

NÖROPSİKİYATRİK BOZUKLUĞU OLAN HASTALARDA KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN YENİDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

RE-EVALUATION OF COPY NUMBER VARIATIONS IN NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS

Ahmet Cevdet CEYLAN¹, Haktan Bağış ERDEM²

¹Ankara Şehir Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü

²Dr. Abdurahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü

ÖZ

AMAÇ: İnsan genomunda bulunan 50 bazdan büyük değişikliklere 'Kopya Sayısı Değişiklikleri' (Copy Number Variations-CNV) adı verilmektedir. CNV'leri saptamak için rutinde mikrodizin (microarray) yöntemi kullanılmaktadır. Mikrodizin yöntemi zihinsel yetersizliğin, otizm spektrum bozukluğunun, çoklu doğumsal anomalilerin nedeninin saptanmasında ilk basamak testi olarak önerilmektedir. Çalışmanın amacı mikrodizin analizi ile saptanan değişikliklerin farklı filtreler ile değerlendirilip sonuçların karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamız Sağlık Bakanlığı, Ankara Merkez Genetik Laboratuvarı bünyesinde farklı nöro-psi-kiyatrik bozukluk endikasyonlarla Affymetrix Cytoscan Optima çipleri ile mikrodizin yapılmış 500 hasta verisinin retrospektif değerlendirilmesi ile yapılmıştır. 500 hastanın verileri standart analiz yöntemi ile ve daha yüksek duyarlılıkta analiz yapabilmek için 5 marker ve 1 kilobaz büyüklükteki değişiklikler incelenmiştir ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

BULGULAR: Standart analiz metodunda CNV saptanan 249 hastadan toplamda 313 CNV (%1.25) bulunmuş, daha yüksek çözünürlüklü analizde 362 hastadan 939 (%2.6) CNV tespit edilmiştir. Standart analizde 53 CNV saptanırken, yeni analiz metodunda 56 CNV saptanmıştır. Klinik anlamı bilinmeyen olarak sınıflanan CNV sayısı Standart yöntemde 105 iken, önerdiğimiz yeni analiz metodunda 318 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamız sırasında toplum frekansı %1'den büyük olan 12 CNV tespit edilmiştir.

SONUÇ: Sonuç olarak yeni yöntem testin tanı verme yüzdesini 10.7'den 11.3'e çıkarmış olmakla birlikte, klinik anlamı bilinmeyen ve olası yanlış pozitif sonuçları arttırmaktadır. Bu da analizi daha yüksek duyarlılıkla yapmakla birlikte, hem analiz süresini hem de testteki artefakt olarak adlandırılacak diğer sonuçların artmasına neden olmuştur. Ayrıca çalışmamızda Türk toplumunda göreceli olarak sık görülen 12 adet CNV bildirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Mikrodizin analizi, Kopya sayısı değişiklikleri, Nöropsikiyatrik bozukluk

ABSTRACT

OBJECTIVE: Chromosome segment variations involving more than 50 bases are called Copy Number Variations (CNV). Chromosomal microarray method is used to detect CNVs in a routine practice. Chromosomal microarray analysis (CMA) is a first-tier test in the evaluation of individuals with intellectual disability and developmental delay with the diagnostic yield ranging from 5 to 20% varying based on population examined. The International Standard for the Consortium of Cytogenomic Array recommended CMA as a first-stage cytogenetic diagnostic test for patients with CA and ID / GDD. This study aimed to compare the standard and new high resolution analyze methods.

MATERIAL AND METHODS: Our study was carried out with retrospective evaluation of 500 patients with CMA with different indications with Affymetrix Cytoscan Optima chips in Ankara Atatürk Research and Education Hospital.

RESULTS: In the standard analysis method, 313 CNVs was detected at 298 patients. New analyze method detected 939 CNVs at 362 patients. Standard analysis method could not detect 3 pathogenic CNVs which were below 100-Kb. While in the standard analysis, 56 pathogenic CNVs was found in the new analysis method. The number of CNVs classified as unknown clinically was 105 in the standard method and 318 in the new analysis method. In addition, 12 CNVs with a frequency of more than 1% were detected in our study.

CONCLUSIONS: Although the new method has increased the diagnostic percentage of the test from 10.7 to 11.3, it increases the clinical significance and increases the false positive results. This has led to a higher sensitivity of the analysis, but has led to an increase in both the duration of the analysis and other results that can be called artifacts in the test. In addition, 10 CNVs which are relatively common in Turkish population have been reported in our study.

KEYWORDS: Microarray analysis, Copy number variations, Neuropsychiatric disorders

Geliş Tarihi / Received: 02.01.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 24.02.2020

Yazışma Adresi / Correspondence: Uzm.Dr.Ahmet Cevdet CEYLAN

Ankara Şehir Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü

E-mail: acceylan@yahoo.com

Orcid No (Sırasıyla):0000-0003-4938-3420, 0000-0002-4391-1387

GİRİŞ

İnsan genomunda bulunan 3 milyar nükleotid farklı büyüklükte değişiklikler göstermektedir.

Tek nükleotid değişikliklerine, tek nükleotid polimorfizmi (Single nükleotid polimorfizm-SNP) adı verilirken; 2-50 nükleotid büyüklüğündeki değişikliklere "indel" adı verilir. Referans DNA'ya göre kromozom bölümlerinin 50 bazdan büyük değişikliklerine ise kopya sayısı değişikliği (Copy Number Variations-CNV) adı verilmektedir (1).

İlk tanımlandığında 1000 baz büyüklüğündeki değişikliklere CNV adı verilirken, teknolojinin gelişmesiyle tanınabilir alan küçülmüş ve 50 bazdan büyük değişiklikler olarak literatürde yer almıştır. CNV tanımı hastalıkla ilişkisi hakkında bilgi vermez, değişiklik olduğunu bildirmektedir (2).

CNV'leri saptamak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Genom boyunca yer alan değişiklikler ise mikrodizin (microarray) yöntemi ve yeni nesil dizileme yöntemi ile saptanabilir. Klinik kullanımda tüm genomdaki değişiklikleri saptamak için mikrodizin yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrodizin tarihsel gelişiminde farklı yöntemler kullanılmış olsa da günümüzde karşılaştırmalı genomik propların ya da SNP proplarının hibridizasyonu tabanlı mikrodizin yöntemleri kullanılmaktadır. Yeni nesil dizileme yöntemleriyle de CNV'ler saptanabilir. CNV'leri tüm genom dizileme yöntemi başarı ile saptarken, tüm ekzom dizileme yöntemi ile saptayabilmek için ek yazılımlara ihtiyaç duyulmaktadır (3). Ancak rutin kullanımda CNV'leri saptamak için mikrodizin yöntemleri kullanılmaktadır (4). Mikrodizin yöntemi zihinsel yetersizliğin, otizm spektrum bozukluğunun, çoklu doğumsal anomalilerin nedeninin saptanmasında ilk basamak testi olarak önerilmektedir (4). Yapılan çalışmalarda sadece zihinsel yetersizlikle araştırılan hastalarda %5-17; sadece otizm spektrum bozukluğu (OSB) ile başvuranlarda %2.3-3.2; dirençli epilepsi ile başvuranlarda %2-6 oranında tanı konduğu bildirilmiştir (5). Sağlıklı toplum çalışmalarında 500 kilobazdan büyük varyantların toplumun %5-10'unda, 1 megabazdan büyük varyantların toplumun %1-2'sinde görüldüğü gösterilmiştir (6).

Sağlıklı bir insanda da 50 bazdan büyük 100'den fazla CNV olması, bir hastada bulunan değişikliklerin klinikle ilişkilendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hastalarda ve sağlıklı bireylerde bulunan CNV'lerin bildirildiği çeşitli veritabanları oluşturulmuştur. Sağlıklı toplum çalışmalarının toplandığı veritabanlarının başında Database of Genomic Variants (DGV) gelmektedir. Bu veritabanı ile normal toplumda sık görülen, fenotipe etki etmeyen 'benign' CNV'lere ulaşılması mümkün olmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Ankara İl Sağlık Müdürlüğü, Merkez Genetik Laboratuvarı bünyesinde herhangi bir yaşta 146 tekrarlayan epilepsi ve nöromotor gelişim geriliği, 119 zihinsel yetersizlik, 45 otizm spektrum bozukluğu (OSB), 62 OSB ve zihinsel yetersizlik, 128 çoklu anomali ve zihinsel yetersizlik, gibi farklı endikasyonlarla Affimetrix® Cytoscan Optima çipleri ile mikrodizin yapılmış 500 hasta verisinin Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 Thermo Fisher Scientific® programı yardımıyla retrospektif değerlendirilmesi ile yapılmıştır. 500 hastadan aşağıdaki sınıflamaya göre patojenik ve olası patojenik olarak değerlendirilen değişiklikler çıkarılmış, kalan CNV'ler büyüklük, lokalizasyon, LogRD2, değeri gibi verilerin incelenmesiyle yapılmıştır.

Analiz sırasında 1. analizde standart analiz metodu (minimum prop sayısı 25 ve minimum büyüklük 100 kilobaz) kullanıldı. 2. analizde minimum prop sayısı 5 ve minimum büyüklük 1 kilobaz olarak filtreleme değiştirilerek yine ChAS 3.1 programında analiz edildi. İki yöntem arasındaki kopya sayısı değişiklikleri ve etkileri karşılaştırıldı.

Mikrodizin Verilerin Sınıflandırılması

Mikrodizin verileri genel olarak 3 ayrı sınıfta değerlendirilmektedir (7). Her sınıf da literatür desteğine göre 3 alt sınıfta değerlendirilmelidir.

Sınıflar arası değişiklik literatürün ve veri tabanlarının güncellenmesine göre aile segregasyonunun öğrenilmesine göre değişiklik gösterebilir.

Bu yüzden özellikle klinik önemi bilinmeyen değişikliklerin 1-2 yıl sonra tekrar değerlendirilmesi önerilmektedir.

1) Patolojik değişiklikler: Hastanın fenotipini açıkladığı düşünölen, literatür desteği olan değişikliklerdir. Bu gruptaki CNV'ler genellikle de novo olarak görölmekle birlikte parenteral kalıtım da gözlenebilir. 3 alt kısımda sınıflandırılabilir:

a) 5 megabazdan büyük değişiklikler: Bu grup değişiklikler kromozom analizi ile de görölebilen, çok sayıda gen içeren, içerdığı bölgedeki daha küçük delesyonları veya duplikasyonları kesin fenotiple ilişkilendirilmiş olan değişikliklerdir. Benzer fenotiple hastalar bildirilmiş olsa da gen içeriği fazla ve farklı olduğu için bu değişikliklerde farklı fenotipik özellikler görölemeyebilir. Doğrulama ve aile segregasyonu gerekmez. 4p delesyon sendromu, 1p36 delesyon sendromu gibi sendromlar bu gruba örnektir.

b) 5 megabazdan küçük patolojik değişiklikler: Bu grup değişiklikler literatürde tanımlanmış delesyon ve duplikasyonları içerir. Veri tabanlarında ilk gruptaki kadar çok olmasa da çok sayıda hasta bildirilmiştir. Sağlıklı toplum veri tabanlarında bu bölge değişikliği yoktur ya da çok az sayıdadır (değişken ekspresivite nedeniyle hafif fenotip gösterirler). Bu grup değişikliklerin başka bir yöntemle doğrulanması ve aile segregasyonunun araştırılması gereklidir. Bu değişiklikler patolojik olarak raporlanırken literatür desteği özellikle belirtilmelidir. 15q13.3 delesyonu, 16p11.2 delesyonu, 22q11.2 duplikasyonu bu gruba örnektir.

c) Olası patojenik değişiklikler: CNV'nin içerdığı genler bakımından önemli olabilecek ancak az sayıda literatür desteğinin olduğu değişikliklerdir. Sağlıklı toplum veri tabanında az sayıda bu bölgeyi kapsayan değişiklik bildirilmiştir. Tek nokta değişikliklerinin hastalıkla ilişkisi fonksiyon kaybı ile açıklanmış genlerdeki delesyonlar bu grupta sınıflandırılabilir. Ayrıca bilinen bazı delesyon sendromlarının duplikasyonları nörogelişimsel hastalıklar için risk faktörü olarak bildirildiği için bu grupta değerlendirilebilir. 15q13.3 duplikasyonu ya da nörogelişimsel fonksiyonu olan gen delesyonları bu gruba örnektir.

2) Klinik anlamı bilinmeyen değişiklikler: Literatür desteği yeterli olmayan, ancak veri tabanlarında az sayıda sağlıklı ve hasta verisi bildirilmiş durumlardır. Ayrıca de novo olmayan ve gen içermeyen değişiklikler bu grupta değerlendirilebilir. Veri tabanları ile kıyaslama ve gen içeriklerine göre 3 kısımda değerlendirilebilir:

a) Klinik anlamı bilinmeyen/olası patojenik değişiklikler: Benzer fenotipte az sayıda birey bildirildiği ya da içerdığı genler önemli olabilecek değişiklikler bu grupta değerlendirilebilir. Bu değişiklikler zaman içinde patojenik ya da benign olarak diğer sınıflara kayabilir.

b) Klinik anlamı bilinmeyen değişiklikler: Gen içermeyen ve sağlıklı veritabanında bildirilmemiş değişiklikler bu grupta değerlendirilebilir. Bu grup değişiklikler başka bir yöntemle doğrulanmalı ve aile segregasyonu değerlendirilmelidir.

c) Klinik anlamı bilinmeyen/olası benign değişiklikler: Sağlıklı toplum veri tabanlarında bu CNV'yi kapsayan az sayıda birey bildirildiğinde bu grupta değerlendirilebilir. Klinikle ilişkisi olmadığı düşünölen ancak emin olunamayan değişikliklerin sınıflandığı gruptur.

3) Benign değişiklikler: İçerdığı genlerin fonksiyonu ve sağlıklı toplum veri tabanlarında sık göröldüğü için fenotiple ilişkilendirilmeyen değişikliklerdir(8). Genellikle anne veya babadan kalıtılırlar. Bazı benign CNV'ler coğrafik bölgelere özgü olması nedeniyle yerel veri tabanlarında uluslararası veri tabanlarından daha sık görölebilir. Benign CNV'ler veritabanlarında görölme sıklığına göre sınıflandırılabilceği gibi bu sınıflandırmanın pratikte yararı çok fazla değildir. Ancak bir veri tabanındaki değişikliğin anlamlı kabul edilmesi için ikiden fazla bağımsız çalışmada farklı bireylerde saptanmış olması gereklidir(8).

Benign CNV'ler hasta veri tabanlarında da bildirilmiş olabilir. Çünkü hasta verisi saklayan veri tabanlarındaki bütün değişiklikler fenotiple ilişkili değildir. Fenotipik bulguları olan bireylerin genotiple ilişkilendirilmeksizin saklanması, aynı hastada patojenik bir değişiklikle birlikte bulunan benign CNV'ler de bildirildiği için karışıklığa

neden olabilir. Sağlıklı toplum veri tabanlarında çok sayıda görülen bir CNV'nin hasta veri tabanlarında az sayıda hastada da bildirilmiş olması olağan olarak değerlendirilmelidir.

ETİK KURUL

Çalışmaya katılmadan önce aydınlatılmış onam her bir hastadan ya da velisinden alındı. Etik kurul izni 2019-08/387 karar numarası ile Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı.

BULGULAR

500 hastanın verileri retrospektif olarak tekrar analiz edildiğinde standart analiz metodunda CNV saptanan 249 hastadan toplamda 313 CNV (hasta başı ortalama 1.25) bulundu (Tablo 1).

5 hastanın datası kalite skorları geçemediği için çalışma dışı bırakıldı. Geriye kalan 246 hastada ise herhangi bir değişiklik saptanmadı. Daha yüksek duyarlıklı yeni analizde ise 362 hastada toplam 939 (hasta başı ortalama 2.6) CNV tespit edilmiştir. Yine 5 hasta kalite standardına ulaşmadığı için çalışma dışı bırakılmış ve 133 hastada ise herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Standart ve yeni analizde 3 megabazdan büyük 36 CNV saptandı; bunlardan 3 tanesinin Y kromozomu üzerinde yer aldığı görüldü ve 33 CNV patojenik olarak sınıflandırıldı. Standart analizde 1 megabaz ve 3 megabaz arası CNV sayısı 66 iken yeni analizde 119 CNV saptandı, 1-3 megabaz arası CNV'lerin 20 tanesi ise patojenik olarak sınıflandırdı. Toplamda 1 megabazdan büyük 53 CNV patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Standart ve yeni analiz metodu arasında fark bulunmamaktadır.

Yeni analiz metodunda 3 hastada saptanan 1 megabazdan küçük delesyon patojenik olarak yorumlandı. Bu değişiklikler standart analiz metodunda saptanamamıştır. Toplamda standart analizde 53 (%10.7) patojenik CNV saptanırken, yeni analiz metodunda 56 (%11.3) patojenik CNV saptanmıştır (Tablo 1). Klinik anlamı bilinmeyen olarak sınıflanan CNV sayısı standart yöntemde 105 iken, yeni analiz metodunda 318 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1: Standart analiz metodunda ve daha duyarlı olan yeni analiz metodunda saptanan CNV'lerin karşılaştırılması

	Standart (25 Marker ve 200 kb)	Yeni (5 Marker ve 1 kb)
CNV Saptanan hasta sayısı	249	362
Toplam CNV sayısı	313	939
3 Mb'dan büyük CNV sayısı	36	36
1 Mb- 3 Mb arası CNV sayısı	66	119
1 Mb'dan küçük CNV sayısı	211	784
Patojenik CNV sayısı	53	56
Klinik Anlamı Bilinmeyen CNV sayısı	105	318

Ayrıca çalışmamız sırasında sıklık yüzdesi %1'den büyük olan 12 CNV tespit edilmiştir (Tablo 2). Bu CNV'lerin hastalıkla ilişkilendirilmedi ancak Türk toplumuna ait sık CNV'ler olduğu için not edildi. Bening CNV olarak sınıflandırıldı.

Tablo 2: Frekans %1'den büyük olan CNV'ler

Bölge	Gen Listesi
arr[hg19]20q13.33(62,032,670-62,230,974)x1	KCNQ2, EEF1A2, PDPDF, PTK6, SRMS, C20orf195, HELZ2, GMEB2
arr[hg19]Xp22.12(19,302,807-19,523,203)x3	PDHA1, MAP3K15
arr[hg19]Xq21.32(91,811,409-92,412,507)x2	PCDH11X
arr[hg19]11p15.5(942,343-1,493,609)x1	AP2A2, MUC6, MUC2, MUC5B, TOLLIP, TOLLIP-AS1, BRSK2, MOB2
arr[hg19]Yq11.23(26,489,963-27,811,878)x0	TTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4C, TTTY4B, TTTY4A, BPY2B, BPY2, BPY2C, DAZ4, DAZ3, DAZ2, GOLGA2P2Y, GOLGA2P3Y, CSPG4P1Y, CDY1B, CDY1
arr[hg19]1p36.33(849,466-1,335,011)x1	LOC100130417, SAMD11, NDC2L, KLHL17, PLEKHN1, C1orf170, HES4, ISG15, AGRN, RNF223, C1orf159, LOC254059, MIR200B, MIR200A, MIR429, TLL1D, TNFRSF1R, TNFRSF4, SDF4, B3GALT6, FAM132A, MIBE2J, SCNN1D, ACAP3, PUSL1, CPSE3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRAB, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413
arr[hg19]16p11.2(32,554,225-33,730,563)x1	TP53TG3B, TP53TG3, TP53TG3C, SLC6A10P, LOC390705, RNU6-76P
arr[hg19]1q21.2(148,001,264-149,660,970)x1	NBPF8 (613998), NBPF14 (614003), NBPF15 (610414), NBPF16 (614005), PP1AL4E (608608), NBPF23 (612970), FCGR1C (601503)
arr[hg19]5q31.1(130,754,309-130,923,128)x1	RAPGEF6
arr[hg19]6p22.3(19,914,178-20,144,790)x1	MBOAT1
arr[hg19]17q25.3(79,042,974-79,261,809)x1	BAIAP2, AATK, MIR657, MIR3065, MIR338, MIR1250, AATK-AS1, AZ11, ENTHD2, C17orf89, SLC38A10
arr[hg19]19p13.3(260,911-633,755)x3	PPAP2C, MIER2, TH8C, C2CD4C, SHC2, ODF3L2, MADCAM1, TPGS1, CDC34, GZMM, BSG, HCN2, POLRMT

TARTIŞMA

İnsan genomu boyunca farklı büyüklüklerde değişimler olmaktadır. 50 bazdan büyük genomik değişikliklere 'Kopya Sayısı Değişiklikleri' (CNV) adı verilmektedir. CNV'ler farklı endikasyonlarla kullanılmaktadır (4). En sık kullanım amacı ise büyüme geriliği, bilişsel yetersizlik, otizm ve epilepsi gibi nörolojik hastalıklardır. Bu hastalıkların etiyolojisini aydınlatmak için birinci basamak tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Hastalığa göre farklı oranlarda tanı yüzdesi bildirilmiştir. Örneğin epilepsi tanısı olanlarda %5-10, otizm tanısı olanlarda %3-7; çoklu doğumsal anomali olanlarda %10-20 oranında tanı koyulmaktadır (9). Farklı nöro-psikiyatrik bozukluk tanısı almış hasta grubu kohortundan 495 hasta üzerinde yapılan analizde 56 (%11.3) hastada patojenik CNV saptanmıştır. Bu oran literatürde belirtilen oranlara uyumludur.

Daha önce Türkiye’de yapılan 3 ayrı çalışmada ise %11-19 arasında oranlar bulunmuştur (9, 10). Bu oranların değişkenliğinde birkaç kriter ön plana çıkmaktadır. İlk etkileyen değişken seçilen hastaların endikasyonlarıdır. Seçilen anomalilere göre tanı yüzdeleri belirtilmiştir (**Tablo 3**).

Tablo 3: Klinik durumlara göre mikrodizin analizi ile tanı yüzdeleri

Tanı	Yeni analiz metodu ile tanı yüzdesi	Literatürde mikrodizin tanı yüzdesi	Referans
Zihinsel yetersizlik	%9.6 (11/114)	%7.8	(11)
Otizm spektrum bozukluğu (OSB)	%6.6 (3/45)	%5	(12)
Tekrarlayan epilepsi ve nöromotor gelişim geriliği	%9.5 (14/146)	%10.9	(13)
OSB ve Zihinsel yetersizlik	(%14.5) 9/62	%12.7	(13)
Çoklu anomali ve Zihinsel yetersizlik	%14.8 (19/128)	%10-20	(14)
Şizofreni	%0 (0/8)	%5	(15)

Saptanan CNV’lerin oranı etkileyen 2. değişken mikrodizin analizinde kullanılan çiplerdir. Yüksek çözünürlüklü çipler çok daha küçük değişiklikleri gösterebileceği gibi daha düşük çözünürlüklü çipler daha büyük genomik değişiklikleri gösterecektir (16).

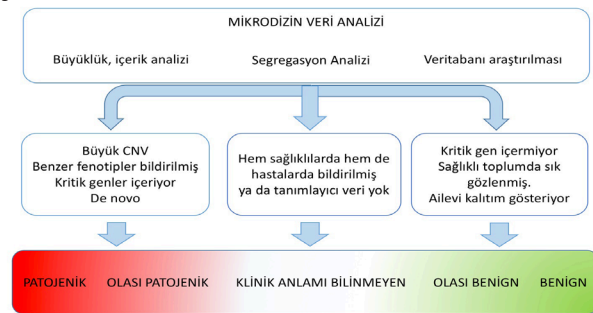
Bu çalışmanın amaçlarından biri düşük çözünürlüklü çiplerden daha çok verim alabilmektir.

Bu nedenle data analizi yaparken filtreleme kriterlerini değiştirerek daha az sayıda probu daha etkili kullanabilmeyi hedefledik. Standart filtreleme kriterler dışında daha küçük ve az sayıda probu değerlendirmeye aldık. Standart analiz kriterleri en az 200 kilobazlık büyüklük olması ya da 25 prob olması iken çalışmamızda en az 1 kilobazdan büyük veya 5 prop içeren tüm değişiklikler sıralanmıştır. Çalışmadaki sonuçlar tablo 1’de özetlenmiştir. Filtreleme kriteri azaldıkça kalite skorunu geçen 495 örnekten elde edilen toplam CNV sayısı 313’ten 939’a çıktı, örnek başına ortalama CNV sayısının ise 1.2’den 3.2’ye çıktığı görüldü. Bu sonuç filtreleme ile çok sayıda CNV’nin kriterler altında kalıp, gözden kaçırılmasına neden olduğunu göstermiştir. Yüksek çözünürlüklü çipler kullanıldığında birim alandaki prop sayısı artacağı için daha çok CNV’yi saptamasını açıklamaktadır. Ancak birim alanda daha az prop olması, testin güvenilirliğini olası yanlış pozitif sonuçları arttırmaktadır.

Bu nedenle yıllar içinde daha yüksek prop içeren daha yüksek çözünürlüklü çipler üretilmiştir. Analiz kriterleri değiştirildiğinde en az 1 CNV içeren hasta sayısı 249’dan 362’ye yükselmiştir.

Önceki analiz metodunda hastaların yaklaşık yarısında hiç CNV saptanmamış olması dikkat çekmektedir. Sağlıklı toplum çalışmalarında 500 kilobazdan büyük değişikliklerin toplumun yüzde 5-10’da yer aldığı gösterildiği göz önüne alındığında daha düşük çözünürlüklü çiplerle yapılan çalışmada hiç CNV saptanmamış olması açıklanabilir (1). Yeni nesil dizileme yöntemi ile yapılan tüm genom dizileme çalışmalarında ise 50 baz büyüklüğünde her bireyde 50’den fazla sayıda CNV saptandığı bildirilmektedir (17). Bu veriler yüksek çözünürlüklü yöntemlerin kullanılmasının önemini göstermektedir. Çalışmada kullanılan yeni analiz metodunda daha düşük filtreleme kullanılarak 113 bireydeki CNV saptanmıştır. Bazı bireylerde filtreleme kriterleri değişse de hala hiç CNV olmadığı dikkat çekmiştir.

Kopya sayısı değişikliklerinin araştırılmasının amacı bu genomik değişimlerin insan fenotipe etkisini ortaya çıkarmaktır (18). Bu nedenle saptanan CNV’ler etkilerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma sonucunda patojenik, benign ya da klinik anlamı bilinmeyen olarak adlandırılmaktadır (5). Çalışmamızda saptanan CNV’ler gereç ve yöntem bölümünde bildirilen şekilde sınıflandırılmıştır. Değerlendirme sırasında büyüklük ve içerik analizi, gerekiyorsa önceki ve sonraki kuşaklarda bulunup bulunmaması ve CNV’lerin diğer çalışmalardaki etkisinin toplandığı DGV ve ClinVar gibi veri tabanlarında bulunup bulunmaması dikkate alınmaktadır (**Şekil 1**).



Şekil 1: Mikrodizin analizi değerlendirme basamakları

Yapılan analiz sonrasında patojenik olarak yorumlanan CNV sayısı 53’ten 56’ya çıkmıştır.

Standart analiz metodu ile az sayıda patojenik CNV’nin saptanamayacağını ortaya koymaktadır. Klinik anlamı bilinmeyen CNV sayısı ise 105’ten 318’e çıkmıştır. CNV’lerin boyutları kü-

çüldükçe klinik anlamının bilinmeme ihtimalinin arttığını göstermektedir. Yeni filtreleme metodunda daha küçük CNV'ler saptanmakta ancak bunların çoğunun fenotipe etkisi bilinmemektedir.

Çalışmada ayrıca toplum frekansı %1'den fazla olan CNV'lere de yer verilmiştir (Tablo 2). Bu CNV'ler Özyılmaz ve arkadaşlarının yayınıyla ortak alanlar içermektedir (19) ve aynı çip kullanıldığı için artefak olmadığı dışlanamaz.

Ancak Türk popülasyonunda bulunan benign CNV'lerin saptanmış ve listelenmiş olması Şekil 1'de gösterildiği gibi değerlendirme sırasında önemli kriterlerden biridir (7). Bu değişiklikler daha önceden nokta değişiklikleri hastalıkla ilişkilendirilmiş genlerde de olabilir, ancak bu CNV'ler hastaların fenotipine etkisi olmadığı düşünülmüştür (20).

SONUÇ

Yeni filtreleme yöntemi ile testin tanı verme yüzdesini 10.7'den 11.3'e çıkarmış olmakla birlikte, klinik anlamı bilinmeyen ve olası yanlış pozitif sonuçları arttırmaktadır. Bu da analizi daha yüksek duyarlılıkla yapmakla birlikte, hem analiz süresini hem de testteki artefak olarak adlandırılacak diğer sonuçların artmasına neden olmuştur.

Mikrodizin analizi, tanısı konulamamış zihinsel yetersizlik, OSB, çoklu doğumsal anomalili hastalarda ilk istenmesi gereken tetkik olarak literatürde ve kılavuzlarda yer almaktadır (4).

Tetkik planlanmadan önce testin sınırlılıkları ve özellikle klinik anlamı bilinmeyen değişiklik ile karşılaşılabileceği genetik danışma eşliğinde anlatılmalıdır. Veri analizi yaparken hastanın fenotipi, öyküsü, özgeçmişi ve soygeçmişi ile birleştirilerek ve güncel veri tabanları ve literatürden yararlanılarak yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015 Mar;16(3):172-83.
2. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance C. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011 Jul;13(7):680-5.

3. Tan R, Wang Y, Kleinstejn SE, Liu Y, Zhu X, Guo H, et al. An evaluation of copy number variation detection tools from whole-exome sequencing data. *Human mutation.* 2014 Jul;35(7):899-907.
4. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64.
5. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009 Mar;11(3):139-46.
6. Robert Nussbaum RM, Huntington Willard. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 8th Edition: Elsevier; 2015.
7. Srebniak MI, Diderich KE, Govaerts LC, Joosten M, Rie-dijk S, Galjaard RJ, et al. Types of array findings detectable in cytogenetic diagnosis: a proposal for a generic classification. *European journal of human genetics : EJHG.* 2014 Jul;22(7):856-8.
8. Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM, et al. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clinical genetics.* 2012 May;81(5):403-12.
9. Ceylan AC, Citli S, Erdem HB, Sahin I, Acar Arslan E, Erdogan M. Importance and usage of chromosomal microarray analysis in diagnosing intellectual disability, global developmental delay, and autism; and discovering new loci for these disorders. *Mol Cytogenet.* 2018;11:54.
10. Utine GE, Haliloglu G, Volkan-Salanci B, Cetinkaya A, Kiper PO, Alanay Y, et al. Etiological yield of SNP microarrays in idiopathic intellectual disability. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014 May;18(3):327-37.
11. Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2011 Oct 25;77(17):1629-35.
12. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current opinion in genetics & development.* 2012 Jun;22(3):229-37.
13. Nicholl J, Waters W, Mulley JC, Suwalski S, Brown S, Hull Y, et al. Cognitive deficit and autism spectrum disorders: prospective diagnosis by array CGH. *Pathology.* 2014 Jan;46(1):41-5.
14. Devinsky O, Asato M, Camfield P, Geller E, Kanner AM, Keller S, et al. Delivery of epilepsy care to adults with intellectual and developmental disabilities. *Neurology.* 2015 Oct 27;85(17):1512-21.

- 15.** Baker K, Costain G, Fung WL, Bassett AS. Chromosomal microarray analysis-a routine clinical genetic test for patients with schizophrenia. *The lancet Psychiatry*. 2014 Oct;1(5):329-31.
- 16.** Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*. 2009 Jul-Aug;52(4):161-9.
- 17.** Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(8):1023-32.
- 18.** Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:437-55.
- 19.** Ozyilmaz B, Kirbiyik O, Koc A, Ozdemir TR, Kaya OO, Guvenc MS, et al. Experiences in microarray-based evaluation of developmental disabilities and congenital anomalies. *Clin Genet*. 2017 Oct;92(4):372-9.
- 20.** Bahsi T, Unal A, Bakir A, Percin EF. The 3rd W522X mutation in EIF2AK3 gene from Turkey: a new patient with wolcott-rallison syndrome. *Genet Couns*. 2016;27(3):411-8.