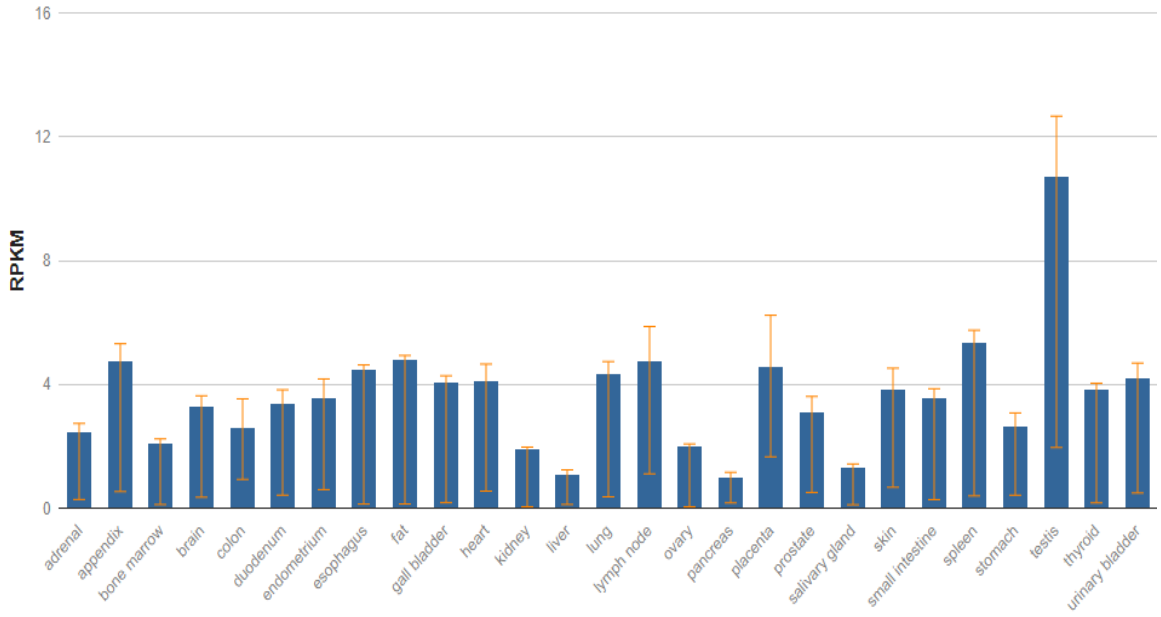
İki olguda(4,17. olgular) 6p25.3 kromozom bölgesinde DUSP22 (Dual-Specificity Phosphatase 22) geni mevcut olup bu bölgede heterozigot delesyon saptanmıştır. Bu bölge CLINVAR'da benign olarak değerlendirilmiştir. Grafik 5.8 'de görüldüğü üzere DUSP22 geni ekspresyonu en yoğun olarak testisten gerçekleşmekle birlikte diğer dokularda da eksprese edilmektedir. Bu duplikasyon sadece kadın hastalarımızda saptanmış olup bu genin plasenta,

endometrium, tiroid ve lenf nodu gibi çeşitli dokularda eksprese olması maternal faktör olarak anlamlı olabileceğini düşündürmektedir.

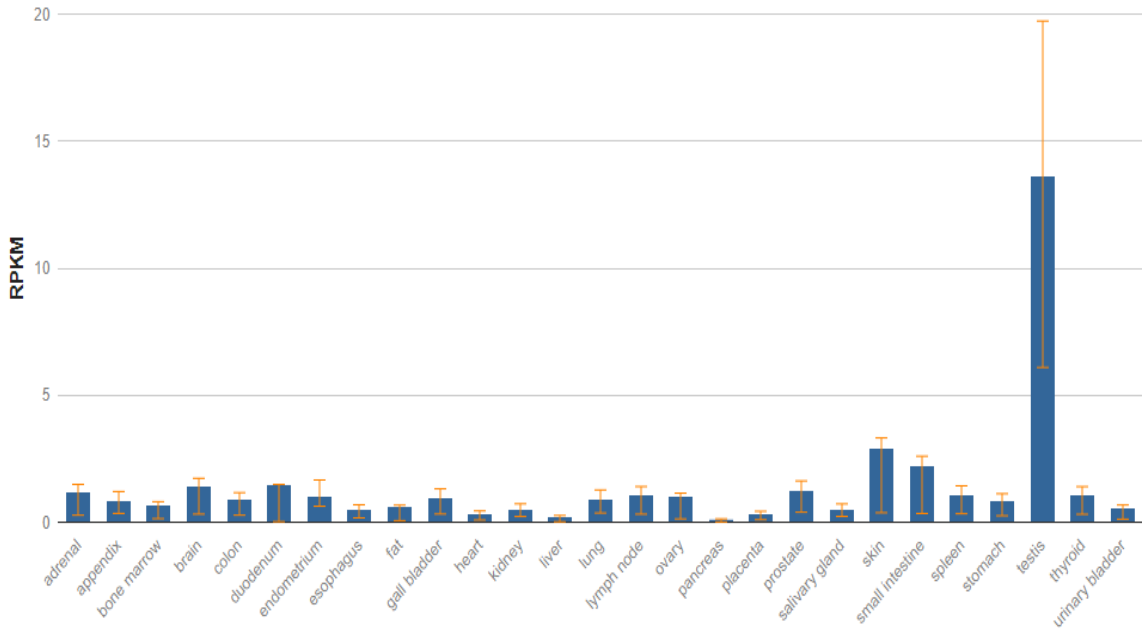
2 olguda (46, 52. olgular) 7q11.23 kromozom bölgesinde UPK3B, POMZP3, LOC100133091 geni mevcut olup bu bölgede heterozigot delesyon saptanmıştır. POMZP3, LOC100133091 genleri yoğun olarak testiste eksprese edilmekle birlikte POMZP3 overlerde de eksprese olmakta ve Zona pellucidanın yapısındaki temel proteinlerden birini oluşturmaktadır. UPK3B geni de urogenital epitelde ve endometriumda eksprese olmaktadır. Bu delesyon bir kadın ve bir erkek olguda saptanmış olup abortus etiyolojisinde her iki cinsiyet için önemli bir aday bölge olabilir. Bu delesyonu taşıyan olguların gebelik kayıpları 4-9 hafta arasında olup endometrial faktör kadar kromozom anomalileri de söz konusu olabilir. Kadınlarda POMZP3 ün kalıtılmış mutasyonları dispermi ve triploidi olasılığını arttırmaktadır. Bu bölge CLINVAR'da likely benign/benign olarak değerlendirilmiş olmakla birlikte yarık damak ve gelişme geriliği olan hastalarda da bildirilmiştir.

İki olguda (32, 63. olgular) 10q11.22 kromozom bölgesinde GPRIN2, NPY4R, ANXA8 genleri mevcut olup bu bölgede heterozigot delesyon saptanmıştır. Bu bölge CLINVAR'da önemi belirlenememiş/likely patojenik olarak değerlendirilmiştir.

İki olguda (3, 50. olgular) 15q15.3 kromozom bölgesinde CATSPER2 (Cation Channel Sperm Associated 2) geni mevcut olup heterozigot delesyon saptanmıştır. Bu bölge CLINVAR'da likely benign/benign olarak değerlendirilmiştir. Bu bölge için artmış nuchal translusens, prematür doğum, yarık damak dudak ve gelişme geriliği olan hastalarda da saptanmıştır. Bu gen yoğun olarak testiste eksprese edilmektedir (Grafik 5.9) ve spermatogenezde etkilidir. Delesyon saptanan iki olgudan birisi erkek olup bu delesyon özellikle paternal kaynaklı anöploidiler yoluyla tekrarlayan gebelik kayıplarına sebep olabilir.



Grafik 5.8. DUSP22 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



Grafik 5.9. CATSPER2 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

Avidan ve arkadaşları 2003 yılında 3 erkek kardeşte CATSPER2 geninde 70kb lik delesyon saptamış ve bu durumu nonsendromik erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (112). Hoppman ve arkadaşları 2013 yılında bildirilen çalışmada bu genin heterozigot delesyonunu %1 sıklıkta bulmuş olup bir

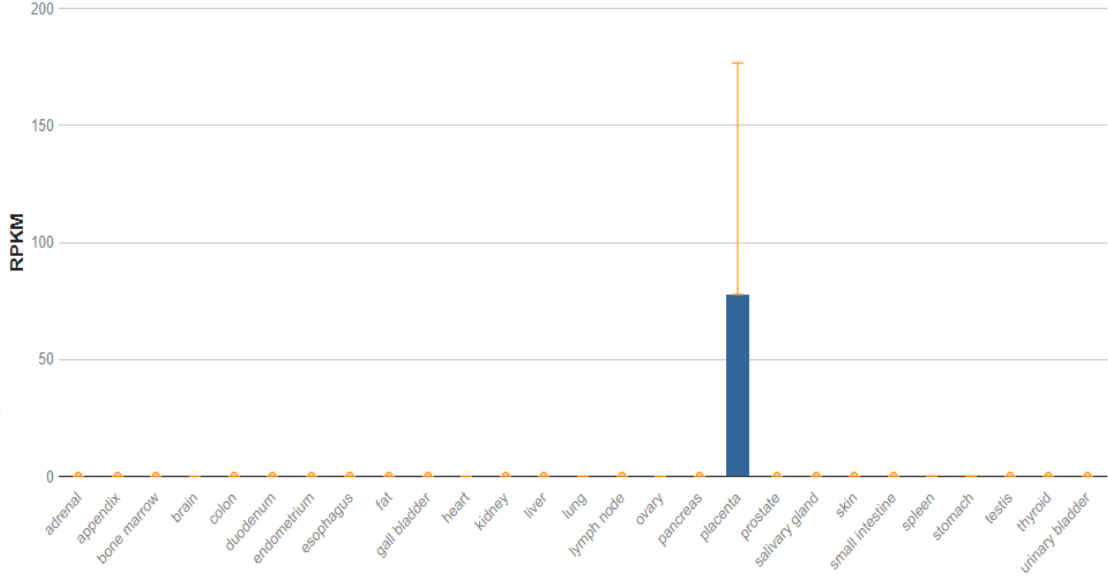
hastalarında bu bölgenin homozigot delesyonunu saptayıp bu bölge delesyonunu işitme kaybı ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (113). Jaiswal ve arkadaşları 2014 yılında infertil 2 erkek kardeşte bu genin delesyonunu vaka şeklinde bildirmişlerdir (114).

2 olguda (31, 32. olgular) 19q13.2-q13.31 kromozom bölgesinde PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4 geni mevcut olup bu bölgede duplikasyon saptanmıştır. Bu bölge CLINVAR'da likely benign/benign olarak değerlendirilmiştir. Bu bölgedeki genler plasentada eksprese edilmektedir (Grafik 5.10). Arnold ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yaptıkları çalışmada PSG11 ile tekrarlayan gebelik kaybı riski arasında ilişkiyi bildirilmiştir (115). Bizim çalışmamızda bu bölgede delesyon saptanan iki olgu karı kocadır.

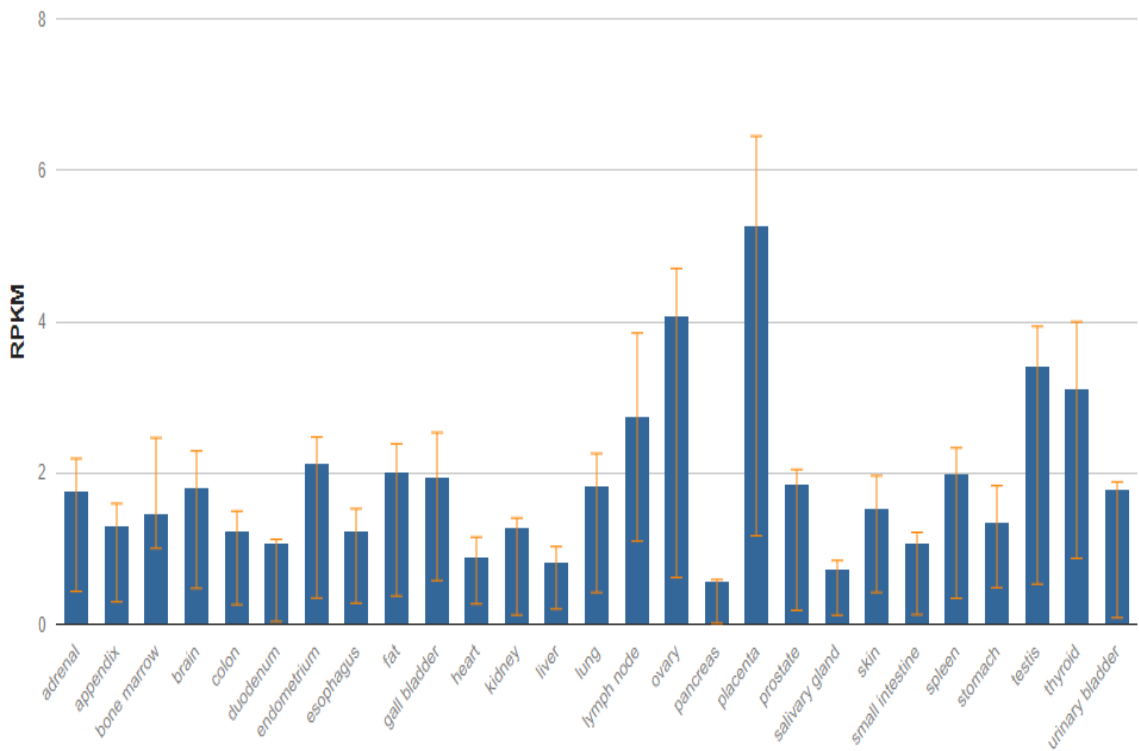
İki olguda (15, 64. olgular) 8q24.13 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge FER1L6, FER1L6-AS1, FER1L6-AS2 genlerini içermektedir. Bu genlerden FER1L6, FER1L6-AS1 yoğun olarak testiste eksprese edilmekle birlikte 2. sırada midede eksprese edilmektedir. FER1L6-AS2 ise yoğun olarak midede eksprese edilirken 2. sırada testisten eksprese edilmektedir. Ledig ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları çalışmada, FER1L6 geninin folikülogenezis ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (116). Olgularımızdan birinin kadın diğeri erkek olması bu bölgenin hem maternal hem paternal olarak önemli bir faktör olabileceğini desteklemektedir.

4p16.3 kromozom bölgesinde ZNF595, ZNF718 genleri mevcut olup bu bölgede bir olguda (21.olgu) heterozigot delesyon, 1 olguda (33.olgu) ise duplikasyon saptanmıştır. Bu bölge CLINVAR'da klinik olarak önemi belirlenememiş / likely benign olup normal doğum yapan olgularda, gelişim geriliği olan olgularda saptanmıştır. Her iki gen dokularda yaygın olarak eksprese edilmekle birlikte ZNF595 yoğun olarak plasentada (Grafik 5.11) eksprese edilirken ZNF718 ise yoğun olarak tiroid dokusundan eksprese edilmektedir. ZNF595 plasental kaynaklı abortuslarla ilişkili olabilirken ZNF718

ise hormonal sebepli abortuslara sebep olabilir. Bizim olgumuzun da kadın olması plasental kaynaklı maternal etiyolojide rol oynayabileceğini desteklemektedir.



Grafik 5.10. PSG11 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

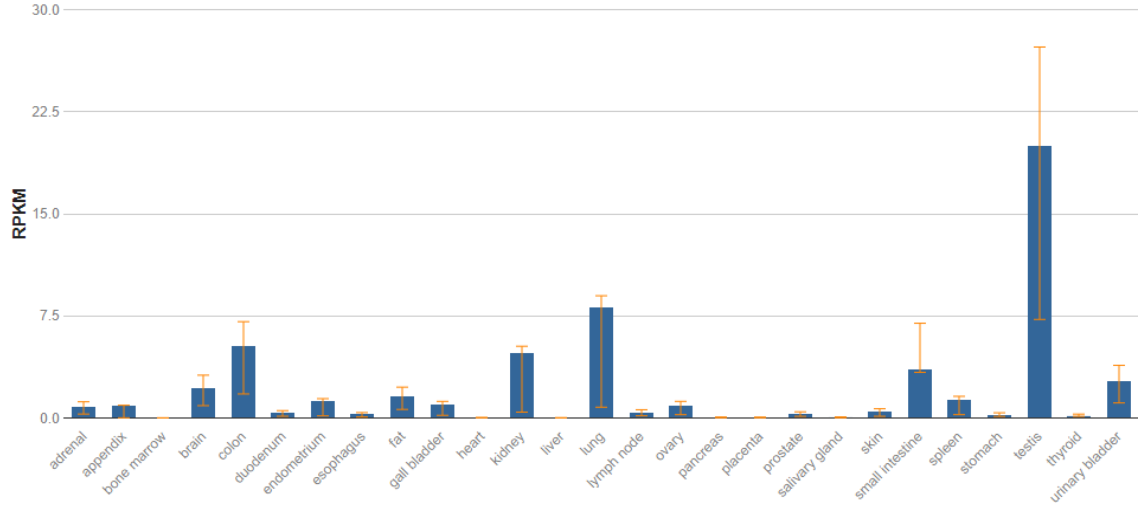


Grafik 5.11. ZNF595 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

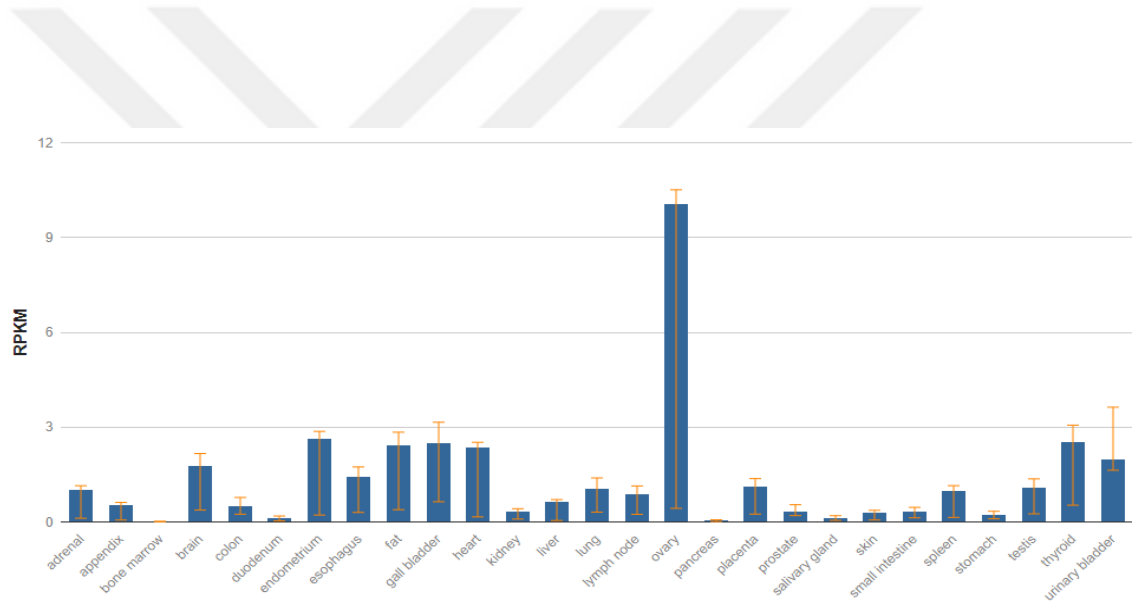
Bir olguda (37.olgu) 7q31.1 kromozom bölgesinde IMMP2L (İnner Mitochondrial Membrane Peptidase Subunit 2) geni mevcut olup bu bölgede heterozigot delesyon saptanmıştır. Bu bölge CLINVAR'da klinik olarak önemi belirlenememiş / likely benign olarak değerlendirilmiş olup prematür ovaryan yetmezliği veya gelişim geriliği olan olgularda saptanmıştır. Stigliani ve arkadaşları 2013 yılında yayınladıkları makalede IMMP2L geninin folikülogenezis ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda erkek bir olguda delesyonu saptanan bu genin testiste de eksprese oluyor olması paternal faktör olarak rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Bir olguda 2q31.1 (31.olgu) kromozom bölgesinde HAGLR, HAGLROS genleri mevcut olup bu bölgede heterozigot delesyon saptanmıştır. Grafik 5.12'de görüldüğü üzere HAGLR geni yoğun olarak testiste eksprese edilmekle birlikte over ve endometriumda da eksprese olmaktadır. HAGLROS geni sırasıyla kolon, testis ve böbrekte, az miktarda da olsa over ve uterusda eksprese edilmektedir. Bu genler açısından literatürde gebelik kaybı ile ilişkili veri mevcut değildir. Bizim olgumuz kadın olmakla birlikte bu genler hem maternal hem de paternal faktör olarak abortus etiyolojisinde rol oynayabilir.

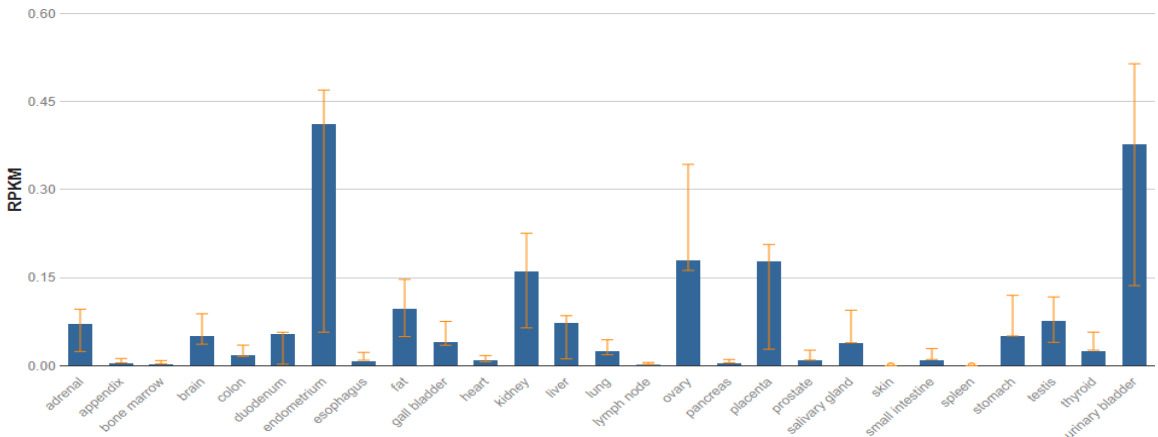
Bir olguda (57.olgu) 8q23.1 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge ZFPM2, ZFPM2-AS1 genlerini içermektedir. Bu bölge CLINVAR'da klinik önemi belirlenemeyen olarak değerlendirilmiştir. ZFPM2 geni yoğun olarak overden eksprese edilirken ZFPM2-AS1 geni ise yoğun olarak endometrium ve mesaneden eksprese edilmektedir (Grafik 5.13-14). Bu genler ile gebelik kaybı arasında ilişki şu ana kadar bildirilmemiştir. Bu bölgedeki genlerin over ve endometriumdan eksprese olması, duplikasyon saptadığımız olgunun da kadın olması, maternal faktör olabileceğini desteklemektedir.



Grafik 5.12. HAGLR geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



Grafik 5.13. ZFPM2 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



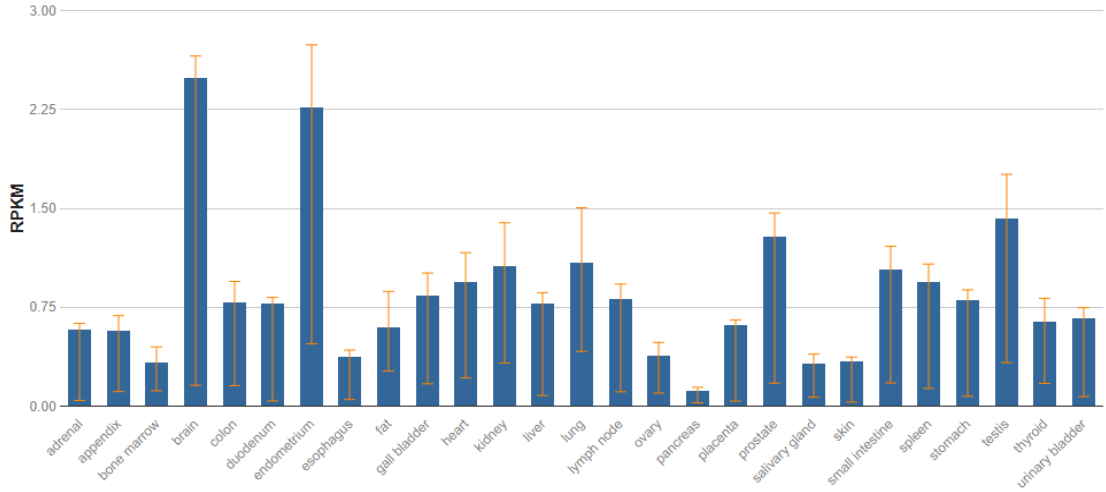
Grafik 5.14. ZFPM2-AS1 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

Bir olguda (2. olgu) saptanan 1p36.22-p36.21 kromozom bölgesindeki heterozigot delesyon TNFRSF8, TNFRSF1B, DHRS3, MIR7846, MIR4632, VPS13D, SNORA59A, SNORA59B, MIR6730, AADACL4, AADACL3, C1orf158, PRAMEF12, PRAMEF1, PRAMEF11, HNRNPCL1, HNRNPCL3, HNRNPCL4 genlerini içermektedir. CLINVAR'da bu bölge açısından incelediğimiz zaman gelişme geriliği açısından bu bölge üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu bölge likely patojenik olarak değerlendirilmiştir.

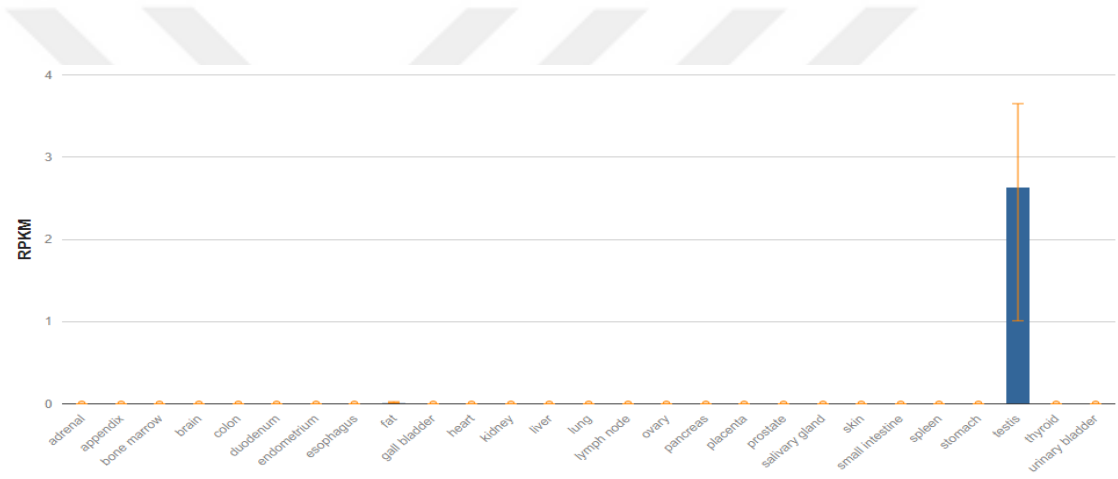
Bir olguda (7.olgu) 2p12 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge CTNNA2 genini içermektedir. Bu bölge CLINVAR da likely benign olarak değerlendirilmiştir. Bu gen açısından gebelik kaybı ile ilişkili literatürde veri mevcut değildir.

Bir olguda (7.olgu) 6q25.3 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge TMEM242, ZDHHC14, MIR3692 genini içermektedir. Bu bölge CLINVAR'da benign olarak değerlendirilmiş olup üst dudak yarığı olan hastalarda paternal olarak saptanmıştır. Grafik 5.15'te görüldüğü üzere ZDHHC14 geni yoğun olarak beyin ve endometriumda eksprese edilmektedir. Bu genin endometriumda eksprese olması, olgumuzun da kadın olması abortus etiolojisinde maternal faktör olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

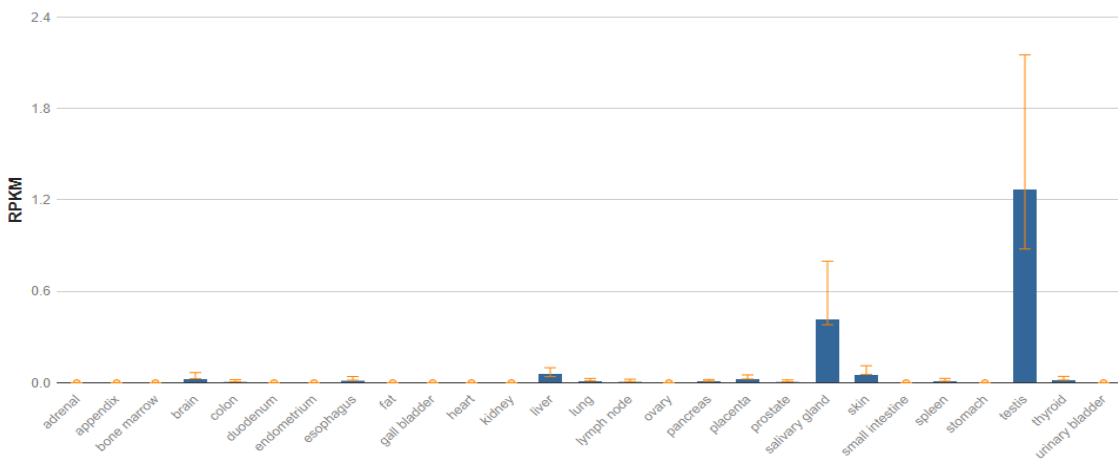
Bir olguda (13.olgu) 17p11.2-p11.1 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge FAM27E5, FLJ36000, MTRNR2L1 genlerini içermektedir. Bu bölge CLINVAR'da likely benign/benign olarak değerlendirilmiştir. Grafik 5.16'da görüldüğü üzere FLJ36000 geni yoğun olarak testiste eksprese edilmektedir. Bu genler açısından literatürde yeterince veri bulunmamaktadır. FAM27E5, geni yoğun olarak testis ve servikte eksprese edilmektedir. Olgumuzun erkek olması paternal faktör olarak abortus etiolojisinde rol oynayabileceğini desteklemektedir. Servikte de eksprese olması servikal kaynaklı abortuslarda da rol oynayabileceğini düşündürmektedir.



Grafik 5.15. ZDHC14 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



Grafik 5.16. FLJ36000 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)



Grafik 5.17. LINC01208 geni dokulara göre ekspresyon düzeyi grafiği (107)

Bir olgu (15. Olgu) 3q26.32 kromozom bölgesinde duplikasyon saptanmış olup bu bölge MIR7977, LINC01208 genlerini içermektedir. Bu bölge açısından yeterince bilgi olmamakla birlikte LINC01208 geni yoğun olarak testiste ekprese edilmektedir (Grafik 5.17). Olgumuzun da erkek olması paternal faktör olarak abortus etiyolojisinde rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Bir olguda (20.olgu) 22q11.21 kromozom bölgesinde DGCR6, GGT3P, DGCR5 genleri mevcut olup bu bölgede heterozigot delesyon saptanmıştır Bu bölge CLINVAR'da klinik olarak önemi belirlenememiş olup normal doğum yapan olgularda saptanmıştır (106).GGT3P geni tiroidle ilgili olup hormonal sebepli TGK sebep olabilir.

8p23.1 kromozom bölgesindeki duplikasyon (FAM86B2 FAM66A, DEFB109P1, FAM90A25P, LOC100506990, LOC729732 genlerini içermektedir.), 8p23.1 kromozom bölgesindeki duplikasyon (GATA4, FDFT1, CTSB, SNORA99, C8orf49, NEIL2 genlerini içermektedir.), 7q35 kromozom bölgesindeki delesyon (CNTNAP2 genini içermektedir.), 8q21.13 1 kromozom bölgesindeki delesyon (MRPS28, TPD52, MIR5708 genleri içermektedir.), 12q24.32 kromozom bölgesindeki duplikasyon (LOC101927637, LOC105370068 genleri içermektedir.) ile ilgili literatürde bilgi bulunamadı.

CNV saptanan genlerin DGV veritabanındaki toplum oranları ile karşılaştırılması yapılırken 2 ve daha fazla olguda saptanan genler değerlendirilmiş ve LINC01237, LOC102723927, ZRANB2-AS, LINC01566, NEGR1, FRG2DP, CYP2E1, DUSP22, CATSPER2 genleri DGV ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan UPK3B, POMZP3, PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4 genlerinin farklı bulunmaması DGV veritabanındaki olguların seçiminden kaynaklanıyor olabilir, bu genleri içeren CNV ler için fertil sağlıklı kontrol gurupları ile çalışma yapılması gereklidir.

Fonksiyonları bilinmeyen genler hakkında dokulardaki ekspresyon düzeyleri önemli bir ipucu olmakla birlikte tüm RNA ların sekanslandığı

çalışmalarda numune sayısının kısıtlı olması (107) ayrıca over ve endometriumda gen ekspresyonlarının fertil dönemde siklik özellik göstermesi, puberte öncesi ve menapoz sonrası dönemde de ekspresyonların değişebiliyor olması değerlendirmeyi güçleştirmektedir. Literatürde over ve endometriumda hiç eksprese olmuyor veya az eksprese oluyor şeklinde bildirilen genlerin de aslında gerek yaşamsal gerekse menstruel siklus içinde numune alınandan farklı dönemlerde eksprese olabilecekleri göz önünde bulundurulmalı ve iyi sečilmiř (fertil, abortusları olmayan, reproduktif dönemde) sağlıklı kadınların over ve uterus dokularında siklusun farklı dönemlerinde ekspresyonlarının nasıl değiştiği araştırılmalıdır.

Erkek olgularda saptadığımız CNV'lerin içerdikleri genlerin büyük çoğunlukla sadece testisten eksprese olan genler olması; kadın olgularda saptadığımız CNV'lerin içerdeği genlerin ise sıklıkla plasenta, endometrium, tiroid ve lenf nodu gibi dokulardan eksprese oluyor olması, aCGH yöntemiyle saptanan CNV'lerin abortus etiyolojisini saptamada diagnostik ve yönlendirici bir yöntem olabileceğine işaret etmekle birlikte bu konuda, daha büyük hasta grupları ve iyi sečilmiř fertil kontrol grupları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gen içermeyen CNV'lerinde interkromozomal etki ile gametogenezi bozabildiği göz önüne alınırsa trombofili yanında aCGH ile CNV analizi, TKG ailelerinde olgularının eşleriyle birlikte analiz edilmesi durumunda %74'üne tanı konulabilmesini sağlayarak sebebi bilinmeyen oranını %50'den %26'ya indirmektedir. Olguların çift olarak değil de bireysel olarak analiz edilmesi durumunda %62'sine tanı konabilmiş ve idiopatik grup %38'e azalmıştır.

Çalışmamızda saptanan gen içeren CNV lerin maternal ya da paternal faktör olma potansiyelleri tabloda sunulmuştur. CATSPER2, LINCO1208, FAM27E5, FLJ36000, IMMP2L, PIWIL3, SYCE1, FRG2DP, TP53TG3HP,ZRNAB2-AS2 ve LINCO1566 muhtemel paternal faktör olarak öne çıkarken, UPK3B, POMZP3, PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4, ZNF595, ZNF718, ZFPM2, ZFPM2-AS1, ZDHHC14, HAGLR, HAGLROS, LINC01237, LOC102723927, DUSP22 ve GGT3P genleri muhtemel maternal faktörler olarak görölmektedir. Bu genlerin ekspresyonlarını

değiştirecek tedaviler gelecekte tekrarlayan düşüklerin tedavisinde ümit verici olabilir. Örneğin heterozigot delesyon saptanan bir olguda ilgili genin ekspresyonunu arttıracak ilaçlar, ya da duplikasyon saptandığında ilgi genin ekspresyonunu azaltacak ilaçlar TGK tedavisinde çığır açabilir. TGK ile ilişkili CNV lerin daha büyük hasta ve sağlıklı kontrol serileri ile araştırılması ve etiyolojide rol oynayabilecek genlerin ekspresyonlarını etkileyecek faktörlerin bulunmasının ardından TGK olgularında rutin kullanım için sadece belli hedef genlere yönelik daha düşük maliyetli CNV test panelleri geliştirilebilir. Bizim hasta grubumuzda saptanan CNV'lerin prognostik önemini saptamak amacıyla canlı çocuk sahibi olup olmadıkları tabloda belirtilmiştir. Sonraki çalışmalarda canlı çocuğu olan olguların kullandıkları ilaçların, besin desteklerinin ve yaşam tarzlarında canlı çocuğu olmayan olgulara göre bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi bu genlerin ekspresyonlarını etkileyen faktörlere ve gelecekteki tedavi seçeneklerine ışık tutabilir.

Tablo 5.1. CNV lerin prognostik faktör olarak değerlendirilmesi

CNV Bölgesi	Genler	Maternal	Paternal	Canlı çocuk
2q37.3	LINC01237, LOC102723927	+	-	4 erkek, 4 kadın olmak üzere 1 erkeğin, 2 kadının canlı çocuğu mevcuttur.
1p31.1	ZRNAB2-AS2	-	+	3 erkek, 1 kadın olmak üzere 1 erkeğin canlı çocuğu mevcuttur
16p11.2-p11.1	LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP	-	+	2 erkek 2 kadın olmak üzere 1 erkeğin canlı çocuğu mevcuttur
10q26.3	SYCE1	+	+	3 erkek olmak üzere hepsinin canlı çocuğu mevcuttur
22q11.23	PIWIL3	-	+	3 erkek 1 erkeğin canlı çocuğu mevcut
6p25.3	DUSP22	+	-	2 kadın olmak üzere hiçbirinin canlı çocuk yoktur
7q11.23	UPK3B, POMZP3, LOC100133091	+	-	1 erkek 1kadın olmak üzere 1 kadının canlı çocuğu mevcuttur
15q15.3	CATSPER2	-	+	1 erkek 1kadın olmak üzere hiçbirinin canlı çocuğu yoktur
19q13.2-q13.31	PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4	+	-	1 kadın 1 erkek çift olmak üzere canlı çocukları vardır
8q24.13	FER1L6	+	+	2 erkek olmak üzere 1 erkeğin canlı çocuğu vardır
4p16.3	ZNF595, ZNF718	+	-	2 kadın olmak üzere 1 kadının canlı çocuğu vardır
7q31.1	IMMP2L	+	+	1 erkek canlı çocuk yoktur
2q31.1	HAGLR, HAGLROS	+	+	1 kadın canlı çocuk vardır
8q23.1	ZFPM2, ZFPM2-AS1	+	-	1 kadın canlı çocuk yoktur
6q25.3	ZDHHC14	+	-	1 kadın canlı çocuk vardır
17p11.2-p11.1	FLJ36000	-	+	1 erkek canlı çocuk vardır
17p11.2-p11.1	FAM27E5	+	+	1 erkek canlı çocuk vardır
3q26.32	LINC01208	-	+	1 erkek canlı çocuk vardır
22q11.21	GGT3P	+	-	1 kadın canlı çocuk vardır

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

TGK olan toplam 64 olgunun aCGH analizlerinde, 40 olguda kopya sayısı değişimleri saptanmıştır. Saptanan CNV'lerin değerlendirilmesinde DGV veri tabanı kontrol popülasyonu olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda tespit edilen CNV'leri multipleks ligasyon-bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA), metafaz FISH ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) kullanılarak doğrulama çalışmaları yapılmasına ihtiyaç vardır.

Ülkemizde TGK konusunda araştırmaların yaygınlaştırılması ve artırılması, genetik etiolojinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Bunun yanı sıra aynı zamanda kromozom anomalilerinin, CNV'lerin ve tek gen hastalıklarının tespit edilmesini; böylelikle daha doğru genetik danışmanlık verilebilmesini mümkün kılacaktır.

Gen içermeyen CNV'lerinde interkromozomal etki ile gametogenezi bozabildiği göz önüne alınırsa trombofili yanında aCGH ile CNV analizi, TGK ailelerinde olgularının eşleriyle birlikte analiz edilmesi durumunda %74'üne tanı konulabilmesini sağlayarak sebebi bilinmeyen oranını %50'den %26'ya indirmektedir. Olguların çift olarak değil de bireysel olarak analiz edilmesi durumunda %62'sine tanı konabilmiş ve idiopatik grup %38'e azalmıştır.

TGK'nın genetik zeminin belirlenmesine yönelik çalışmalar tanının erken konulmasına, dolayısıyla çocuk sahibi olma ve bu dönemde geçirilecek uzun zaman dönemine yönelik olarak bir sonraki gebeliğin erken dönemde planlanmasına katkıda bulunacaktır. Bu nedenle herhangi bir değişiklik saptanmayan olgularda mevcut fenotipin genetik zeminin araştırılması için çalışmanın devamı olarak CNV'ye neden olmayan ancak pozisyon etkisine bağlı olarak etkili olabilen varsa inversiyon kaynaklı anomalilerin belirlenebilmesi amacıyla TGK olan bireylerde ve daha geniş olgu gruplarında daha yüksek rezolüsyonlu genomik tarama, yeni nesil dizileme ve ekspresyon analizlerinden yararlanılması gerektiği düşüncesindeyiz. Bu çalışmalar, TGK etiolojisinde genetik katkının oranını ve görülme sıklığının belirlenmesi açısından katkı sağlayacaktır.

Özetle, TKG olgulara ait mevcut retrospektif aCGH genotip sonuçlarının tekrarlayan gebelik kayıplarının moleküler etiyolojik sebepleri açısından değerlendirildiğinde;

1. TKG olan olgulara yönelik literatürde çok fazla aCGH çalışması bulunmamaktadır.
2. TKG ailelerinde olgularının eşleriyle birlikte analiz edilmesi durumunda %74'üne tanı konulabilmesini sağlayarak sebebi bilinmeyen oranını %50'den %26'ya indirmektedir.
3. Olguların çift olarak değil de bireysel olarak analiz edilmesi durumunda %62'sine tanı konabilmiş ve idiopatik grup %38'e azalmıştır.
4. Çalışmamızda saptanan CNV'lerin genellikle 100-500kb arasında olduğu, 10 kb altında ve 2mb üstünde hiç CNV saptanmadığı görülmüştür.
5. TKG olan olguların CNV değerlendirilmesinde 2-3 gebelik kaybı olması yeterlidir, 4 ve üzeri gebelik kayıplarını beklemek anlamlı bir katkı sağlamamıştır.
6. Bu araştırmada CATSPER2, LINCO1208, FAM27E5, FLJ36000, IMMP2L, PIWIL3, SYCE1, FRG2DP, TP53TG3HP, ZRNAB2-AS2 ve LINCO1566 muhtemel paternal faktör olarak öne çıkmıştır.
7. Ayrıca UPK3B, POMZP3, PSG8, PSG1, PSG6, PSG7, PSG11, PSG2, PSG5, PSG4, ZNF595, ZNF718, ZFPM2, ZFPM2-AS1, ZDHHC14, HAGLR, HAGLROS, LINC01237, LOC102723927, DUSP22 ve GGT3P genleri TKG etiyolojisinde etkili muhtemel maternal faktörler olarak bir adım daha öne çıktıkları ortaya konmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Organization WH. Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. 1977;247–253.
2. Rosenfeld JA, Tucker ME, Escobar LF, Neill NJ, Torchia BS, McDaniel LD, Schultz RA, Chong K, Chitayat D. Diagnostic utility of microarray testing in pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(4):478–486.
3. Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol.* 2008;51(1):84–95.
4. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Philipp T, Somerville MJ, Stephenson MD. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2010;25(11):2913–2922.
5. Ostojić S, Pereza N, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: Contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60(2):111–117.
6. Rajcan-Separovic E. Chromosome microarrays in human reproduction. *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):555–567.
7. Kasak L, Rull K, Söber S, Laan M. Copy number variation profile in the placental and parental genomes of recurrent pregnancy loss families. *Sci Rep.* 2017;7:45327.
8. Stein CK. Applications of Cytogenetics in modern pathology. Twenty Thi. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 23rd. Elsevier Inc.; 2017. 1337-1359.

9. Uysal A, Uludağ A, Silan F, Erçelen N, Zafer C, Özdemir Ö. Double translocation: an interesting family history. *Balk J Med Genet.* 2013;16(1):77–80.
10. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics* 3. Third edition. Garland Science; 2004.
11. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Århus, Denmark. *Hum Genet.* 1991;87(1):81–83.
12. What is a chromosome disorder? | Facts | yourgenome.org [Online].
Erişim:[<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-chromosome-disorder>]
Erişim Tarihi: 07.01.2018
13. Nussbaum, Robert L; McInnes, Roderick R; Huntington FW. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. Eighth edition. Elsevier. 2016.
14. Turnpenny PD, Ellard S, Emery AEH. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 12th edition. Elsevier; 2005.
15. Kochhar PK, Ghosh P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. *J Obstet Gynaecol Res.* Wiley Online Library; 2013;39(1):113–120.
16. Gardner RJMK, Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Third edition. Oxford University Press; 2003.
17. Raby BA (2017). *Basic Principles of Genetic Disease* [Online].
Erişim:[<https://www.uptodate.com/contents/basic-principles-of-genetic-disease>]
Erişim Tarihi: 07.01.2018
18. Raby BA(2017). *Inheritance Patterns of Monogenic Disorders (Mendelian and non-Mendelian)* [Online].
Erişim:[<https://www.uptodate.com/contents/inheritance-patterns-of->

19. Keyhan S, Muasher L, Muasher SJ. Spontaneous Abortion and Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, Treatment. In: Comprehensive Gynecology. Seventh Ed. Elsevier; 2016. 329–347.
20. Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. *Postgrad Med J*. 2015;91(1073):151–62.
21. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: A population-based prospective study. *Fertil Steril*. 2003;79(3):577–584.
22. Vaiman D. Genetic regulation of recurrent spontaneous abortion in humans. *Biomed J*. 2015;38(1):11–24.
23. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006;368(9535):601–11.
24. Ohno M, Maeda T, Matsunobu A. A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Obstet Gynecol*. 1991;77(3):394–398.
25. Jacobs PA, Hassold TJ. The Origin of Numerical Chromosome Abnormalities. *Adv Genet*. 1995;33(C):101–133.
26. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *Br Med J*. 1989;299(6698):541–545.
27. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*. 2009;2(2):76–83.
28. Borrell A, Stergiotou I. Miscarriage in contemporary maternal-fetal medicine: Targeting clinical dilemmas. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;42(5):491–497.
29. Frikha R, Bouayed NA, Rebai T. Prévalence des anomalies

- cytogénétiques parentales au cours de l'avortement spontané récurrent: à propos de 168 couples. *Immuno-analyse Biol Spécialisée*. 2012;27(5):223–232.
30. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*. 2000;73(2):300–304.
 31. Van Oppenraaij RHF, Jauniaux E, Christiansen OB, Horcujadas JA, Farquharson RG, Exalto N. Predicting adverse obstetric outcome after early pregnancy events and complications: A review. *Hum Reprod Update*. 2009;15(4):409–421.
 32. Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS, Varming K. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;66(4):257–267.
 33. Stephenson MD, Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50(1):132–145.
 34. Allison JL, Schust DJ. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(6):446–450.
 35. Li M, Huang SJ. Innate immunity, coagulation and placenta-related adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res*. 2009;124(6):656–662.
 36. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012;27(10):2908–17.
 37. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(3):a023119:1-18.
 38. Arias-Sosa LA, Acosta ID, Lucena-Quevedo E, Moreno-Ortiz H, Esteban-Pérez C, Forero-Castro M. Genetic and epigenetic variations associated

- with idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2018;1–12.
39. Jevé YB, Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci.* 2014;7(3):159.
 40. Kacprzak M, Chrzanowska M, Skoczylas B, Moczulska H, Borowiec M, Sieroszewski P. Genetic causes of recurrent miscarriages. *Ginekol Pol. Poland;* 2016;87(10):722–726.
 41. Pereza N, Ostojić S, Kapović M, Peterlin B. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 2017;107(1):150–159.
 42. Christiansen OB, Mathiesen O, Lauritsen JG, Grunnet N. Idiopathic recurrent spontaneous abortion. Evidence of a familial predisposition. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1990;69(7–8):597–601.
 43. El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet P-E. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health. New Zealand;* 2017;9:331–345.
 44. Kalousek DK. The effect of confined placental mosaicism on development of the human aneuploid conceptus. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1993;29(1):39–51.
 45. Dasgupta S, Meka A, Reddy BM. Genetic factors influencing recurrent pregnancy loss: lessons learnt from recent studies. *Expert Rev Obstet Gynecol.* 2012;7(4):363–378.
 46. Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, Fujita T, Kawaguchi R, Maruyama T, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Saito S. Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J Hum Genet.* 2008;53(7):622–628.
 47. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I, Degn B, Pedersen B, Sunde L, Nielsen

- FC, Christiansen OB. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(6):379–385.
48. Page JM, Silver RM. Genetic Causes of Recurrent Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol*. United States; 2016 Sep;59(3):498–508.
49. Porter TF, Scott JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2005;19(1):85–101.
50. Ware BD, Mark G, M. SR. Recurrent Miscarriage. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1740–1747.
51. Meza-Espinoza JP, Ortiz Anguiano L, Rivera H. Chromosomal abnormalities in couples with reproductive disorders. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;66(4):237–240.
52. Byrne JL, Ward K. Genetic factors in recurrent abortion. *Clin Obstet Gynecol*. 1994;37(3):693–704.
53. Richter HE, R. Edward Varner. Berek & Novak's Gynecology, 14th. Berek & Novak's Gynecology, 14th Edition. 2007. 469–480.
54. De Carolis C, Greco E, Guarino MD, Perricone C, Lago AD, Giacomelli R, Fontana L, Perricone R. Anti-thyroid Antibodies and Antiphospholipid Syndrome: Evidence of Reduced Fecundity and of Poor Pregnancy Outcome in Recurrent Spontaneous Aborters. *Am J Reprod Immunol*. 2004;52(4):263–266.
55. Sun L, Lv H, Wei W, Zhang D, Guan Y. Angiotensin-converting enzyme D/I and plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphisms are associated with increased risk of spontaneous abortions in polycystic ovarian syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(2):77–82.
56. Kaprara A, Krassas GE. Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Hormones*. 2008;7(4):294–302.

57. Gabbai D, Harlev A, Friger M, Steiner N, Sergienko R, Kreinin A, Bashiri A. Pregnancy outcomes among patients with recurrent pregnancy loss and uterine anatomic abnormalities. *J Perinat Med*. 2017;1–7.
58. Lin PC. Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health (Larchmt)*. 2004;13(1):33–39.
59. Tremellen KP, Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: Adenomyosis and macrophages. *J Reprod Immunol*. 2012;93(1):58–63.
60. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50(1):10–30.
61. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case–control study. *Hum Reprod*. 2004;19(7):1644–1656.
62. Mallhi RS, Kushwaha N, Chatterjee T, Philip J. Antiphospholipid syndrome: A diagnostic challenge. *Med journal, Armed Forces India*. 2016;72(1):31–36.
63. Wang NF, Kolte AM, Larsen EC, Nielsen HS, Christiansen OB. Immunologic abnormalities, treatments, and recurrent pregnancy loss: what is real and what is not? *Clin Obstet Gynecol*. LWW; 2016;59(3):509–523.
64. Grimstad F, Krieg S. Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. Springer; 2016;33(7):833–847.
65. Turki RF, Assidi M, Banni HA, Zahed HA, Karim S, Schulten H-J, Abu-Elmagd M, Rouzi AA, Bajouh O, Jamal HS, Al-Qahtani MH, Abuzenadah AM. Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia. *BMC Med Genet*. 2016;17(1):15–23.

66. Farahmand K, Totonchi M, Hashemi M, Reyhani Sabet F, Kalantari H, Gourabi H, Meybodi AH. Thrombophilic genes alterations as risk factor for recurrent pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med.* England; 2016;29(8):1269–1273.
67. Kamali M, Hantoushzadeh S, Borna S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Noori-Shadkam M, Haghighi F. Association between Thrombophilic Genes Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss Susceptibility in the Iranian Population: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran Biomed J.* 2018;22(2):78–89.
68. Greer IA. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb Res.* 2003;109(2):73–81.
69. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000;95(5):1517–1532.
70. Hwang KR, Choi YM, Kim JJ, Lee SK, Yang KM, Paik EC, Jeong HJ, Jun JK, Yoon SH, Hong MA. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Risk of Recurrent Pregnancy Loss: a Case-Control Study. *J Korean Med Sci.* 2017;32(12):2029–2034.
71. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2011;13(1):1–16.
72. Kashif S, Kashif MA, Saeed A. The association of factor V leiden mutation with recurrent pregnancy loss. *J Pak Med Assoc.* 2015;65(11):1169–1172.
73. Rink BD, Lockwood CJ. Recurrent Pregnancy Loss. *Creasy Resnik's Matern Med 7/e.* Seventh Ed. Elsevier Inc.; 2014;707–717.
74. Kujovich JL. Prothrombin-Related Thrombophilia. *GeneReviews.* 2014;1–128.
75. Gao H, Tao F. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thromb Res.* 2015;135(2):339–346.

76. Zuffardi O, Vetro A, Brady P, Vermeesch J. Array technology in prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011;16(2):94–98.
77. Dawson AJ, Yanofsky R, Vallente R, Bal S, Schroedter I, Liang L, Mai S. Array comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis in pediatric acute leukemias. *Curr Oncol. Multimed Inc.;* 2011;18(5):210–216.
78. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med. Mass Medical Soc;* 2012;367(23):2175–2184.
79. McNamee K, Dawood F, Farquharson RG. Evaluation of array comparative genomic hybridization in recurrent miscarriage. *Br J Hosp Med.* 2013;74(1):36–40.
80. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, MacArthur DG, MacDonald JR, Onyiah I, Pang AWC, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010;464(7289):704–712.
81. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Vooren SV, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009;84(4):524–533.
82. Koolen DA, Pfundt R, De Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB. Genomic microarrays in mental retardation:

- A practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009;30(3):283–292.
83. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749–764.
84. Ozdemir O, Yenicesu GI, Silan F, Köksal B, Atik S, Ozen F, Göl M, Cetin A. Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(4):279–286.
85. Silan F, Mosse I, Gonchar A, Sedlyar N, Kilchevsky A V, Yildiz O, Kuru B, Ozdemir O. Comparison of the thrombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: Results on combined gene effect of FV Leiden, FVR2, FXIII, MTHFR (A1298C and C677T), PAI-1 4G/5G and ACE I/D genes in RPL Women from Minsk/Belarus and Canakkale-Sivas/Turkey. *Biomed Genet Genomics.* 2016;1(4):87–93.
86. Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet.* 2012;3(34):1–13.
87. Parveen F, Faridi RM, Das V, Tripathi G, Agrawal S. Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women. *MHR Basic Sci Reprod Med.* 2009;16(3):207–214.
88. Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye

- T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kitaoka E, Sawada T, Nishiyama Y, Udagawa Y, Kurahashi H. Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet.* 2009;84(1):14–20.
89. Beydoun H, Saftlas AF. Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. *HLA.* 2005;65(2):123–135.
 90. Shi X, Xie X, Jia Y, Li S. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet.* 2017;91(2):265–284.
 91. Cui Y, Wang W, Dong N, Lou J, Srinivasan DK, Cheng W, Huang X, Liu M, Fang C, Peng J, Chen S, Wu S, Liu Z, Dong L, Zhou Y, Wu Q. Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature.* 2012;484(7393):246–250.
 92. van Dijk M, van Bezu J, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CBM, Lye SJ. The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by α -T-catenin upregulation. *Hum Mol Genet.* 2010;19(13):2658–2667.
 93. Mercier E, Lissalde-Lavigne G, Gris J-C. JAK2 V617F mutation in unexplained loss of first pregnancy. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1984–1995.
 94. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br J Haematol.* 2012;157(5):529–542.
 95. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJM, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, Catanese J, Young BA, Reitsma PH, Devlin JJ, Rosendaal FR. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *Jama.* 2008;299(11):1306–1314.
 96. Leader B, Lim H, Carabatsos MJ, Harrington A, Ecsedy J, Pellman D, Maas R, Leder P. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the

- meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 2002;4(12):921–928.
97. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa M V, Bozzo M, Mannucci PM. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med.* 2000;343(14):1015–1018.
98. Hobbs CA, Cleves MA, Lauer RM, Burns TL, James SJ. Preferential transmission of the MTHFR 677 T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am J Med Genet Part A.* 2002;113(1):9–14.
99. Reiner AP, Heckbert SR, Vos HL, Ariëns RAS, Lemaitre RN, Smith NL, Lumley T, Rea TD, Hindorff LA, Schellenbaum GD, Rosendaal FR, Siscovick DS, Psaty BM. Genetic variants of coagulation factor XIII, postmenopausal estrogen therapy, and risk of nonfatal myocardial infarction. *Blood.* 2003;102(1):25–30.
100. Maclean KN, Gaustadnes M, Oliveriusová J, Janošík M, Kraus E, Kožich V, Kery V, Skovby F, Rüdiger N, Ingerslev J, Stabler SP, Allen RH, Kraus JP. High homocysteine and thrombosis without connective tissue disorders are associated with a novel class of cystathionine β -synthase (CBS) mutations. *Hum Mutat.* 2002;19(6):641–655.
101. Qublan HS. Habitual abortion: causes, diagnosis, and treatment. *Rev Gynaecol Pract.* 2003;3(2):75–80.
102. Abu-Heija A. Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss: Is heparin still the drug of choice? *Sultan Qaboos Univ Med J. Sultan Qaboos University Medical Journal, College of Medicine & Health Sciences;* 2014;14(1):26–36.
103. Huchon C, Deffieux X, Beucher G, Capmas P, Carcopino X, Costedoat-Chalumeau N, Delabaere A, Gallot V, Iraola E, Lavoue V, Legendre G, Lejeune-Saada V, Leveque J, Nedellec S, Nizard J, Quibel T, Subtil D, Vialard F, Lemery D. Pregnancy loss: French clinical practice guidelines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. Ireland;* 2016;201:18–26.

104. Pfeifer S, Fritz M, Goldberg J, McClure RD, Thomas M, Widra E, Schattman G, Licht M, Collins J, Cedars M, Racowsk C, Davis O, Barnhart K, Gracia C, Catherino W, Rebar R, La Barbera A. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Am Soc Reprod Med Pages*. 2012;98(5):1103–1111.
105. Nagirnaja L, Palta P, Kasak L, Rull K, Christiansen OB, Nielsen HS, Steffensen R, Esko T, Remm M, Laan M. Structural Genomic Variation as Risk Factor for Idiopathic Recurrent Miscarriage. *Hum Mutat*. 2014;35(8):972–982.
106. Kasak L, Rull K, Vaas P, Teesalu P, Laan M. Extensive load of somatic CNVs in the human placenta. *Sci Rep*. 2015;5(8342):1–10.
107. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397–406.
108. Costa Y, Speed R, Öllinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Höög C, Benavente R, Cooke HJ. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci*. 2005;118(12):2755–2762.
109. de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(10):2129–2132.
110. Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmidt H, Zenvirt S,

- Laufer N, Richler C, Frumkin A. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(6):887–891.
111. Huang N, Wen Y, Guo X, Li Z, Dai J, Ni B, Yu J, Lin Y, Zhou W, Yao B, Jiang Y, Sha J, Conrad DF, Hu Z. A screen for genomic disorders of infertility identifies MAST2 duplications associated with nonobstructive azoospermia in humans. *Biol Reprod.* 2015;93(3):1–10.
112. Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattani D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D, Beckmann JS. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:497–502.
113. Hoppman N, Aypar U, Brodersen P, Brown N, Wilson J, Babovic-Vuksanovic D. Genetic testing for hearing loss in the United States should include deletion/duplication analysis for the deafness/infertility locus at 15q15.3. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):1–5.
114. Jaiswal D, Singh V, Dwivedi US, Trivedi S, Singh K. Chromosome microarray analysis: a case report of infertile brothers with CATSPER gene deletion. *Gene.* 2014;542(2):263–265.
115. Arnold LL, Doherty TM, Flor AW, Simon JA, Chou JY, Chan WY, Mansfield BC. Pregnancy-specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potential correlation to interleukin-10 expression. *Am J Reprod Immunol.* 1999;41(3):174–82.
116. Ledig S, Ropke A, Wieacker P. Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. *Sex Dev.* 2010;4(4–5):225–232.

8. ÖZGEÇMİŞ

ARŞ.GÖR.DR.ONUR YILDIZ

onuryildiz89@hotmail.com
oyildiz@comu.edu.tr

Mobil Tel: 0541 542 89 22
(0286) 2200202-2424/2412

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 17100- Çanakkale

Öğrenim

Tıp Eğitimi	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi-Konya
Uzmanlık Eğitimi	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-ÇANAKKALE

Görevler

Araştırma Görevlisi Doktor(2014- Devam Ediyor)	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-ÇANAKKALE
--	---

RUTİN HİZMETLER

2014-2018 yılları arasında tanı laboratuvarı olarak(Sitogenetik ve Moleküler) verdiği hizmetler

A- Sitogenetik	Adet	
Lenfosit Hücre Kültürü	2300	Karyotip – karyogram analiz
FISH	500	Metafaz ,interfaz analiz
B- Moleküler Genetik	Adet	
FMF	1000	Moleküler tanı
CVD	800	Tekrarlı düşük, PTE, SVH, Trombozis, Behçet Sendromu, DVT, MI, Atherosclerosis
Farmakogenetik	180	Warfarin, Coumadine, ve kompleks ilaç detoksifikasyon profil analizleri
Onkogenetik	80	Kras ,EGFR sekans ve Bcr-ABL RT-PCR ile
Prenatal Tanı (QF-PCR)	350	Kromozom 13,18,21,X ve Y STR fragment analizi
CFTR	175	Direkt sekanslama,
İmmunogenetik	800	B5,B27
MLPA	900	Mikrodelesyon subtelomerik kanser vs. panelleri
Diğer	760	Talasemi,TRAPS.CAPS.MVK,Frajil X ,HPV
C- Moleküler-Sitogenetik	Adet	
Array-CGH	300	Değerlendirme, raporlama
D- Poliklinik	Adet	

Poliklinik hasta sayısı	3000	Değerlendirme,takip
İLGİ ALANLARI - LABORATUVAR DENEYİMİ (ARAŞTIRMA ALANI)		
A-Sitogenetik A1- Lenfosit hücre kültürü ve kromozom analizi A2- Seks kromatin analizi A3- Manuel ve otomatik karyotip, karyogram analizler A4- GTG, C, NOR bantlama teknikleri A5- Mikronukleus, SCE analizleri ve geno – sitotoksisite B- Moleküler Sitogenetik B1- Direkt, indirekt hibridizasyon teknikleri, CGH ve FISH C- Moleküler Genetik C1- Elektroforetik teknikler (agaroz) C2- Western blot analiz C3- PCR, Multiplex PCR, Nested PCR teknikleri C4- RSM, RFLP mutasyon ve polimorfizm taramaları C5- Genomik DNA izolasyonu (solid, kan, Saç ve diğer dokular) ve DNA dizi analizi C6- Epigenetik, DNA metilasyon analizi C7- Real Time PCR C8- MLPA, Strip Assay C9- RT-PCR, QF PCR, Direkt sekanslama C10- MikroArray-CGH		

BİLİMSEL ÇALIŞMALARI

A- Uluslararası Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- A1.** Öztürk Özdemir, Barış Paksoy, Atilla Gürgen, Mine Oruç, Onur Yıldız, Diğdem Uysal, Ahmet Uludağ, Fatma Silan. An infertile case of 47, XYY syndrome without autistic spectrum: Cost effective well-define of extra Y chromosome by GTG, C bandings, QF-PCR and FISH analyses. Cumhuriyet Medical Journal. 2016; 38(4):355-360
- A2.** Fatma Silan, Onur Yıldız, Mine Urfali, Zeliha Guler and Ozturk Ozdemir. A mental and motor retarded dysmorphic case with heterozygous 1p36 deletion: Comparable results from cytogenetic, MicroArray-CGH, FISH and MLPA techniques. Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences. 2016;4(12):490-499
- A3.** Fatma Silan, Irma Mosse, Alexander Gonchar, Nikita Sedlyar, Alexander V. Kilchevsky, Onur Yıldız, Banu Kuru and Ozturk Ozdemir. Comparison of the thrombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: Results on combined gene effect of FV Leiden, FVR2, FXIII, MTHFR(A1298C and C677T), PAI-1 4G/5G and ACE I/D genes in RPL Women from Misk/Belarus and Canakkale - Sivas/Turkey. Biomedical Genetics and Genomics. 2016;1(4):87-93
- A4.** Paksoy B, Silan F, Yıldız O, Ozdemir O, Tas Z. Meirer-Gorlin Syndrome: A primordial dwarfic rare case with growth and mental retardation in normal karyotype. Genetic Caunseling. 2016; 27(2):149-157
- A5.** Kilic SO, Ozdemir O, Silan F, Isik S, Yıldız O, Karaagacli D, Silan C, Ogretmen Z. The possible association between germ-line Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and psoriasis risk in Turkish population. Clin Exp Dermatol. 2017;42(1):8-13. doi: 10.1111/ced.12909.

BİLDİRİLER

Uluslararası Kongre ve Bildirileri

- A1.** Silan F, Arı E, Uludag A, Yıldız O, Isın B, Paksoy B, Urfali M, Ozdemir O. The microdeletion/microduplication profiles in spontaneously aborted fetal materials: *Double blind results of QF-PCR and MLPA techniques*. International Biotechnology Congress. 7-9 May 2015, Bucharest/ROMANIA. **Bu araştırma Poster 3. 'lülü ile ödüllendirilmiştir.**

A2. Fatma Silan, Mine Urfalı, **Onur Yildiz**, Baris Paksoy, Ahmet Uludag, Ozturk Ozdemir. Familial X chromosome translocation, Xq triplication and SHOX gene deletion with short stature; Conflicting results of QF-PCR analysis for Xq segmental triplication. European Human Genetics Conference 2016, E-P13.17 May 21-24 2016, Barcelona/SPAIN

A3. Coskun Silan, **Onur Yildiz**, Ozturk Ozdemir, Fatma Silan. Pharmacogenetic analysis of CYP genes, VKORC1, UGT1A1 and MDR1 at West Anatolia Region. European Human Genetics Conference 2016, E-P15.11 May 21-24 2016, Barcelona/SPAIN

A4. Ozturk Ozdemir, **Onur Yildiz**, Banu Kuru, Baris Paksoy, Digidem Uysal, Fatma Silan. The possible role of chromosome 9q11.1-1.2 duplication resulting with infertility and recurrent pregnancy loss. European Human Genetics Conference 2016, E-P01.38 May 21-24 2016, Barcelona/SPAIN

A5. F Silan, T Karakaya, **O Yildiz**, M Urfalı, O Ozdemir. Two candidate genes for recurrent pregnancy loss and infertility: Could ZP3 and UPK3B give us new diagnostic and therapeutic approach? BioDiscovery 20, e20113

A7. F Silan, T Karakaya, **O Yildiz**, B Paksoy, M Urfalı, O Ozdemir. A mental and motor retarded case with derivative chromosome 8p rearrangements: Genotype-phenotype correlation in a case report. European Biotechnology Congress, 25 - 27 May 2017 Dubrovnik, Croatia. Journal of Biotechnology 256, S78. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec>.

A8. Ozturk Ozdemir, Mine Urfalı, Baris Paksoy, Taner Karakaya, **Onur Yildiz**, Fatma Silan. A balanced non-reciprocal translocated case with recurrent abortions: The importance and validity of conventional cytogenetics analysis in balanced translocations detection when comparing to the MicroArray-CGH technique. European Biotechnology Congress, 25 - 27 May 2017 Dubrovnik, Croatia. Journal of Biotechnology 256, Page S79. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec>.

A9. Ozturk Ozdemir, **Onur Yildiz**, Taner Karakaya, Baris Paksoy, Mine Urfalı, Fatma Silan. The microdeletion of 15q11.2 locus encompassing *TUBGCP5*, *NIPA1*, *NIPA2*, and *CYFIP1* genes in an epileptic case with macrocephaly, attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), speech and motor delay. European Biotechnology Congress, 25 - 27 May 2017 Dubrovnik, Croatia. Journal of Biotechnology 256, Page S78. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec>.

Bildiriler

Ulusal Kongre ve Bildirileri

B1. Özdemir Ö., Urfalı M., **Yıldız O.**, Uludağ A., Uysal D., Özkınay F., Silan F. Erkeklerde azospermi, kadında translokasyon taşıyıcılığı saptanan infertilite çifti. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s120, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.

B2. Urfalı M., Özdemir Ö., Uysal D., **Yıldız O.**, Onay H., Güngör ANÇ., Özkınay F., Silan F. Aynı ailede boy kısalığının iki farklı genetik etyolojisi. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s81, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.

B3. Silan F., **Yıldız O.**, Urfalı M., Ulu MO., Batur Ş., Kankaya D., Özdemir Ö. İzole Malign Periferik Sinir Kılıf Tümörlü hastada *NF1* ve *OMGP* gen delesyonu. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s82, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.

B4. Özdemir Ö., Urfalı M., **Yıldız O.**, Uludağ A., Uysal D., Özkınay F., Silan F. Erkeklerde azospermi, kadında translokasyon taşıyıcılığı saptanan infertilite çifti. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s120, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.

B5. Ozdemir O., Paksoy B., Gürgeç A., Oruç M., **Yıldız O.**, Uysal D., Uludağ A., Silan F. AN İNFERTILE CASE OF 47, XXXY SYNDROME WITHOUT AUTISTIC SPECTRUM: COST EFFECTIVE WELL-DEFINE OF EXTRA Y CHROMOSOME BY GTG, C BANDINGS, QF-PCR AND FISH ANALYSE. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP6, s10. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

B6. Silan F., Işın B., Urfalı M., **Yıldız O.**, Uludağ A., Ozdemir O. A CASE DIRECTLY REQUESTED GENETIC COUNSELLING FROM MEDICAL GENETIC OUTPATIENT CLINIC AND DIAGNOSED MOSAIC KLINEFELTER SYNDROME AFTER KARYOTYPE AND FISH ANALYSES. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP6, s10. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

B7.Silan F, Has H, Işın B, Uludağ A, Urfalı M, Yıldız O, Ozdemir O. A MOSAIC TURNER PHENOTYPE WITH SECONDARY AMENORRHEA, INFERTILITY AND NORMAL HORMONAL STATUS THAT DETERMINED BY FISH ANALYSIS. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP6, s10. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

B8.Kuru B, Silan F, Uludağ A, Urfalı M, Yıldız O, Ozdemir O. "FISHED" OUT THE CORRECT DIAGNOSIS: A CASE OF DIGEORGE SYNDROME WITH MENTAL RETARDATION, SHORT STATURE AND DYSMORPHIC FACIAL FINDINGS. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP20, s15. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

B9.Kankaya D, Silan F, Yıldız O, Urfalı M, Güler Z, Ozdemir O. THE MOLECULAR ETHIOLOGICAL PARAMETERS IN PRELINGUAL SENSORINEURAL HEARING LOSS. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP21, s16. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

B0.Silan F, Yıldız O, Urfalı M, Ozdemir O. INCREASED POINT MUTATION FREQUENCY IN K-RAS ONCOGENE IN CRC TUMOURS IN ÇANAKKALE POPULATION. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP23, s16. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

B11.Kuru B. , Silan F. ,Uludağ A. ,Urfalı M., Yıldız O , Özdemir Ö. Mental Retardasyon, Kısa Boy ve Dismorfik Yüz Bulguları ile Karakterize DiGeorge Sendromlu Olgu FISH Yöntemi ile Doğru Tanı: Çanakkale Deneyimi. 1. Trakya Üniversiteler Birliği Yüksek Lisans Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale

B12.Güler Z., Urfalı M., Silan F., Yıldız O, Özdemir Ö. Periferik Dolaşımda Serbest Fragmente DNA Eldesi ve Klinik Tanıda Yeri ve Önemi: Çanakkale Deneyimi. 1. Trakya Üniversiteler Birliği Yüksek Lisans Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale

B13.O Ozdemir, M Urfalı, O Yıldız, F Silan. Mental ve motor geriliği olan dismorfik olguda heterozigot 1p36 delesyonu: Sitogenetik, moleküler sitogenetik ArrayCGH, FISH ve MLPA tekniklerinin heterozigot delesyon saptama etkinliklerinin karşılaştırılması. XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Official Journal of Turkish Society of medical Genetics Volume 1, Supplemented 1, p120, 05-09 Ekim 2016, Çesme- İZMİR

B14.M Urfalı, O Ozdemir, O Yıldız, B. Paksoy, F Silan. Fenotipik olarak normal fakat habitüel abortus öyküsü olan bayanda nadir rastlanılan dengeli non-resiprokal 5p; 14p translokasyonu: Dengeli transloke olguların doğru tanısında kromozom analizinin önemi ve MicroArray-CGH yöntemine üstünlüğü. XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Official Journal of Turkish Society of medical Genetics Volume 1, Supplemented 1, p122, 05-09 Ekim 2016, Çesme- İZMİR

HOBİLERİ

- 1.Doğa Yürüyüşü
- 2.Teknoloji

ÖDÜLLERİ

- 1.En iyi poster 3'lük ödülü. Uluslararası Biyoteknoloji Kongresi, 7-9 Mayıs 2015 Budapeşte/ROMANIA/2015

EK 1.



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 18920478-050.01.04/E.146089
Konu : Başvuru İncelemesi

14.12.2017

Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Olgularda Array CGH Analizinin Yeri ve Önemi" başlıklı 2011-KAEK-27/2017-E.64802 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 13/12/2017 tarih ve 20-06 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi :13.12.2017 14:00

Karar No :2017-20

Karar-06)2011-KAEK-27/2017-E.64802 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsü Prof. Dr. Fatma SILAN'ın çalışması Etik Kurul tarafından değerlendirilmiş olup; yapılan oylamada "**ETİK KURUL ONAYINI ALIR**" kararı verilmiştir.(Doç. Dr. Coşkun SILAN projede yer alan Prof. Dr. Fatma SILAN'ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamıştır.)



e-imzalıdır

Prof.Dr. Hakkı Engin AKSULU
Başkan