



İnvaziv Olmayan Bir Prenatal Tanı Yöntemi: Maternal Plazmada Serbest Fetal DNA

A Non-Invasive Prenatal Diagnosis Method: Free Fetal DNA in Maternal Plasma

Ebru Dünder Yenilmez¹, Abdullah Tuli¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Prenatal diagnosis for genetic diseases nowadays is still carried out by invasive procedures such as chorionic villus sampling, amniocentesis or cordocentesis. These techniques, however, accompanied with risk of fetal losses. Non-invasive prenatal diagnosis tests based on the analysis of fetal DNA in maternal plasma have potential to be a safer alternative to invasive methods. Non-invasive prenatal diagnosis has been a long-standing research theme in prenatal medicine. The discovery of cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma in 1997 has opened new possibilities for noninvasive prenatal diagnosis. The measurement and detection of fetal DNA in maternal plasma and serum has led to clinical applications for the identification of fetal aneuploidies, pre-eclamptic pregnancies, noninvasive diagnosis of fetal Rhesus D genotype and some single gene disorders. The detection of fetal DNA sequences is a reality and could reduce the risk of invasive techniques for certain fetal disorders in the near future.

Key words: Prenatal diagnosis, free fetal DNA, fetal sampling.

ÖZET

Genetik hastalıkların prenatal tanısı günümüzde halen koriyonik villüs örnekleme, amniyosentez veya kordosentez gibi invaziv yöntemlerle yapılmaktadır. Bu yöntemler aynı zamanda fetal kayıp riski taşımaktadır. Maternal plazmadaki fetal DNA analizine dayalı olan invaziv olmayan prenatal tanı testleri invaziv yöntemlere göre daha güvenli olma potansiyeline sahiptir. İnvaziv olmayan prenatal tanı, doğum öncesi tıbbında uzun dönemdir bir araştırma konusu olmuştur. 1997 yılında maternal



plazmada serbest nükleik asitlerin keşfi, invaziv olmayan prenatal tanı için yeni ufuklar açmıştır. Maternal plazma ve serumda fetal DNA düzeyi ölçümü ve saptanması, fetal anöploidilerin, preklamptik gebeliklerin belirlenmesi, fetal RhD genotipleme ve bazı tek gen bozukluklarının invaziv olmayan prenatal tanısı gibi klinik uygulamalara olanak sağlamaktadır. Fetal DNA dizilerinin tespit edilebilirliği yakın gelecekte bazı fetal hastalıklar için invaziv yöntemlerin riskini azaltabilir.

Anahtar Kelimeler: Prenatal tanı, serbest fetal DNA, fetal örnekleme .

Giriş

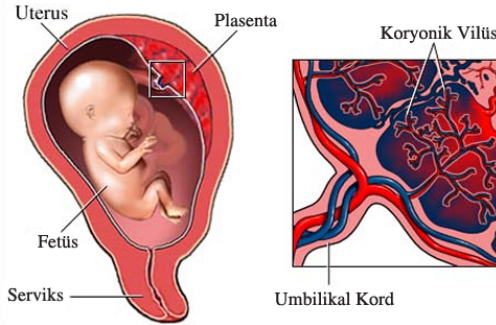
Prenatal tanı, gebeliğin erken dönemlerinde farklı yöntemlerle alınan fetal örneklerin, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle kalıtsal geçiş gösteren hastalıkların tanısının konularak gebelik sırasında gerekli yasal süre içinde gebeliğin sonlandırılmasına olanak sağlamaktadır¹.

Prenatal tanının başlangıcı, 1966'da Steele ve Breg'in bir fetüsün kromozom yapısının, amniyotik sıvıdan alınan kültür yapılmış hücrelerin analizi ile belirlenebileceğini göstermesiyle başlamıştır². Bu sürecin başlamasıyla birlikte koriyonik vilüs örnekleme ve perkütan umbilikal örnekleme 1970'lerde ve 1980'lerde kullanıma girmiştir. Gerçekten prenatal tanının tarihesinin daha eskilere dayandığı ve karmaşık bir süreç olduğu bildirilmektedir. İlk prenatal tanı bir sekel için 1916'da rapor edilmiştir³. Günümüzde prenatal tanı koriyonik villüs örnekleme ve amniyosentez gibi invaziv yöntemlerle uygulanmaktadır. 1997 yılında Lo ve arkadaşları, gebelerde maternal dolaşımdaki plazmadaki serbest fetal DNA'nın varlığını Y kromozom dizilerinin saptanmasıyla ortaya koymuş ve invaziv olmayan prenatal tanının ilk adımları atılmıştır². Niceliksel analizler maternal plazmadaki fetal DNA derişiminin, hücre içinde bulunan fetal DNA'dan daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, maternal plazmadaki fetal DNA'nın invaziv olmayan prenatal tanı için değerli bir materyal olabileceği sonucunu ortaya koymuştur².

Bu derlemede günümüzde kullanılan geleneksel invaziv prenatal tanı yöntemleri yanında, bu yöntemlere seçenek olarak invaziv olmayan bir prenatal tanı aracı olarak, klinikte kullanımı giderek yaygınlaşan maternal fetal DNA'nın anlatımı amaçlanmış olup, maternal kandaki kaynağı, saptanması ve farklı alanlarda yeni teknolojik yöntemlerle genetik özelliğinin ortaya konması tartışılmıştır.

Günümüzde Prenatal Tanı Yöntemleri

Fetal tıbbın en önemli özelliği doktorun hasta yani fetüs ile doğrudan temas edememesidir. Bu nedenle özel görüntüleme tekniklerine ihtiyaç vardır. Diğer önemli bir konu ise fetüse yapılacak müdahalelerin anne üzerinden yapılması gerekliliğidir (Şekil 1). Anne üzerinden yapılacak müdahaleler veya yaklaşımlar anneyi doğrudan etkileyecektir. Prenatal tanıda kullanılacak yöntemin olabildiğince invaziv olmaması tercih edilmelidir. Prenatal tanı merkezlerinde invaziv ve invaziv olmayan yöntemler uygulanmaktadır^{4,5}.



Şekil 1. Fetüs, Uterus ve Plasentanın Gösterimi.

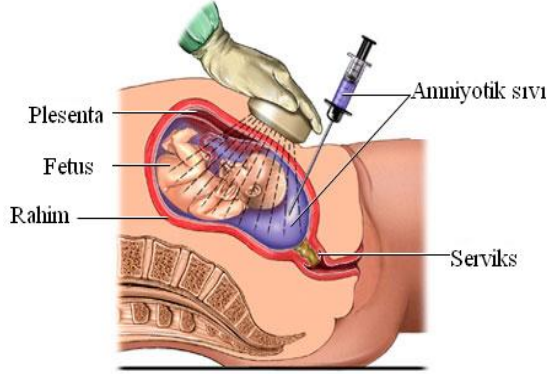
İnvaziv Prenatal Tanı Yöntemleri

Fetüs ve eklerine yapılan doğrudan müdahale tekniklerini kapsamaktadır. Bu teknikler; Amniyosentez, Koriyon vilüs örnekleme (Chorionic villus sampling-CVS), Fetal kan örnekleme (Kordosentez) dir. Amniyosentez ve CVS en yaygın uygulanan doğum öncesi tanı yöntemleridir⁵.

Amniyosentez

Amniyosentez, invaziv prenatal tanı yöntemleri arasında en sık kullanılan yöntemdir. Amniyon sıvısı bebeğin doğmadan önceki yaşam ortamıdır ve tüm salgıları bu ortama olmaktadır⁶. Amniyon sıvısındaki fetal deri, gastrointestinal ve solunum sistemlerinden dökülen hücrelerin kültür edilmesinden sonra karyotiplemenin yapılması esasına dayanmaktadır. 15-17. gebelik haftalarında amniyotik sıvı hacmi yaklaşık 150-200 mL olduğundan 15 mL kadar amniyon sıvısı alınması fetüse herhangi bir etki yapmamaktadır.

İşleme bağlı fetal kayıp oranı geniş serili çalışmalarda % 0,2-2,1 olarak bildirilmektedir⁵. Alınmasındaki kolaylık ve yansıttığı metabolik durumların önemi, amniyon sıvısını vazgeçilmez tanı aracı haline getirmiştir⁶ (Şekil 2)⁷.



Şekil 2. Amniyosentez İşlemi⁷

Korionik Vilüs Örnekleme

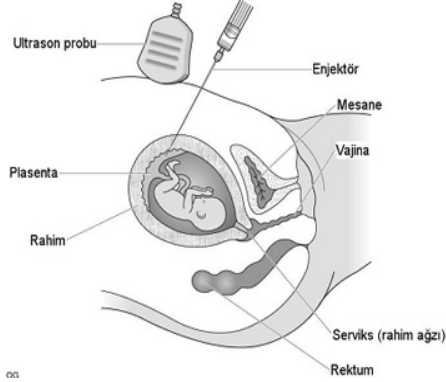
Trofoblastik doku ve fetüs aynı embriyolojik kökene sahiptir; bu yüzden vilüs örnekleme fetal anormallikleri yansıtacağı gerçeğinden yola çıkılarak bu yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Tek gen hastalıkları açısından pozitif aile öyküsünün bulunduğu durumlarda özellikle tercih edilebilir. Çünkü elde edilen dokuda kültür yapılmaksızın moleküler inceleme için DNA eldesi mümkündür. CVS'nin avantajı daha erken dönemde uygulanabilmesidir; korion fetal kaynaklı bir dokudur, genetik olarak fetüsü yansıtır ve 1. trimesterde kolaylıkla ulaşılabilir. Yöntemin dezavantajları ise amniyosenteze göre teknik olarak daha zor olması, elde edilen hücrelerin doğrudan fetal hücreler olmaması ve sitogenetik incelemede yalancı mozaizm gibi durumların daha sık görülmesidir. Korion vilüs biyopsisinin 11. gebelik haftasından sonra ve deneyimli obstetrisyenler tarafından yapılması gerekir. Şekil 3'de CVS gösterilmiştir⁸.

Kordosentez

Umbilikal arter veya venden iğne ile girilerek kan alınmasıdır. Kordosentez için en uygun dönem ortalama 18-22. gebelik haftasıdır⁹. Geç dönemde uygulanabilirliği bir dezavantaj

olmasına rağmen, kısa sürede sonuç alınması nedeniyle özellikle gecikmiş olgularda tercih edilmektedir. Daha erken haftalarda umbilikal damarların yapısı nedeniyle kanama riski yüksektir; teknik olarak plasentanın yerleşimi çok önemlidir ve bu dönemde yapılan uygulamalar sonrası fetal kayıp oranı % 1-2 olarak bildirilmiştir (Şekil 4)^{6,10}.

Kordosentez işlemi ile alınan materyal doğrudan fetal hücreleri içerdiğinden tanı değeri diğer yöntemlerden daha fazladır.



Şekil 3. Koriyonik Vilus Örneklemesinin Uygulanması⁸.

İnvaziv Olmayan Prenatal Tanı Yöntemleri ve Gelişmeler

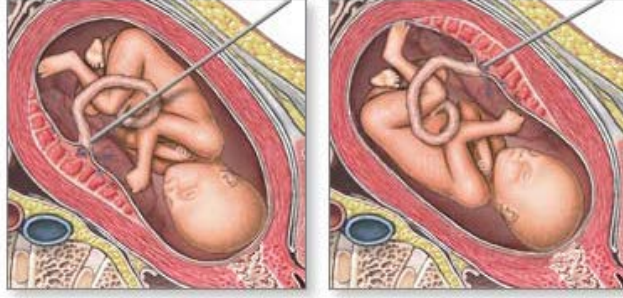
Fetal Ultrasonografi

Neredeyse tıbbın her alanında kullanılan ultrasonografi obstetrikte en fazla kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir. Bugüne kadar bilinen bir zararının gösterilememesi nedeniyle prenatal tanı yöntemleri içinde, fetal risk ve annenin rahatlığı açısından en uygun olarak kullanılan yöntemdir. Ultra ses dalgalarını kullanan bir alet yardımıyla fetusun incelenmesi ve varsa anomalilerin saptanması esasına dayanır⁵.

Maternal Kanda Bakılabilen Belirteçler

Anomaliler açısından yüksek risk bulunan gebelikleri belirlemek için yapılan tarama testleri, genetik ve doğum hekimlerinin her zaman ilgisini çekmiştir. Maternal kanda bakılan tarama testleri, 1. trimesterde serbest β -hCG ve PAPP-A, 2. trimesterde üçlü tarama testi (AFP, serbest

β -hCG ve uE3) ve maternal serum AFP'dir¹⁰. Son dönemlerde bir metallo proteaz olan ADAM12'nin de gebelikte 1. trimestir tarama testlerinde bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmektedir¹¹.



Şekil 4. Plasentanın Değişik Yerleşiminde Kordosentez Uygulaması. (Solda posteriyor plasenta ve sağda anterior plasenta görülmektedir¹⁰.)

İmplantasyon Öncesi Genetik Tanı

Yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesine paralel olarak, genetik yapının saptanmasına olanak tanıyan yöntemlerin implantasyon öncesi dönemde uygulanması ile implantasyon öncesi genetik tanı (Prenatal Genetic Diagnosis PGD) gündeme gelmiştir. İmplantasyon öncesi tanının temel avantajı, 2. ve 3. Trimesterde gebeliğin sonlanmasının yaratacağı psikolojik yükün olmaması olarak kabul edilebilir². Tek gen mutasyonları, PCR ile tanımlanmakta ve DNA analizi, biyopsi yapılan blastomerde ya da 1ci ve 2nci polar cisimlerde uygulanmaktadır¹².



Şekil 5. İmplantasyon Öncesi Genetik Tanı (PGD) Uygulaması¹⁴.

PGD'yi tercih eden çiftler over stimülasyonunu içeren *in vitro* fertilizasyon tedavisi görmekte ve 3ncü günde embriyolara biyopsi yapılır. Genetik analizle sağlıklı embriyolar seçilmekte ve bu embriyolar uterusu aktarılır (Şekil 5)^{13,14}.

Maternal Plazmadaki Nükleik Asitler

1948'lerde Mendel ve Matais hem hasta hem de sağlıklı bireylerde plazmadaki nükleik asitlerin varlığını ortaya koydular². Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve kanserli hastaların serumlarında yüksek düzeylerde DNA olduğu bildirildi. 1969'da Walknowska ve ark.¹⁵ maternal periferik kanda ilk kez fetal lenfositlerin varlığını bildirmişlerdir¹⁶. Aradan geçen 10 yılda araştırmalar, maternal dolaşımda bozulmadan kalan fetal hücreler üzerine yoğunlaşmış ve invaziv olmayan prenatal tanıda kullanımı için çalışmalar devam etmiştir. Bunun yanında fetal hücrelerin maternal kanda çok az sayıda bulunması, onların sağlıklı bir şekilde saptanmasına engel olmuştur¹⁷. İnvaziv olmayan prenatal tanı için yeni gelişmeler, 1997'de serbest fetal DNA'nın tanımlanması ile ortaya çıkmıştır¹⁸. Bu fetal DNA'nın % 10'luk kısmının da maternal plazmadaki total DNA olduğu tahmin edilmektedir^{16,19}. Maternal plazma ve serumda serbest haldeki fetal DNA'nın bulunmasının ardından bu alanda yeni çalışmalar ortaya çıkmış ve pek çok uygulama hızla takip edilip bir kısmı klinik kullanıma sokulmuştur^{16,20}.

Maternal Dolaşımdaki Serbest Nükleik Asitler

Dolaşımdaki DNA'nın varlığı artık bilinen bir durum olmasına rağmen, moleküler ve biyolojik yönü halen araştırmaların erken safhalarında bulunmaktadır. Araştırmalar, dolaşımdaki nükleik asitlerin doğasıyla ilgili pek çok temel soruların cevabının bulunması için önemlidir.

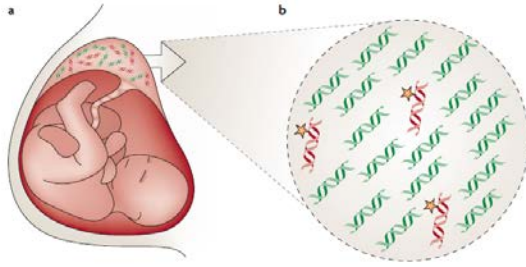
Maternal Plazmadaki Serbest Fetal DNA Kaynağı

Serbest fetal DNA'nın maternal plazmadaki sürpriz keşfinden sonra, bu DNA hakkında pek çok bilgi edinilmiştir¹⁸. Serbest fetal DNA'nın dolaşıma verilmesinin kaynakları hakkında çeşitli düşünceler mevcuttur. Plasenta, fetal hematopoetik hücreler ve fetüsün kendisi plazmadaki fetal DNA'nın kaynakları olarak düşünülmektedir¹⁷. Maternal dolaşımdaki en baskın fetal DNA kaynağının plasenta olduğu pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Konsepsiyon sonrası 28-30 günden önce feto-maternal dolaşımın belirlenememesi, fetal DNA'nın trofoblastlardan köken aldığını düşündürmektedir. Serbest fetal DNA'nın plasentadan köken

aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir²¹. Serbest fetal DNA'nın plasentada çok fazla miktarda bulunmasının yanında, tek kaynağın plasenta olmadığı düşünülmektedir. Fetal hematopoetik hücreler de fetal DNA havuzuna bir miktar katkı sağlamaktadır. Fetal eritroit hücrelerin gebelerin plasmasında bulunduğu gösterilmiştir²². Fetal eritroit hücrelerin maternal dolaşımdaki varlığı, az olsa bile maternal plazmaya serbest fetal DNA verme potansiyelinin bir göstergesi olduğu öne sürülmektedir²³.

Fetal DNA'nın Saptanmasında Seçeneksel Yöntemler

Bugüne kadar yapılan pek çok dolaşımdaki fetal DNA çalışmalarında fetal belirleyici olarak Y-kromozomuna özgü diziler kullanılmıştır. Klinik deneylerin geneline uygulanabilmesi için cinsiyet fenotipinde değişim oluşturmaktadır²⁴. Fetüs veya plasenta ve annenin DNA metilasyonu farklılıklarını tanımlayarak, maternal plazmada hem maternal hem de paternal fetal aleller tespit edilebilmektedir. Bu teknikle kalıtılan farklı paternal ve maternal metilasyona sahip lokuslara bakılmaktadır²⁵.



Şekil 6. Dolaşımdaki Fetal DNA'nın Tek Gen Bozukluklarının Prenatal Tanısında Kullanımı. (A) Fetal DNA'nın maternal dolaşıma salınımı. (B) Maternal plazmada fetal DNA¹.

Maternal plazmadaki ilk fetal DNA belirteci olarak kromozom 18 üzerinde bulunan *maspin* geni tanımlanmıştır²⁶. *Maspin*, maternal lökositlerde metillenmiş ama plazmada hipometilasyona uğramıştır. Bu çalışmada maternal kanda saptanan hipometilasyona uğramış plasental *maspin* geni, üç aylık dönemlerdeki cinsiyeti belirleyen bölge dizisi (SRY) derişimleriyle orantılı bulunmuştur. Yapılan tekli nükleotit polimorfizmi (SNP) çalışmalarıyla hipometillenmiş *maspin* geni kaynağının plasenta olduğu kanıtlanmıştır. Diğer gen dizilerinde

de anne ve bebek arasındaki epigenetik düzenlenmelerin farklılığına bakılabileceği düşünülmektedir.

İnvaziv olmayan fetal DNA tanımlanmasında diğer bir seçeneysel yöntem de tekli alel baz uzama tepkimesi (SABER) ve bunu takip eden kütle spektrometresidir (MS). Bu yöntemle maternal serumdaki babadan fetüse kalıtılan alellerdeki tek nokta mutasyonları saptanabilmektedir²⁷. Teorik olarak bu şekilde bir teknik, anneyi fetüsten ayıran tek bir nokta mutasyonuna da genetik bozukluklara da geniş bir spektrumda bakabilmektedir²³.

Klinik Tanıda Fetal DNA'nın Kullanım Alanları

Fetal Cinsiyet Tayini

Prenatal fetal cinsiyet tayini, belirli bir cinsi etkileyen ciddi genetik bozukluk riski taşıyan gebelere uygulanmaktadır. Günümüzde geleneksel invaziv testlerden en çok kullanılan amniyosentez ve koriyonik vilüs örnekleme sinin % 0,5-1 kadar düşük riski taşımaktadırlar²⁸. Maternal dolaşımdaki serbest fetal DNA, invaziv olmayan prenatal tanı testlerinin gelişmesine yol açmış olup, fetal cinsiyet tayininde gebelik için herhangi bir risk bulunmamaktadır²⁹.

Erken fetal cinsiyet tayini, konjenital adrenal hiperplazi gibi çeşitli X'e bağlı geçiş gösteren hastalıkların prenatal tanısı için önemlidir^{18,30}. Dushene musküler distrofi ve hemofili gibi diğerleri için de maternal kandan cinsiyet tayini kullanışlı ve doğru bir yöntem olarak kabul görmektedir²⁰. Kabul görme nedenleri arasında invaziv yöntemlerin risklerini taşılamaması ve klinik koruyuculuğu arttırması yer almaktadır²³.

Fetal cinsiyetin doğru olarak tanımlanmasında en erken gebelik yaşı, farklı çalışmalarda değişim göstermiştir. Değişik varyasyonlar olmasına rağmen raporlar SRY geni için RT-PCR amplifikasyonu ile fetal cinsiyetin 7. haftada % 80 doğrulukta ve 9. haftada ise % 100 doğrulukta saptanabildiğini göstermektedir^{23,30,31}.

Fetal DNA cinsiyet tayininde Y-kromozomuna özgül dizilerin belirlenmesi, fetüsün erkek; bu dizilerin bulunmaması fetüsün dişi olduğu anlamına gelmektedir. SRY, DYS14 ve DAZ gibi Y-kromozomuna özgü diziler cinsiyet tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kuru maternal kan ile fetal Y dizilerini saptayan bir tanımlama yöntemi de 2003'te fetal cinsiyet tayini çoklu kopya DYS14 belirteç dizisini tanıyan Y-kromozom kaynaklı TSYF (Testise özgü protein Y) geni kullanılmasıdır^{23,29,32}.

Fetal RhD Genotiplenmesi

Yeni doğanda maternal alloimmünizasyon ve sonradan gelişen hemolitik hastalık için anne ve bebeği arasında RhD kan uyumsuzluğu potansiyel bir problem oluşturmaktadır. Rh (-) kan grubu beyaz ırkta % 15, siyahi Afrikalılarda % 3-5 sıklıkta, Asya popülasyonunda ise nadir olarak gözlenmektedir^{20,33}. Bu nedenle Rh (-) gebe kadınlar prenatal çalışmalar için önemli bir grup oluşturmaktadır.

Rh (-) gebelerde fetal RhD tanımlanmasında maternal plazmadaki fetüs DNA'sının kullanımı yeni ufuklar açmıştır^{20,33}. Geleneksel yöntemlerden (amniyosentez ve CVS gibi) farklı olarak invaziv olmayan yöntem kullanıldığında fetö-maternal kanama ve daha fazla sensitizasyon riski ortadan kalkmaktadır. Bu sayede sadece Rh (+) fetusa sahip gebelerde koruma amacıyla verilen anti-D immünglobulin, Rh (-) fetüse sahip gebelerin gereksiz yere anti-D immünglobulin alımını engellenmektedir. Geniş sayıdaki hasta serileriyle yapılan pek çok çalışma ile invaziv olmayan prenatal RhD genotiplenmesinin doğruluğu kabul edilmiştir. İnvaziv olmayan fetal RhD genotiplenmesi rutin prenatal tanıda günümüzde İngiltere, Fransa ve Hollanda'da kullanılmaktadır²⁰.

Fetal DNA ile Tek Gen Bozukluklarının Saptanması

Maternal plazmadaki serbest fetal DNA'nın analizi; tek gen bozukluklarının prenatal tanısına zaman, doğruluk, güvenilirlik sağlama yanında maddi yönden uygun olmasıyla da önemli fırsatlar sunmaktadır^{20,34}. Geleneksel moleküler yöntemlerin kullanımıyla fetal DNA genotipinin belirlenebilmesi, gebeliğin erken evrelerinde mümkün olmaktadır. Günümüzde, ilk üç aydaki invaziv olmayan analiz yöntemleri arka plandaki maternal DNA nedeniyle fetal DNA'nın belirlenmesindeki duyarlılık ve özgüllüğü sınırlamaktadır (Şekil 14)¹. Buna rağmen maternal plazmadaki fetal DNA'nın zenginleştirilmesi, testlerin gücünü arttırılabilmekte ve yarı niceleyici analizlere izin vermektedir. Akondroplazi, hemoglobinopatiler, konjenital adrenal hiperplazi, kistik fibroz, Huntington hastalığı, Miyotonik distrofi gibi giderek genişleyen bir çeşitlilikte kalıtsal hastalıkların test edilmesine olanak sağlamaktadır³⁴.

Fetal DNA'nın maternal dolaşıma salınımı öncesinde babadan (kırmızı) ve anneden (yeşil) kalıtılan DNA molekülleri eşittir (Şekil 6A)¹. Maternal plazmada fetal DNA molekülleri arka planda maternal DNA dizilerinin bulunduğu bir ortamda dolaşırlar. Fetüsün anneden aldığı fetal DNA alelleri (yeşil) arka plandaki maternal dizi ile aynı genetik özelliktedir. Fetüsün

babadan aldığı alel (kırmızı) ise maternal plazmada fetüsün plazmada ayırt edilebilecek bir özgüllük kazandırmaktadır (Şekil 6B)¹.

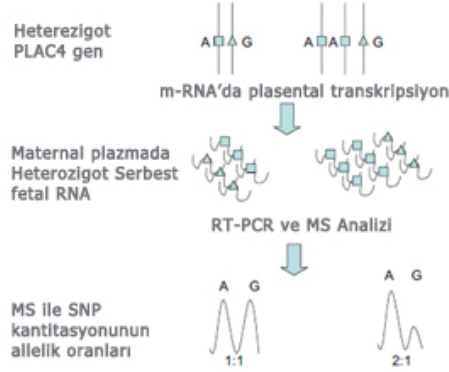
Hemoglobinopatiler

Günümüzde pek çok grup hemoglobinopatilerin invaziv olmayan prenatal tanısını geliştirebilmek için çalışmalar yapmaktadır³⁵. Bilindiği üzere genellikle beta talasemilerde olduğu gibi bazı mutasyonlar belirli etnik gruplarda bulunmakta ve risk altında bulunan birçok çift aynı mutasyonu taşımaktadırlar. Bu durumda babadan kalıtılan mutasyonun invaziv olmayan yöntemle saptanmasının bir anlamı olmamaktadır. Maternal plazmada babadan kalıtılan tekli nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) varlığının araştırılması, başka bir seçenek oluşturmada ise de plazmada maternal DNA'nın çok fazla miktarda olması, bu tür yöntemlerde özgüllük ve duyarlılığın çok yüksek olmasını gerektirmektedir³⁵.

İnsanoğlunda en sık görülen ve büyük bir halk sağlığı problemi oluşturan tekli gen bozuklukları arasında talasemi gelmektedir. Talasemi kuşağı özellikle Akdeniz bölgeleri, Orta Doğu, Hindistan'ın bazı kesimleri, Afrika ve Güney Çin'in Tayland'a uzanan bölgelerini de içine almaktadır. Bugüne kadar hemoglobin geninde beta talasemiye neden olan 400'e yakın mutasyon tanımlanmıştır³⁶. Beta globin geni, kromozom 11'in kısa kolu üzerinde beta benzer gen aile kümesinde yer alan yapısal bir gendir. Beta talasemiye neden olan çoğu nokta mutasyonu olup, beta geninin işlevsel olarak önemli bölgelerinde yer almaktadır. Diğerleri delesyon veya nükleotit eklenmesi şeklindedir³⁷. Beta globin genindeki anormaliler hemoglobinin yapısındaki globin zincirlerinden biri veya daha fazlasının sentezinin eksikliğine neden olmaktadır².

Hemoglobinopatiler için korunmada uygulanan bir önemli basamak, homozigot ve çifte heterozigot gebeliklerin saptanarak gebeliğin sonlandırılmasını sağlamaktır. Günümüzde beta talaseminin kesin tanısı moleküler yöntemlere dayanmaktadır. DNA temeline dayalı yöntemler; DNA kaynağı olarak amniyon sıvısı, koryonik vilüs örneği veya fetal kan örneği kullanılmaktadır. Prenatal tanının yapılmasında fetal DNA eldesi için kullanılan yöntemlerin invaziv olması ve bu yöntemlerin % 0,5-1 oranında komplikasyon riski oluşturması nedeniyle bu yöntemlerin invaziv olmayanlarla yer değiştirmesi gerektiği fikrini öne çıkarmıştır. Bu yaklaşımdan dolayı fetal hücrelerle yapılan çalışmalardan ilki Cheung ve ark. 1996'da beta talasemilerde "Alele Drop Out" yöntemi ile maternal kandan izole edilmiş fetal eritroblastlarla

yaptığı çalışmadır²². Talasemide fetal hücrelerle yapılan ikinci çalışma da maternal kandan izole edilmiş fetal eritroblastlarla tek hücre PCR yöntemi kullanılan çalışmadır^{38,39}.



Şekil 7. PLAC4 Geni için Serbest Fetal RNA'nın Trizomi 21'de Analizi⁴².

Plazma DNA Kimerizmi

Plazma DNA kimerizmi, tümör kaynaklı DNA veya fetal kaynaklı DNA gibi yabancı genetik materyallerin, bazı insanların dolaşımındaki keşfinden bu yana, yeni bir kavram olarak görülmektedir. DNA kimerizmi kavramı, mesane kanseri ve böbrek transplant hastalarının idrarındaki DNA'yı saptama sırasında geliştirilmiş ve kişide genetik olarak farklılık taşıyan hücrelerin bulunmasıyla tanımlanmıştır^{40,41}. Günümüze dek, insan dolaşımında çok çeşitli plazma DNA kimerizmleri bulunmuştur. Bu kimerizmlerin kökeni tümör ve fetal kaynaklı olup ayrıca 1998'de bildirilen karaciğer ve böbrek transplant hastalarının plazmalarında bulunan verici kaynaklı DNA'lardır¹⁸. Plazma DNA kimerizmindeki bulgular, tanıda, görüntüleme ve hastalığın takibinde belirteç olarak kullanıldığından beri, klinik uygulamalarda ayrıca bir önem kazanmıştır.

Fetal DNA Değişimlerini Arttıran Hastalıkların Saptanması

Fetal DNA değişimleri gebeliğin değişken şartlarından etkilenmektedir. Bazı araştırmacılar fetal DNA değişimlerindeki değişimlere bakarak bunun gebelik komplikasyonundan mı yoksa fetal anöploidi kaynaklı mı olduğunu araştırmışlardır²⁰.

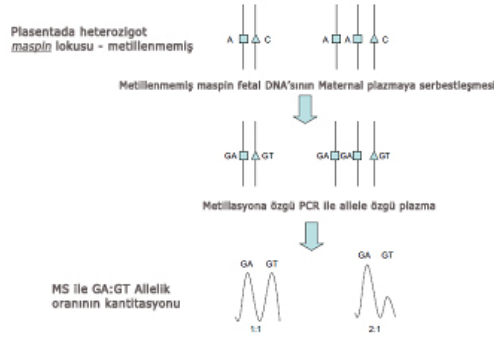
Preeklampsi

Preeklampsi, gebeliğe bağlı hipertansiyon (gebeliğin 20nci haftasından sonra en az iki kez sistolik basınç >140 mm Hg veya diastolik basınç >90 mm Hg olması) ile birlikte proteinüri (>3 g/gün) bulgusu ile tanımlanmaktadır. Pre-eklampsili gebelerin plazma DNA derişimindeki artışı ve bu durumun tanısında dolaşımdaki DNA düzeylerinin kullanılabilir bir belirteç olabileceği bildirilmiştir²⁰. Benzer başka bir çalışmada pre-eklampsili gebelerde plazma DNA düzeyinin artışı gösterilmiş fakat gelişme geriliği olan, preeklampsi olmayan gebe plazmalarında bu durum gösterilememiştir. Pre-eklampsinin patogenezi halen anlaşılammıştır. Uterus damarlarındaki bozulma ile vilüs trofoblastları zarar görmekte ve sonuçta hücre hasarı veya apoptoz oluşarak DNA'nın maternal dolaşıma geçtiği düşünülmektedir. Maternal plazmadaki fetal DNA'nın plasental hasarın bir belirteci olarak pre-eklampsi şiddetiyle fetal DNA düzeyleri arasındaki ilişkisinin incelenmesi sonucunda fetal DNA düzeyi ile proteinüri ve hipertansiyon arasında güçlü bir ilişki ortaya konmuştur²⁰.

Anöplodiler

Fetal anöplodilerin invaziv olmayan prenatal tanı ile saptanması, özellikle Trizomi 21 için çözümlenmesi gereken bir konu olarak görülmektedir. Fetal DNA'nın maternal plazmada dolaşımdaki total DNA'nın sadece % 3-5'ini oluşturması, fetal DNA'nın fetal anöplodileri saptamak için kullanılabilecek kısa ardışık tekrarların (STR) analizi veya tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) uygulanmasını güçleştirmektedir. Bu sınırlamalar seçenek olarak başka yöntemlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Günümüzde en iyi seçeneğin maternal plazmadaki plasentadan köken alan serbest fetal mRNA'nın varlığı olarak görülmektedir. Hong-Kong'taki araştırma grubu tarafından ortaya konan bu yöntemde temel avantaj, herhangi bir maternal dokuda sentezlenmeyen plasentaya özgü mRNA türlerinin seçiminin mümkün olmasıdır¹.

Kromozom 21 üzerinde bulunan plasentaya özgül gen (*PLAC4*) ile bu genin konumu itibarı ile Trizomi 21 tanısında önemli olabileceği düşüncesiyle pek çok çalışmalar yapılmıştır⁷. *PLAC4* geni mRNA'sı ile yapılan niceleyici çalışmalar, yeterli bilgi vermediğinden, MS'nin kullanımı ile fetal nokta mutasyonlarının saptanmasında başarı gösterilmiştir. Kromozom 21 düzeylerini belirtmek için *PLAC4* geni üzerindeki SNP bölgeleri kullanılmıştır. Fetüsün SNP için heterozigot olduğu olgularda *PLAC4* mRNA kopyaları her bir alelden eşit oranda gelmekte (1:1 oranı) ve normal ploidi göstermektedirler. Anöplodi varlığında ise bu oran 2:1 olmaktadır (Şekil 7)⁴².



Şekil 8. Trizomi 18'de Maspin Geni Çalışması⁴².

Fetal DNA'da kromozom 21 kaynaklı DNA dizilerinin kantitasyonu kromozom dozaj yöntemi olarak tanımlanan fetal DNA'daki referans bir dizi ile karşılaştırılarak yapılmaktadır. Normal gebeliklerde kromozom 21 oranı 2:2 iken trizomi 21 olgularında bu oran 3:2 olarak saptanmaktadır⁴³.

Epigenetik düzenlemeler, DNA'daki somatik değişimler olup genetik diziyi değiştirmemekte, fakat gen ifadesine etki etmektedir. Bu bilgi çerçevesinde serbest fetal DNA epigenetik düzenlemelerinin saptanması fetal anöplodilerin tanısında bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Epigenetik düzenlemeler içerisinde en çok açıklanan düzenlemeler, CpG adacıklarındaki sitozin metilasyonudur. Genetik dizinin hipermetilasyona uğraması genetik olarak ifade edilememesine neden olmaktadır. İkinci X kromozomunun epigenetik mekanizmalarla gen ifadesinin susturulması buna bir örnektir.

Maternal ve fetal DNA arasında metilasyondan kaynaklanan epigenetik farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılık, aynı nükleotid dizisine sahip serbest fetal DNA ve maternal DNA parçaları arasında ayrımı sağlamaktadır. Bu özellikten yararlanılarak kromozom 18 üzerinde yer alan *Maspin* genindeki fetal ve maternal metilasyon durumları arasındaki farklılık araştırılmıştır. Bu genin promotor bölgesi plasentada metillenmediği halde, maternal kanda hipermetilasyona uğradığı belirlenmiştir. Fetal DNA dizileri sitozinlerin metillenmesindeki farklılığa bağlı olarak maternal DNA dizisinden MS ile kolayca ayrılabilir. *Maspin* geni kromozom 18 üzerinde olduğundan araştırmacılar Trizomi 18 saptanmasında bu genin kullanılabilirliğini düşünmüşlerdir. Trizomi 21 için belirlenen yöntemde olduğu gibi gen

üzerinde bulunan SNP'lere göre benzer tanımlama kullanılmaktadır. Normal olgularda 1:1 oran ve anöploidi olgular için de 2:1 oranı belirlemişlerdir (Şekil 8)⁴². Analizlerde bu genin promotor bölgesinde A/C değişimi kullanılmıştır⁴². Zhang ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada kromozom 21 üzerindeki hipermetilasyona uğramış AIRE dizisi ve RASSF1A lokusunun trizomi 21'in invaziv olmayan prenatal tanısında maternal plazmadaki fetal DNA'nın saptanmasında özgün bir belirteç olarak tanımlanmıştır⁴³.

Sonuç

Günümüzde bazı fetal genetik özellikler invaziv olmayan yöntemlerle saptanabilmesine rağmen diğer Mendel bozuklukları veya fetal anöploidileri belirleme için daha pek çok çalışma yapmak gerektiği düşünülmektedir. Üretilen yeni teknolojilerle günümüzde fetal DNA çalışmaları gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Son dönemlerde fetal anöploidilerin tanısında serbest fetal RNA kullanımının, önemli bir belirteç olabileceği ileri sürülmektedir.

İnvaziv olmayan prenatal tanı için tek molekül analiz yöntemlerine dayalı dijital polimeraz zincir tepkimesi ve genomda seçilmiş belirli bölgelerin tek parça DNA dizileme gibi yöntemler kullanımı giderek artmaktadır. Bu durum pek çok çalışma grubunun gelecekte maternal plazmadan çoklu monojenik hastalıkların invaziv olmayan prenatal tanısının rutin olarak yapacağı düşüncesini kanıtlar niteliktedir.

Kaynaklar

1. Lo YMD, Chiu RWK. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet.* 2007; 8: 71-7.
2. Li Y. Biochemical and clinical diagnostic aspects of circulating nucleic acids (PhD thesis). Basel, University of Basel, 2005.
3. Resta RG. The historical perspective: the first prenatal diagnosis of a fetal abnormality. *J Genet Counsel.* 1997; 6:81-4.
4. Sürmeliler E. Prenatal tanı amaçlı kromozom analizi gerektiren amniyosentez endikasyonları ve sonuçlarının değerlendirilmesi (Tıpta uzmanlık tezi). Adana, Çukurova Üniversitesi, 2005.
5. Uğurlu T. Fetal kromozomal anomalilerin QF-PCR (Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu) ile tespiti ve etkinliğinin aminoasit kültürleri ile karşılaştırılması. İzmir, Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2007.
6. Yararbaş K, Ilgın-Ruhi H. Prenatal tanı. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 2006; 26:666-74.

7. Beksaç S, Aksan G, Özyüncü Ö. Amniosentez. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Özel Dergisi*. 2008;1:75-81.
8. Koryonik Villus Biyopsi (CVS) Testi: Hastalar ve Aileler İçin Bilgiler. <http://www.eurogentest.org/CVSTurkish.xhtml> (accessed Apr 2010).
9. Tongprasert F, Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W. Cordocentesis of multifetal pregnancies. *Prenat Diagn*. 2007; 27:1100-3.
10. Amniosentez, kordosentez, korion villus biopsisi. <http://annevebebekleri.blogcu.com/amniosentez-kordosentez-korion-villus-biopsisi/4012862> (accessed Apr 2010)
11. Laigaard J, Sorensen T, Placing S, Holck P, Fröhlich C, Wojdemann KR et al. Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2005; 106:144-9.
12. Traeger-Synodinos J. An evaluation of PGD in clinical genetic services through 3 years application for prevention of β -thalassaemia major and sickle cell thalassaemia. *Mol Hum Reprod*. 2003; 9:301-7.
13. Velde H, Georgiou I, Rycke MDe, Schots R, Sermon K, Lissens W et al. Novel universal approach for preimplantation genetic diagnosis of b-thalassaemia in combination with HLA matching of embryos. *Hum Reprod*. 2004; 19:700-8.
14. Preimplantasyon Genetik Tanı. <http://www.mikrogenlab.com/PreimplantasyonGenetikTani.aspx> (accessed Apr 2010)
15. Walknowska J. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet*. 1969; 1:1119-22.
16. Chiu RWK, Cantor CR, Lo YMD. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trend Genet*. 2009; 25:324-31.
17. Bianchi DW. Circulating fetal dna: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta*. 2004; 18:93-101.
18. Lo YMD. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350:485-7.
19. Lo YMD. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998; 62:768-75.
20. Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *Am J Obstet Gyn Res*. 2007; 33:747-64.
21. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet*. 2004; 41:289-92.
22. Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW. Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat Genet*. 1996; 145:264-8.

23. 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; 145C:5-17.
24. Herman JC, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *P Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:821-6.
25. Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YMD. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2002; 48:35-41.
26. Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *P Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:14753-8.
27. Ding C, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AYY et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis. *P Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:10762-7.
28. Wataganara T, Chan AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatjal L, Bianchi DW et al. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril.* 2004; 81:638-44.
29. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonat Med.* 2008; 13:69-75.
30. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouamnic JM, Ernault P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn.* 2001; 21:1070-4.
31. Rijnders RJP, van der Looij RB, Peters EDJ, Goeree JK, van der Schoot CE, Ploos van Amstel JK et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2003; 23:1042-4.
32. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, LeShane E, Johnson KL et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2006; 26:831-6.
33. Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh Status. *Semin Fetal Neonat Med.* 2008; 13:63-8.
34. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonat Med.* 2008; 13:76-83.
35. Hartevelde CL, Kleanthous M, Traeger-Synodinos J. Prenatal diagnosis of hemoglobin disorders: present and future strategies. *Clin Biochem.* 2009; 42:1767-79.
36. HbVar: A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter> (accessed Mar 2010).
37. May C, Sadelain MA. Promising genetic approach to the treatment of beta-thalassemia. *Trends Cardiovas Med.* 2001; 11:276-80.

38. Naro DE, Ghezzi F, Vitucci A, Tannoia N, Campanale D, D'Addario V et al. Prenatal diagnosis of β -thalassemia using fetal erythroblasts enriched from maternal blood by a novel gradient. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:571-4.
39. Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KK, Chui DHK, Lo YMD. Prenatal exclusion of β thalassemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002; 360(9338):998-1000.
40. Li Y, Naro ED, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for β -thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA.* 2005; 293:843-9.
41. Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:1887-93.
42. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonat Med.* 2008; 13:57-62.
43. Zhang M, Li T, Chen J, Li L, Zhou C, Wang Y et al. Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by dosage ratio of fetal chromosome-specific epigenetic markers in maternal plasma. *J Huazhong Univ Sci Technol.* 2011; 31:687-92.

Correspondence Address / Yazışma adresi:

Ebru Dünder Yenilmez
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Adana, Turkey
e-mail: edundar@cu.edu.tr