

## Prenatal tanı yöntemi olarak fetal anöploidi taramasında serbest fetal DNA (cffDNA) kullanımı ve güncel yaklaşımlar

### *The usage and current approaches of cell free fetal DNA (cffDNA) as a prenatal diagnostic method in fetal aneuploidy screening*

Hülya Erbaba, Gül Pınar

#### ÖZET

Prenatal tanı invaziv ve non-invaziv test (NIPT) şeklinde yapılabilmektedir, ancak invaziv yöntemler abortus, enfeksiyon gibi risklere sahip olduğundan tanılama non-invaziv yöntemlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bunlar arasında klinikte kullanımı giderek yaygınlaşan maternal kanda serbest fetal DNA (cffDNA) testi dikkati çekmektedir. Kromozomal anomali türlerinden olan anöploidlerin görülme oranı tüm canlı doğumlarda; Trizomi 21 (Down Sendromu) 1/800, Trizomi 13 (Patau Sendromu) 1/10.000, Trizomi 18 (Edwards sendromu) 1/6000 şeklindedir. Yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmasından dolayı kongenital anomalilerin prenatal dönemde tanılabilmesi hayati önem taşımaktadır. Test anöploidi açısından yüksek riskli gebelerde gebeliğin 10. haftasından sonra gebenin kan örneğinin alınması ve maternal plazmadaki serbest fetal DNA'nın rölatif miktarının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Sağlık çalışanları tarafından testin sahada kullanımına yönelik güncel kriterlerin bilinmesi maternal ve fetal risklerin ekarte edilmesini sağlayacaktır. Bu çalışmada, non-invaziv prenatal tanı yöntemlerinden cffDNA testinin avantaj ve dezavantajları ile testin kullanımına yönelik uluslararası güncel yaklaşımların ortaya konulması amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Prenatal tanılama, non-invaziv prenatal test, cffDNA testi

#### ABSTRACT

Prenatal diagnosis of invasive and noninvasive tests can be done in a way (NIPT), but because of the invasive methods have risks of infection and abortion, diagnosing non-invasive procedure increasing day by day. One of the widespread cell free fetal DNA in maternal blood test (cffDNA) that is increasing in clinical use has been drawing attention. The incidence of aneuploidy chromosomal anomaly of the kind in which all live births; Trisomy 21 (Down Syndrome) 1/800, trisomy 13 (Patau syndrome) 1 /10,000, trisomy 18 (Edwards syndrome) is a form of 1/6000. Because of the high mortality and morbidity, it is vital that congenital anomalies should be diagnosed in prenatal period. Aneuploidy testing for high-risk pregnant women after the 10th week of pregnancy in terms of the blood sample is taken and free fetal DNA in maternal plasma is based on the measurement of the relative amount. Knowledge of the current criteria for use by healthcare professionals in the field test will allow the exclusion of maternal and fetal risks. In this study, it is aimed to demonstrate current international approaches related to the positive and negative sides of non-invasive that is one of the prenatal diagnostic methods of cffDNA test. *J Clin Exp Invest 2015; 6 (4): 414-417*

**Key words:** Prenatal diagnosis, non-invasive prenatal test, cffDNA test

#### Prenatal tanılama yöntemleri ve gelişmeler

Prenatal tanı, kalıtsal geçiş gösteren hastalıkların moleküler, biyokimyasal yöntemlerle tanılmasına, mümkünse doğum öncesi tedavisine ve doğum sonrası gerekli tedbirlerin alınmasına, tedavinin planlanmasına ve gebeliğin gerekirse yasal süre içinde sonlandırılmasına olanak sağlamaktadır [1-3]. Fetal

kromozomal defektlerin taranmasında kullanılacak yöntemler iki türdür. İnvazivler, fetüs ve eklerine yapılan doğrudan müdahale tekniklerini kapsamaktadır. Bu teknikler; fetal biyopsiler, preimplantasyon, amniyosentez, koryon villüs örnekleme ve kordosentezdir [4,5].

Non-invaziv testler ise; Fetal ultrasonografi (11-14. hafta tarama Nuchal Translucency) ve maternal kandan bakılan biyokimyasal testler (ikili serbest -HCG, PAPP-A, üçlü HCG, AFP, uE3 tarama testi) dir. Bu testler halen standart prosedür olarak kullanılmakta olanlardır [6,7].

Prenatal tanı ile ilgili çalışmalar uzun yıllardır devam etmesine rağmen ilk prenatal tanı teşhisi bir sekele yönelik olarak 1916'da konulmuştur. 1956 yılında amniyon sıvısının genetik hastalıkların tanısında kullanılabileceği ortaya konularak ilk transabdominal amniosentez yöntemi uygulanmıştır [6]. 1966 yılında Steele ve Breg, amniyotik sıvıdan alınan kültür yapılmış hücreleri analiz etmiş ve bir fetüsün kromozom yapısını ortaya koymuşlardır [7,8]. Çalışmalar 1970-1980 yılları arasında korionik vilüs örnekleme ve perkütan umbilikal örneklemenin uygulamaya geçmesi ile devam etmiştir. Fetal hücrelerin maternal dolaşımdaki varlığı ise Schmorl tarafından ilk kez 1893 de eklampsi komplikasyonları sebebi ile ölen kadınların akciğer dokusunda plental orjinli, çok çekirdekli dev sinsityal hücrelerin varlığının tespiti ile ortaya konulmuştur. Maternal dolaşımda fetal hücrelerin tespiti çok eskiye dayanır da klinik uygulamada yer bulması çok yenidir [9]. 1997 yılında Lo ve arkadaşları, maternal dolaşımdaki Y kromozom dizilerinin ortaya konulmasına bağlı olarak, plazmada serbest fetal DNA'nın varlığını açıklamış ve invaziv olmayan prenatal tanı yöntemlerini araştırmaya devam etmişlerdir [10]. 2000 yılında, Poon ve ark. fetal mRNA'nın maternal plazmada sirküle olduğunu ortaya koymuşlardır [9]. Fetal hastalıkların prenatal tanısında kullanılabilecek non-invaziv metodların son on yılda daha da geliştirilmesinde belirgin bir ilerleme kaydedilmiştir [11,12].

### Non-invazif prenatal tanı yöntemleri

İnvaziv olmayan prenatal tanı yöntemlerine baktığımızda, henüz kayda değer bir zararının gösterilememesi, fetal risklerin elimine edilmesi ve annenin rahatlığı açısından fetal ultrasonografi prenatal tanı yöntemleri içinde en uygun ve en çok kullanılan yöntem olarak değerlendirilmektedir. Ultra ses dalgalarını kullanan bir alet yardımıyla fetusun incelenmesi ve varsa anomalilerin saptanması esasına dayanmaktadır [13,14]. Ultrasonografinin yanı sıra maternal kanda gözlemlenen birtakım belirteçlerde bulunmaktadır. Maternal kandan bakılan tarama testleri, 1. trimesterde serbest  $\beta$ -hCG ve PAPP-A, 2. trimesterde üçlü tarama testi (AFP, serbest  $\beta$ -hCG ve uE3) dir [15]. Ancak gelişmeler bir metallo proteaz olan ADAM12'nin de gelecekte gebelik 1. trimes-

tirde tarama testi olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır [16]. Öte yandan maternal dolaşımda DNA'ların bulunması bilindik bir fenomen olmasına rağmen maternal dolaşımdaki serbest nükleik asitlerin yeni belirteçler olarak kullanılabilmesi için moleküler ve biyolojik araştırmalar devam etmektedir. Araştırmalar, dolaşımdaki nükleik asitlerin doğasıyla ilgili temel soruların cevaplanması ve yeni yöntemler oluşturulması için önemlidir. Non-invaziv bir diğer seçenek ise DNA'nın tanımlanmasında tekli alel baz uzama tepkimesi (SABER) ve bunu takip eden kütle spektrometresidir. Bu yöntemle maternal serumda bulunan, babadan fetüse kalıtılan alellerdeki tek nokta mutasyonları saptanabilmekte, anneyi fetüsten ayıran tek bir nokta mutasyonuna da teşhis konulabilmektedir [17,4]. Maternal kandan çalışılan güvenilir prenatal test yöntemlerinden birisi de cffDNA testidir. Bu analiz 2011 yılında Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Koleji (ACOG), Maternal Fetal Tıp Topluluğu'nun önerileri ile fetal anöploidi için bir tarama yöntemi olarak uygulanmaya başlanılmıştır [18].

### Fetal Anöploidi ve cffDNA Testi

Fetal Anöploidi: Gametik hücrelerde temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere denir. Anöploidi kromozomlardaki artmayı belirtiyorsa hiperploidi, eksilmeyi ifade ediyorsa hipoploidi adını alır [19]. Kromozom bozuklukları arasında en sık rastlanan, önemli bir problem [20] olan anöploidinin prenatal tanısında invaziv ve tanısal testler kullanılmaktadır. Ancak tanıda girişimsel işlemlerin kullanılması abortus ve enfeksiyonlara neden olmaktadır [21]. Bu komplikasyonların elimine edilebilmesi için invaziv testlere alternatif olarak non-invaziv prenatal testlerden (NIPT) biri olan serbest fetal DNA (cell free fetal DNA- cffDNA) testi geliştirilmiştir. Bu test yüksek riskli gebelerde gebeliğin 10. haftasından sonra gebenin kan örneğinin alınması ve maternal plazmadaki serbest fetal DNA'nın rölatif miktarının ölçülmesi esasına dayanmaktadır [22,23].

Test sonucu ile fetal kaynaklı cinsiyet kromozom bozuklukları, 21, 18 ve 13. kromozomlardan elde edilen DNA'nın rölatif miktarına dayanılarak, Fetusun Down sendromu, Edward sendromu veya Patau sendromuna sahip olup olmadığı konusunda bilgi edinilmektedir [18].

### cffDNA Tarama Testi Endikasyonları

1. 35 yaş üstü gebelikler,
2. Fetal ultrasonografi bulgularında anöploidi riskinin yüksek olması,

3. Ailenin önceki çocuklarında tespit edilmiş kromozom anomalisi (Trizomi 13-Trizomi 21 gibi) bulunması,
4. Ebeveynlerde (maternal ve/veya paternal) yapısal kromozom anomalisi ve bazı durumlarda X-kromozomal hastalık hikayesi,
5. Birinci ve ikinci trimesterde cffDNA test sonucunun pozitif olması,
6. Anne serumunda tarama ile belirlenmiş yüksek risk,
7. Anamnezinde ikiden fazla nedeni bilinmeyen ölü doğum ve / veya anomalili bebek öyküsü olan gebelikler [2,3,18,24].

### cffDNA Testinin Avantaj ve Dezavantajları

Erken gebelik haftasında yapılabilmesi, 5-10 gün içerisinde sonuç alınabiliyor olması [22], non-invaziv bir test olması önemli bir avantaj olup sensitivite (%80-90) ve spesifitesinin (%99) yüksek olması nedeni ile güvenilir bir tarama testidir. Ayrıca erken fetal cinsiyet tayininde kullanılması konjenital adrenal hiperplazi gibi çeşitli X'e bağlı geçiş gösteren hastalıkların prenatal tanısı için kullanışlı ve doğru bir yöntem olarak kabul görmektedir [18]. Test, seçilmiş hastalarda uygulandığında oldukça başarılı ve yönlendiricidir [25]. Testin maliyetinin yüksek olması [26] moleküler laboratuvar sayısının az olması kullanım kolaylığı açısından dezavantaj olarak değerlendirilebilir.

Yüksek riskli gebelerin prenatal taramalarında cffDNA testinin etkili sonuçları, düşük riskli gebeliklerde cffDNA kullanılmasına yönelik pek çok soruyu da gündeme getirmiş ve ACOG'un 2012 önerisinde düşük riskli ve çoğul gebeliklerde asla önerilmemesini tavsiye etmesine ve maliyeti yüksek olmasına rağmen [27] Amerika da bazı özel klinikler tarafından, standart ilk adım prenatal taramalar (NT, serum biyokimyasal tahliller) yerine cffDNA testi rutin olarak önerilmeye başlanmıştır. Bir diğer sorun ise bu testin fetal cinsiyet tespiti için sık kullanılmasıdır. Testin seks kromozom anormalliklerinin teşhisi haricinde kullanıldığında "istenilmeyen cinsiyet" nedeni ile istemli küretajların artmasına neden olabileceği bildirilmiştir [28]. cffDNA testi önemli, maliyeti yüksek, moleküler bir tarama testidir. Bu nedenle ACOG ve USCA (University of California) "DNA'ya Dayalı Tarama Testleri"ni sadece anöploidik fetusa sahip olma riski yüksek olan kadınlar için önermektedirler [29].

Prenatal taramalarda çok önemli rolleri olan hemşireler ve sağlık çalışanları cffDNA testi konu-

sunda danışmanlık alan ailelere kullanılan testin Anöploidi için kesin karar verdirici bir test olmadığını ve güncel bilgileri iletmelidirler [20].

### cffDNA testine yönelik ACOG kriterleri (Eylül 2015)

- 1- Tüm hastalar için; prenatal tarama ve tanısal testlerin çeşitleri, alternatifleri ve test yapılmayan durumlar için riskler ve faydalar ortaya konulmalı.
- 2- cffDNA testinin sınırlı bir alanda performans göstermesi, anöploidi açısından düşük riskli gebelerde cffDNA testinin maliyeti hakkında yeterli veri olmaması gibi nedenlerden dolayı alışıl gelmiş tarama metodları, genel obstetrik popülasyondaki pek çok kadın için standart olarak yapılacak en uygun testler olarak sürdürülebilir.
- 3- Yaygın anöploidi riski taşıyan herhangi bir gebe cffDNA'yı kendi durumunun değerlendirilmesi için standart bir test olarak tercih ettiğinde bu testin faydalarını, sınırlılıklarını ve üzerindeki tartışmaları anlamalı: bu test yerine tanısal testlerin ve diğer alternatiflerin varlığını da bilmelidirler.
- 4- cffDNA sadece yaygın trizomileri ve istenirse cinsiyet kromozomlarının kompozisyonunu tanılayabilir.
- 5- cffDNA testi pozitif olan kimselere testin hatalı olup olmadığını ve elde edilen sonuca göre trizominin yeni gebeliklerde olma olasılığının anlaşılabilmesi için cffDNA'nın yanı sıra diyagnostik testler önerilmelidir.
- 6- Anöploidi taraması için aynı amaca yönelik eş zamanlı olarak birden fazla test yapılmasının maliyeti yüksektir. Bu nedenle birden fazla tetkik aynı anda aynı amaca yönelik olarak yapılmamalıdır.
- 7- Gebeliğin devam edip etmemesi konusunda sadece cffDNA sonuçları temel alınmamalıdır.
- 8- Özellikle kan, amniyon sıvısı ve koryonik dokudan yapılan kromozom analizlerinde saptanması mümkün olmayan mikrodelesyon sendromlarının tanılanmasında cffDNA etkili bir yöntem değildir.
- 9- cffDNA çoklu gebeliklerde trizomilerin tanılama aracı olarak tavsiye edilemez.
- 10- Eğer fetal anomali bir ultrason ile tanımlandıysa cffDNA yerine diyagnostik testlerle tanıya ulaşılması tavsiye edilir.
- 11- cffDNA sonuçları negatif olan kimseler de danışmanlık almaya yönlendirilir. Testin negatif olması gebeliğin etkilenmediği anlamına gelmez.
- 12- cffDNA fetal anomali olan nöral tüp defekti ve ventral duvar defektlerinin teşhisinde kullanılamaz [20].

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmalar invaziv olmayan cffDNA ve diğer moleküler testlerin kromozom anomalilerini tanılamada rutin olarak kullanılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Maternal kandan bakılan noninvaziv testler maternal ve fetal sorunların atlanmaması için halen günümüzde kullanılan klasik tarama testleri ile birlikte kullanılmalıdır. Noninvaziv prenatal tanı yöntemleri, günümüzde kullanılan tarama testlerinin ve invaziv girişimlerle elde edilen materyallerden yapılan fetal karyotiplemenin yerine kullanılmamaktadır. Sağlık profesyonelleri tarafından NIPT'in negatif bulunması durumunda kromozom ve genetik hastalıkların tamamının dışlanmasının beklenmediği, imkan ve sınırlamaları gebelere mutlaka anlatılmalıdır. Bu anlamda genetik danışmanlık eğitimi almış hemşirelerin ve sağlık çalışanlarının gebe ve ailelerini cffDNA'nın çok önemli bir test yöntemi olmakla birlikte anöploidi için kesin tanı yöntemi olmadığı konusunda doğru yönlendirmesi, gerekli bilgileri vermesi ve genetik danışmanlık da bulunarak yol gösterici olması olası sorunların önlemesi açısından yararlı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Yüreğir Ö. Ö, Büyükkurt S, Koç F, et al. Prenatal Tanı. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2012;21:1.
- Aydınlı K. Prenatal Tanı ve Tedavi, 1. Baskı. İstanbul: Prestij Matbaası, 1992:1-90.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Principles of Clinical Cytogenetics Thompson and Thompson Genetics In Medicine, Sixth ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:307-308.
- Yenilmez E. D, Tuli A. İnvaziv olmayan bir prenatal tanı yöntemi; maternal plazmadaki serbest fetal DNA. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2013;22:3.
- Balkan M, Erdemoğlu M, Budak T. Patau sendromlu bir prenatal tanı olgu sunumu. Dicle Tıp Dergisi 2008;35:2.
- Fuchs F, Riis P. Antenatal sex determination. Nature 1956;177:330.
- ACOG Committee Opinion: Down Syndrome Screening. Publication No. 141,1994, American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington, DC.
- Lynch L, Berkowitz RL. Amniocentesis, Skin Biopsy, Umbilical Cord Blood Sampling in the Prenatal Diagnosis of Genetic Disorders. In: Reece EA, Hobbins JC, Mahoney MJ, eds. Medicine of the Fetus and Mother, 2<sup>nd</sup> edn. Philadelphia: JB. Lippincott, 1992:641-652.
- Kıvançlı İ. 24-28. Gebelik Haftalarında Doppler Akım Değişiklikleri ile Maternal Kanda Fetal DNA Değerleri Arasındaki İlişki. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara-2013.
- Li Ying. Biochemical and clinical diagnostic aspects of circulating nucleic acids. University of Basel, PhD Thesis, Basel-2005.
- Robson S. J, Hui L. National decline in invasive prenatal diagnostic procedures in association with uptake of combined first trimester and cellfree DNA aneuploidy screening. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology 2015;55:507-508.
- ACOG Committee Opinion: Down Syndrome Screening. Publication No. 141,1994, American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington, DC.
- Toker F. Yüksek Riskli Gebe Popülasyonunda Ultrasonografik, Laboratuar Ve Anamnestik Risk Faktörlerinin Aneuploidi Öngörüsündeki Etkinlikleri. Sağlık Bakanlığı Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü, Uzmanlık Tezi, İstanbul- 2009.
- Uğurlu T. Fetal kromozomal anomalilerin QF-PCR (Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu) ile tespiti ve etkinliğinin aminoasit kültürleri ile karşılaştırılması. Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir- 2007.
- Güdücü N, Gönenç G, İşçi H, et al. First trimester serum PAPP-A levels and the prediction of small-for-gestational age infants. J Clin Exp Invest www. jceionline. org 2012;3:2.
- Laigaard J, Sorensen T, Placing S, et al. Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in preeclampsia. Obstet Gynecol 2005;106:144-149.
- Maron JL, Bianchi DW. Prenatal diagnosis using cell free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of process. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2007;145:5-17.
- <http://www.acog.org/About-ACOG/News-Room/Practice-Advisories/ACOG-Practice-Advisory-on-Cell-Free-DNA-Screening> Erişim Tarihi:28 Ağustos 2015.
- Durak B. Normal Ve Translokasyon Taşıyıcısı Erkeklerin Spermiumlarında FISH'le Kromozom Analizi. Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı. Doktora Tezi, Eskişehir -1998.
- Pazarbaşı A, Demirhan O, Taşdemir D, et al. Amniyosentez ile Tanı Konulan 4707 Olgunun Sitogenetik Bulgularının Değerlendirilmesi. Cukurova Medical Journal 2011;36:1.
- Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. Ultrasound Obstet. Gynecol 2003;21:313-321.
- <https://druslu.wordpress.com/2013/04/02/cell-free-fetal-dna-testi/> Erişim Tarihi:28 Ağustos 2015.
- Rebouché R. Non-Invasive Testing, Non-Invasive Counseling. The Journal of Law, Medicine & Ethics 2015;43:2-228-240.
- <http://nsgc.org/page/abnormal-non-invasive-prenatal-testing-results>. Erişim Tarihi: 3 Eylül 2015.
- Fairbrother G, Johnson S, Musci T. J, Song K. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. Prenatal diagnosis 2013;33:6-580-583.
- Benn P, Curnow K. J, Chapman S, et al. An Economic Analysis of Cell-Free DNA Non-Invasive Prenatal Testing in the US General Pregnancy Population. PloS one 2015;10:7.
- Anon. Committee opinion no. 545: noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Obstet Gynecol 2012;120:1532-1534.
- Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. Hum Reprod Update 2002;8:493-500.
- Bianchi Diana W, et al. Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. JAMA 2015;314.2:162-169.