

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2024;17(2):311-322

doi:10.26559/mersinsbd.1484968

Maternal serumdan doğrudan-PCR ile fetüsün cinsiyetinin belirlenmesi

 Uğur Akpulat¹,  Çiğdem Eresen Yazıcıoğlu²

¹Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kastamonu, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Fetüsün sağlık durumunu ciddi ölçüde etkileyebilecek anöploidiler ve cinsiyete bağlı geçiş gösteren genetik hastalıklar için, günümüzde maternal dolaşımdaki fetüse ait serbest DNA'nın incelenmesine dayanan analizler, girişimsel yöntemlere bağlı komplikasyonları en aza indirmek amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu analizlerin güvenilirliğini etkileyen başlıca etken analiz edilebilir miktarda fetüse ait DNA'nın elde edilebilirliğidir. Maternal dolaşımdaki serbest DNA'nın izolasyonu sırasında kaynaktaki miktara göre her zaman bir kayıp yaşanmaktadır. Bu gibi durumlarda alternatif bir yaklaşım da kaynağın herhangi bir izolasyon işlemi yapılmadan kalıp olarak kullanıldığı doğrudan-PCR yöntemi ile analiz edilmesidir. Çalışmamızda PCR analizi ile fetüsün cinsiyetini belirlemede maternal serumun doğrudan kullanılabilirliği test edilmiştir. **Yöntem:** Fetüsün cinsiyetini belirlemek amacıyla Y kromozomu üzerindeki DYS14 ve SRY genlerine özgü PCR reaksiyonları tasarlanmıştır. Analiz edilmek üzere 40 gebe kadının serum örneği araştırmaya dahil edilmiştir. Serum örneklerinin Y kromozomu için tasarlanan reaksiyonlarında özgün amplifikasyon görülmesi durumunda fetüsün cinsiyeti erkek, görülmemesi durumunda dişi olarak kabul edilmiştir. Özgün amplifikasyonun görülmediği durumlarda DNA'nın varlığı GAPDH'e özgü PCR ile teyit edilmiştir. **Bulgular:** PCR analizi ile elde edilen sonuçlar ile klinik sonuçlar karşılaştırıldığında, doğrudan-PCR analizi ile fetal cinsiyeti belirleme duyarlılığının %87.5, özgünlüğünün %81.8 ve pozitif tahmin değerinin (PPV) %91.3 olduğunu ortaya koymuştur. **Sonuç:** Elde edilen sonuçlar, fetüsün genetik durumunu ortaya koymak amacıyla, gebe kadınların serum örneklerinin doğrudan moleküler analizlerde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Serbest fetal DNA, maternal serum, doğrudan-PCR, DYS14, SRY

Yazının geliş tarihi: 16.05.2024

Yazının kabul tarihi: 05.07.2024

Sorumlu Yazar: Uğur Akpulat, Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kuzeykent/Kastamonu. Tel: 0366 2807226, E-posta: uakpulat@kastamonu.edu.tr

NOT: Bu araştırma; "Maternal Periferik Kanda Fetal Genomik DNA'nın Belirlenmesi" başlıklı tezden üretilmiştir.

Direct PCR-based determination of fetal gender from maternal serum

Abstract

Aim: Current analyses based on the examination of cell-free fetal DNA in maternal circulation are widely preferred to minimize complications associated with invasive methods, particularly for detecting aneuploidies and genetic disorders with sex-dependent inheritance that could significantly affect the fetal health. One of the primary factors influencing the reliability of these analyses is the availability of analyzable amounts of fetal DNA. During the isolation of cell-free DNA in maternal circulation, it is not always possible to isolate the entirety of the DNA present in the source material. In such cases, an alternative approach is to directly analyze the source material without any isolation process by using a direct PCR method. In our study, the feasibility of using maternal serum directly in PCR analysis for determining fetal sex was tested. **Method:** PCR reactions specific to the DYS14 and SRY genes on the Y chromosome were designed to determine the fetal sex. Serum samples from 40 pregnant women were included in the study for analysis. In the reactions designed for the Y chromosome, the sex of the fetus was assumed to be male if specific amplification was observed and female if not. In cases where specific amplification was not observed, the presence of DNA was confirmed with PCR specific to GAPDH. **Results:** When comparing the results obtained from PCR analysis with clinical outcomes, it was determined that the sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) of determining fetal sex via direct-PCR analysis were 87.5%, 81.8%, and 91.3%, respectively. **Conclusion:** The obtained results demonstrate that serum samples from pregnant women can be directly utilized in molecular analyses to reveal the genetic status of the fetus.

Keywords: Cell-free fetal DNA, maternal serum, direct-PCR, DYS14, SRY

Giriş

Gebelik sürecinde fetüsün genetik bir durumdan kesin olarak etkilenip etkilenmediğinin belirlenebilmesi için fetüsün genetik materyaline ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla fetüsün hücrelerinin doğrudan toplanabildiği koryon villus örnekleme, amniyosentez ve fetal kan örnekleme yöntemleri altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler girişimsel doğalarından dolayı fetüsün ve annenin maruz kaldığı çeşitli komplikasyonlar barındırmaktadır. Tümü fetüsün kaybına yol açabilirken, amniyosentezde bu risk %0.13 ve fetal kan örneklemesinde ise %1-3 arasındadır. Amniyosentezde en sık gözlenen komplikasyon amniyotik sıvının sızıntısıdır (%1-2). Koryon villus örneklemesinde ise ekstremiteelerde gelişme geriliği, intrauterin enfeksiyon ve membran yırtılması gözlenebilmektedir.¹⁻⁴ Bu tür komplikasyonların önüne geçmek için girişimsel olmayan çeşitli tarama yöntemlerine başvurulmaktadır. Bu amaçla, insan koryonik gonadotropin, gebelikle

ilişkili plazma protein A, alfa fetoprotein, inhibin A ve konjuge olmamış östriol proteinlerinin maternal serumdaki seviyeleri, ultrason ile bakılan fetüsün nokal translusensi ölçüm değeriyle ve annenin yaşı, kilosunu, daha önceki gebelik öyküsü ve mevcut fetüs sayısı ile birlikte değerlendirilerek fetüs için bir risk değeri hesaplanmaktadır. Genel olarak bu değer 1/300'den daha yüksek çıkması durumunda gebelere girişimsel testler önerilmektedir.⁵

Yakın zamanda maternal plazma ve serumda fetüse ait DNA'nın bulunduğu gösterilmesiyle, fetüsün genetik materyaline ulaşmanın girişimsel olmayan bir yolu ortaya çıkmıştır.⁶ Bu sayede prenatal tanı ve tarama testlerinde hala gelişim aşamasında olan yeni bir dönem başlamıştır.⁷ Serbest fetal DNA, anne ile fetüs dolaşımı arasında plasental bir bariyer oluşturan sinsiyo trofoblast hücrelerinden orijin almaktadır.⁸ Hücrelerin apoptoza uğraması sonucu fetal DNA dolaşıma katıldığından, DNA parçalara ayrılmış olarak bulunmaktadır ve parçaların ortalama uzunluğu ≤ 300 bp civarındadır.⁹ Bu

büyüklik moleküler yöntemler ile fetüsün paternal kökenli genetik içeriğini maternal DNA'dan ayırt etmeye yettiğinden, fetüsün sağlığını etkileyen yaygın ve ciddi birçok genetik hastalığın analizine imkan tanımaktadır. Günümüzde Rh kan grubu uyumsuzluğunu belirlemede; X kromozomuna bağlı kalıtım gösteren hastalıklar için fetüsün cinsiyetini belirlemede ve yaygın gözlenen 21, 13, 18, X ve Y kromozomlarının anöploidisinde rutin bir test olarak maternal dolaşımdaki serbest fetal DNA'nın analizi yapılmaktadır.¹⁰

Maternal dolaşımdaki serbest fetal DNA oldukça düşük miktarda bulunmaktadır. Maternal plazmanın bir mililitresinde gebeliğin erken dönemlerinde 25.4 genom eşdeğeri ve geç döneminde 292.2 genom eşdeğeri serbest fetal DNA'nın olduğu bildirilmiştir.¹¹ Maternal dolaşımdaki serbest DNA'nın birinci trimester döneminde %10'u üçüncü trimester döneminde ise %30'u fetal DNA'dan oluşmaktadır.^{12,13} Gebeliğin ilerlemesine bağlı olarak serbest fetal DNA miktarında artış olmasının yanında, annenin vücut kitle indeksi, çeşitli metabolik hastalıklar, preeklampsi gibi çeşitli komplikasyonlar, fetal anöploidiler ve ikiz gebelik varlığı gibi durumlar da fetal DNA'nın miktarını etkilemektedir.^{14,15} Orijin aldığı dokunun doğası ve mevcut moleküler yöntemlerin duyarlılıkları gereği fetal DNA ilk olarak gebeliğin 5-7'inci haftasında belirlenebilmekte olup gebelik sonuçlanıncaya kadar tespit edilebilmektedir.^{16,17} Çok az miktarda bulunması, küçük parçalar halinde olması ve miktarının anne ve fetüsün sağlığından etkilenmesi gibi biyolojik sebepler ile gebelik sürecinde anne ve fetüsün sağlığı açısından tanının olabilecek en erken sürede koyulması gerekliliği, fetal DNA'nın moleküler yöntemler ile analiz edilebilmek amacıyla elde edilebilirliğini oldukça kritik bir öneme getirmektedir.

Fetal DNA'nın etkin bir şekilde izolasyonu ve zenginleştirilmesi tanının doğruluğunu güçlendirmek açısından kritik bir öneme sahip olmasına rağmen, günümüzde prenatal tanı amaçlı standart kabul görmüş bir izolasyon yöntemi

bulunmamaktadır. Sıvı biyopsilerden yaygın olarak serbest DNA izolasyonu, nükleik asitlere afinitesi yüksek kolonların ya da manyetik boncukların kullanıldığı DNA'nın saflaştırılmasını ve zenginleştirilmesini hedefleyen ticari kitler aracılığı ile ya da standart fenol-kloroform temelli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.¹⁸ Farklı yöntemler arasında elde edilen DNA'nın miktarı bakımından varyasyonlar bulunurken hepsinde mutlaka kaynaktaki miktara göre izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarında kayıp yaşanmaktadır.^{19,20} DNA kaybının önüne geçmek için alternatif tanı yaklaşımlardan birisi de biyolojik örneğin DNA izolasyonu yapılmadan PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldığı doğrudan-PCR yöntemidir. Özellikle hedef DNA miktarının kısıtlı olduğu ve zenginleştirme gerektirdiği biyolojik örneklerin analizlerinde ya da hızlı ve ekonomik bir yaklaşımın benimsenmesi gerektiği durumlarda doğrudan-PCR yönteminden yararlanılmaktadır.²¹⁻²⁶ Çalışmamızda, doğrudan-PCR'in maternal serumdaki fetal DNA'yı belirlemede kullanılıp kullanılmayacağı değerlendirilmiştir. Bu amaçla Y kromozomuna özgü *DYS14* ve *SRY* bölgeleri özgün primerler ile analiz edilerek fetüsün cinsiyetinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Katılımcılar ve serum örneklerinin toplanması

Araştırmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde, 2006 yılında çeşitli sebeplerden tarama testlerinin ya da amniyosentez analizinin yapılması yönünde değerlendirilmiş olan 40 gebe kadın dahil edilmiştir. Araştırmanın içeriği, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından 21/12/2004 tarih ve 206 sayı numarasıyla onaylanmıştır. Katılımcılar rastgele seçilmiştir ve kan örnekleri alınmadan önce araştırma hakkında bilgilendirildiklerine ve gönüllü olarak katıldıklarına dair imzalı onay alınmıştır. Kan örneklerinin toplanması ve PCR analizleri, klinik yöntemlerle fetüsün cinsiyeti belirlenmeden önce yapılmıştır.

Fetüsün kesin cinsiyeti amniyosentez uygulanan gebeliklerde sitogenetik analiz ile, uygulanmayanlarda gebeliğin 20. haftasından sonra yapılan ultrasonografi bulgularıyla ya da doğum sonuçları ile belirlenmiştir. Ayrıca ultrasonografi ile cinsiyeti belirlenen fetüslerin doğum sonrası cinsiyetleri teyit edilmiştir. Bununla birlikte, PCR analizlerinin özgünlüğünü ve duyarlılığını belirlemek için beş sağlıklı erkekten ve negatif kontrol olarak kullanmak amacıyla beş sağlıklı gebe olmayan kadından kan örneği alınmıştır.

Serum örneklerini hazırlamak için, pıhtılaşma aktivatörü ve serum ayırıcı jel içeren tüplere (BD vacutainer serum separated type II tube, SST tube) 4-8ml venöz kan alınmıştır. Pıhtılaşma için 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, tüpler 3000g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan serum fazı, Dnaz içermeyen yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra analiz edileceği zamana kadar -86°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

Doğrudan PCR reaksiyonu ve PCR bulgularının klinik sonuçlar ile karşılaştırılması

Serum örneklerini PCR reaksiyonlarında doğrudan kalıp olarak kullanabilmek amacıyla, örnekler kaynatma ön işleminden geçirilmiştir. 400µl serum örneği 0.5 ml hacimli Dnaz içermeyen steril eppendorf tüp içerisinde 99°C'deki su banyosunda 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Isıtma işleminden sonra 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst kısmında biriken temiz süpernatant PCR reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Maternal serumdan fetüsün cinsiyetini belirleyebilmek için PCR reaksiyonunda özgün primerler ile Y kromozomuna özgü DYS14 (Testis Specific Protein Y-Linked 1) ve SRY (Sex Determining Region Y) genleri hedeflenmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda özgün amplifikasyon görülmesi durumunda fetüsün erkek cinsiyete sahip olduğu, özgün amplifikasyonun gözlenmemesinde ise fetüsün dişi cinsiyette olduğu değerlendirilmiştir. Dişi cinsiyet PCR

reaksiyonunun negatif sonuçlanması ile belirlendiğinden, PCR için kalıp olarak kullanılan serum örneğinde PCR reaksiyonuna izin verecek DNA'nın bulunup bulunmadığının teyit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Y kromozomuna özgü PCR reaksiyonlarında özgün amplifikasyonun gözlenmediği durumlarda DNA'nın varlığı otozomal bir lokus olan GAPDH genine özgün primerler ile gösterilmiştir. DYS14 için, 5'-CATCCAGAGCGTCCCTGGCTT-3' ve 5'-CTTCCACAGCCACATTTGTC-3' primer çifti kullanılmıştır; amplifikasyon ürünü 198bp uzunluğundadır. SRY için, 5'-GGCAACGTCCAGGATAGAGTGA-3' ve 5'-TGCTGATCTCTGAGTTTCGCATT-3' primer çifti kullanılmıştır; amplifikasyon ürünü 115bp uzunluğundadır. GAPDH için, 5'-CCCCACACATGCACTTACC-3' ve 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3' primer çifti kullanılmıştır; amplifikasyon ürünü 97bp uzunluğundadır. Her bir PCR reaksiyonu toplam 50 µl hacimde hazırlanmış olup; DYS14 ve GAPDH için reaksiyonlar, son konsantrasyonları 0.4 pmol/µl olan forward ve reverse primer çifti, 0.05 U/µl hot start taq polimeraz (Fermantas), 0.2 mM dNTP-mix (Fermantas), 2.5 mM MgCl₂ ve 1X reaksiyon tamponundan oluşan karışıma 20µl serum örneğinin eklenmesi ile kurulmuştur. SRY için hazırlanan PCR reaksiyonunda farklı olarak MgCl₂'nin konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Özgün amplifikasyonların gerçekleşebilmesi için DYS14 ve GAPDH'in reaksiyon karışımları, 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonuna bırakıldıktan sonra; 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 57°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika uzama aşamalarından oluşan 45 döngülük ısı profiline maruz bırakılmıştır; döngülerin tamamlanmasından sonra 72°C'de 10 dakika son uzama işlemi gerçekleştirilmiştir. SRY'nin amplifikasyonu, diğerlerinden farklı olarak primer bağlama ısısı 59°C olarak ayarlanmıştır.

Tüm PCR ürünleri, 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmış 0.7 µl/ml EtBr içeren %2'lik agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüleri, Bio Imaging Systems (Synegene) görüntüleme cihazında EagleSight yazılımı (Stratagene)

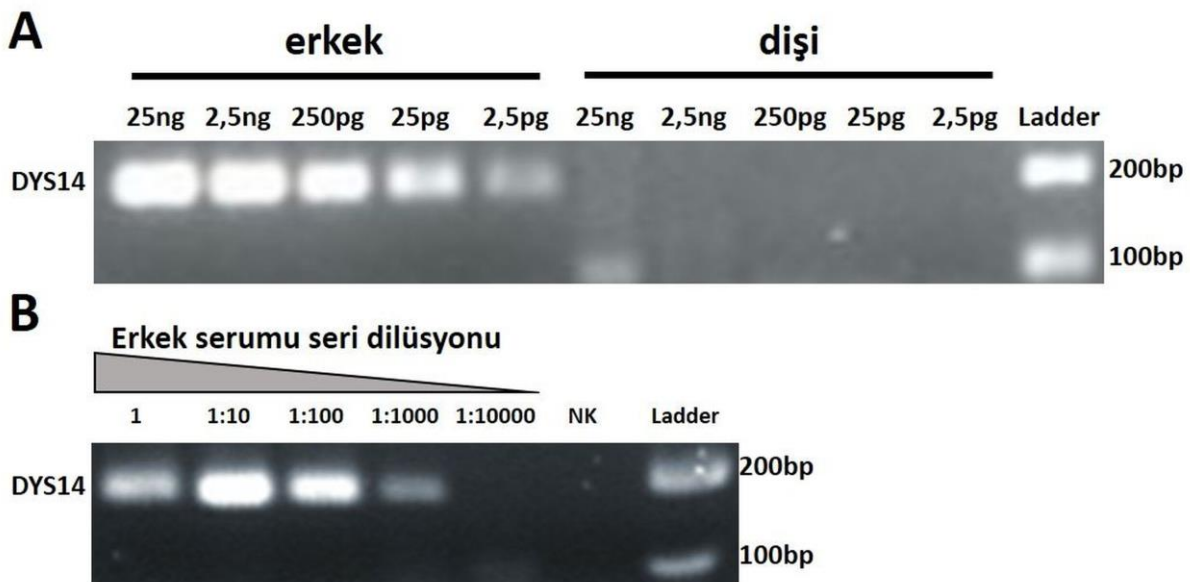
aracılığı ile elde edilmiştir. PCR ürünlerinin uzunlukları, jele yüklenen 100 bp DNA ladder (Fermantas GeneRuler) yardımı ile belirlenmiştir.

Y kromozomuna özgün bölgelerin PCR reaksiyonları her bir gebe kadın serumu için üç kez tekrar edilmiştir. Üç reaksiyondan en az iki tanesinde özgün amplifikasyon görülmesi durumunda fetüsün cinsiyeti erkek olarak kabul edilmiştir. Özgün amplikonun görülmemesi durumunda ya da reaksiyonlardan sadece bir tanesinde amplifikasyon gerçekleşmesi durumunda fetüsün cinsiyeti dişi olarak kabul edilmiştir.

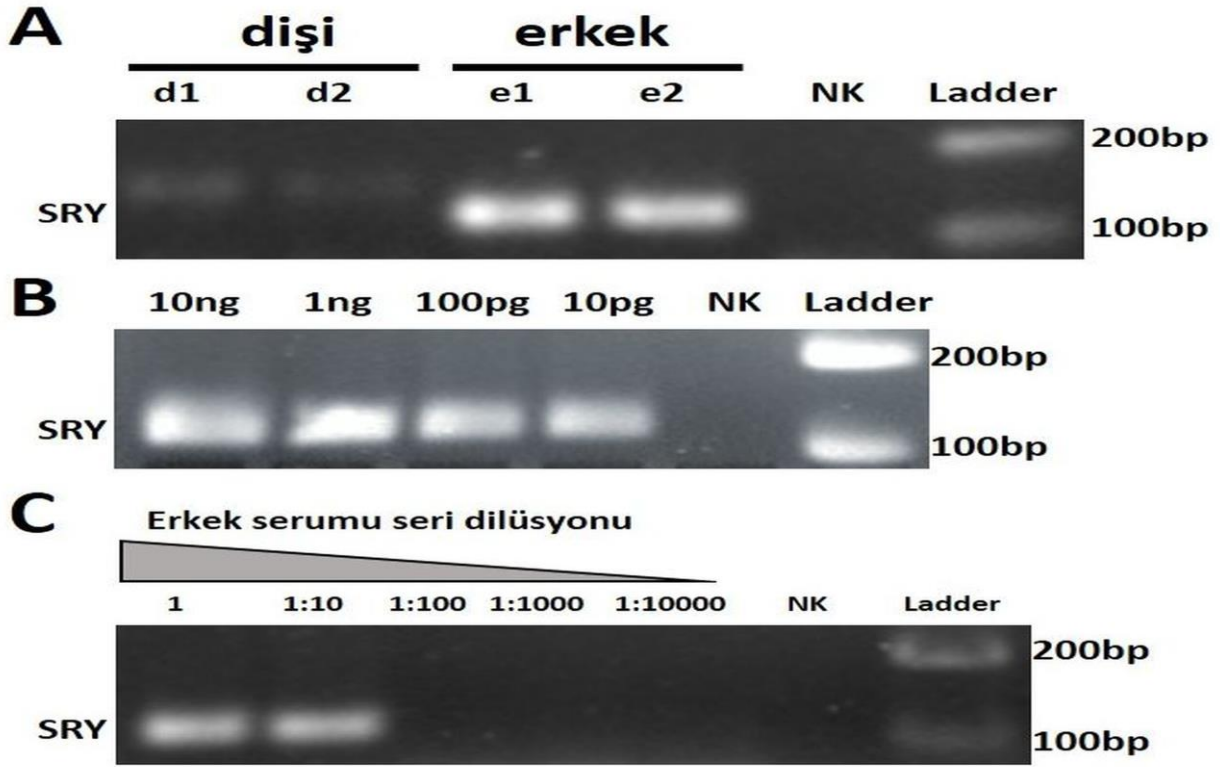
Bulgular

DYS14, SRY ve GAPDH genleri için tasarlanan PCR koşullarının en az hangi miktardaki DNA'yı amplifiye edebildiğini belirleyebilmek için sağlıklı bir erkekten izole edilen DNA'nın seri dilüsyonu hazırlanarak her bir gen için PCR reaksiyonu kuruldu. DYS14 ile en az 2.5 pg/μl (Şekil 1A), SRY ile 10 pg/μl (Şekil 2B) ve GAPDH'in PCR reaksiyonu ile 10 pg/μl konsantrasyondaki DNA (Şekil 3A) amplifiye edilebilmiştir.

Fetüsün cinsiyetini belirlemek için PCR reaksiyonlarında kalıp olarak izole edilmiş saf DNA yerine doğrudan maternal serum kullanılacağından, her bir gen için tasarlanan PCR reaksiyonlarının en az ne kadar dilüsyondaki serumun içinde bulunan DNA'yı amplifiye edebileceği test edilmiştir. Bu amaçla erkek serumunun, 1:10000 konsantrasyona kadar dilüsyonu hazırlanmış ve PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır. DYS14 ile 1:1000 (Şekil 1B), SRY ile 1:10 (Şekil 2C) ve GAPDH'in PCR reaksiyonu ile 1:100 dilüsyondaki (Şekil 3B) serumun içinde bulunan DNA'nın amplifikasyonunun yapılabildiği belirlenmiştir. Maternal serumdan fetüsün cinsiyeti, Y kromozomuna özgü tasarlanmış PCR reaksiyonlarının amplifikasyon ürünlerine göre belirleneceğinden, dişi cinsiyetin varlığı aslında PCR'ın negatif sonucu üzerinden gösterilmektedir. Bu sebeple DYS14 ve SRY için tasarlanan PCR reaksiyonlarının dişi genomunda amplifikasyon yapıp yapmadıkları da belirlenmiştir. Her iki PCR tasarımının da dişilerden izole edilen DNA'yı amplifiye etmediği, sadece erkek genomuna ait DNA'yı amplifiye ettikleri belirlenmiştir (Şekil 1A ve Şekil 2A).



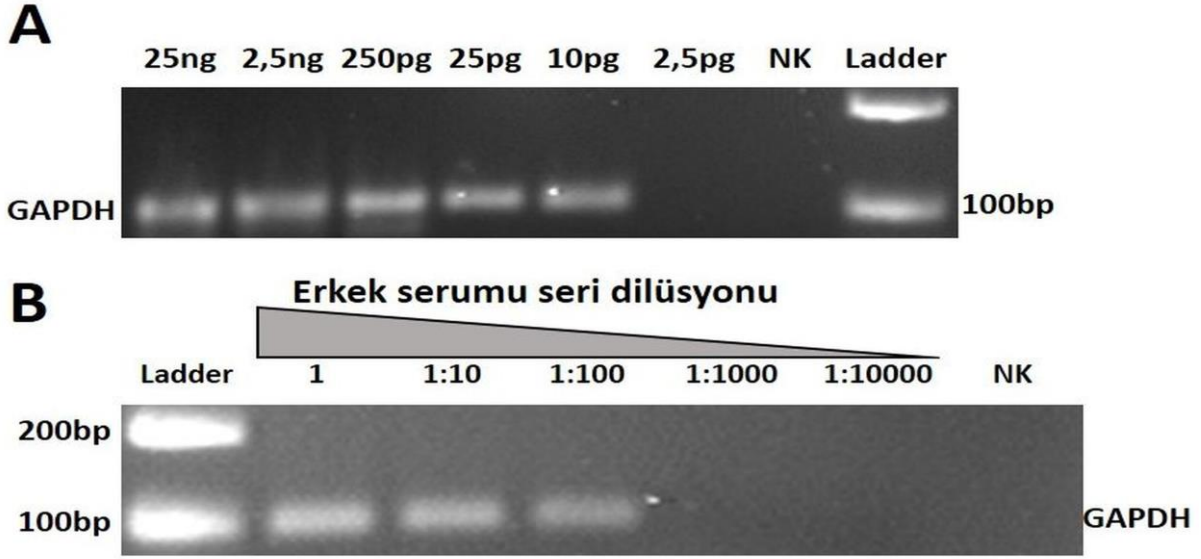
Şekil 1. DYS14 geni için tasarlanan PCR reaksiyonunun duyarlılık ve özgünlüğü: Erkek ve dişi bireylerden izole edilen DNA'nın DYS14 geni PCR reaksiyonlarının (A) ve erkek serumunun doğrudan PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldığı DYS14 geni PCR reaksiyonlarının sonuçları (B). NK, negatif kontrol; bp, baz çifti. 100 bp'lik ladder kullanılmıştır.



Şekil 2. SRY geni için tasarlanan PCR reaksiyonunun duyarlılık ve özgünlüğü: Erkek ve dişi bireylerden izole edilen DNA'nın SRYgeni PCR reaksiyonları sonuçları (A). Erkek bireyden izole edilen DNA'nın seri dilüsyonunun SRY geni PCR reaksiyonları sonuçları (B). Erkek serumunun doğrudan PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldığı SRY geni PCR reaksiyonlarının sonuçları (C). NK, negatif kontrol; bp, baz çifti. 100 bp'lik ladder kullanılmıştır.

Fetüsün cinsiyetini belirlemek amacıyla 40 gönüllü gebe kadından serum örneği toplanmıştır. Gönüllülerden 2 tanesinin serum örneği laboratuvara isimsiz gönderildiği için moleküler analizlere dahil edilmemiştir. Ayrıca 3 tane katılımcının serum örnekleri toplanmasına rağmen, çeşitli sebeplerden dolayı kadın doğum polikliniğindeki takibi bıraktıkları için fetüslerinin gerçek cinsiyetleri klinik testler ya da doğum sonucu ile belirlenememiştir. Bu sebeplerden ötürü doğrudan-PCR ile fetüsün cinsiyetini belirleme analizlerine 35 gebelik dahil edilmiştir. Fetüslerin gerçek cinsiyetleri, amniyosentez, ultrasonografi ve doğum sonucu ile belirlenmiştir. Ultrasonografi ile cinsiyeti belirlenenlerin cinsiyetlerini teyit etmek için doğum sonrası sonuçları kullanılmıştır. Maternal serum örneklerinden fetal cinsiyetin belirlenmesi analizleri, Y kromozomunu tanımlama duyarlılığı SRY genine göre daha yüksek

olduğu için sadece DYS14 geninin PCR reaksiyonları ile gerçekleştirilmiştir. Klinik sonuçlarına göre 35 gebeliğin 11'i dişi 24'ü erkek cinsiyete sahiptir (Tablo 1). PCR analizleri sonucunda fetüslerin 12'sinin dişi, 23'ünün erkek cinsiyette olduğu belirlenmiştir. Dişi fetüs belirlenen serum örneklerinin tümünün GAPDH geni PCR analizlerinde özgün amplifikasyon tespit edilmiştir. Her bir gebeliğin klinik sonucu, PCR ile belirlenen cinsiyet ile karşılaştırıldığında, 35 gebelikten 21 tanesi gerçek pozitif (erkek), 9 tanesi gerçek negatif (dişi), 2 tanesi yalancı pozitif (dişi fetüsler PCR ile erkek olarak belirlendi) ve 3 tanesi yalancı negatif (erkek fetüsler PCR ile dişi olarak belirlendi) sonuç vermiştir (Tablo 1). Elde edilen sonuçları, doğrudan-PCR analizi ile fetüsün cinsiyetini belirleme duyarlılığının %87.5, özgünlüğünün %81.8 ve pozitif tahmin değerinin (PPV) %91.3 olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 3. GAPDH geni için tasarlanan PCR reaksiyonunun duyarlılık ve özgünlüğü: İzole edilen DNA'nın seri dilüsyonunun GAPDH geni PCR reaksiyonları sonuçları (A). Erkek serumunun doğrudan PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldığı GAPDH geni PCR reaksiyonlarının sonuçları (B). NK, negatif kontrol; bp, baz çifti. 100 bp'lik ladder kullanılmıştır.

Tablo 1. Fetüslerin klinik cinsiyet sonuçları ile doğrudan-PCR ile belirlenen cinsiyetlerinin kıyaslanması

Örnek numarası	Gebelik haftası	Fetüsün cinsiyeti	Cinsiyet belirleme yöntemi	DYS14 sonucu	Test Sonucu
1	11h+3g	XY	AS	XX	YN
2	11h+4g	XY	AS	XY	GP
3	12h+1g	XY	D	XY	GP
4	12h+4g	XY	AS	XY	GP
5	13h+4g	XY	USG	XY	GP
6	15h+3g	XY	AS	XY	GP
7	15h+4g	XX	AS	XX	GN
8	15h+5g	XY	AS	XY	GP
9	15h+5g	XX	D	XX	GN
10	16h+1g	XY	USG	XY	GP
11	16h+1g	XY	USG	XY	GP
12	16h+2g	XY	D	XY	GP
13	16h+3g	XX	USG	XY	YP
14	16h+4g	XY	D	XY	GP
15	16h+6g	XY	AS	XY	GP
16	16h+6g	XX	D	XY	YP
17	17h	XX	D	XX	GN
18	17h	XX	AS	XX	GN
19	17h+2g	XY	AS	XY	GP
20	17h+3g	XX	D	XX	GN

AS, Amniyosentez; USG, ultrasonografi; D, doğum; GP, gerçek pozitif; GN, gerçek negatif; YP, yalancı pozitif ve YN, yalancı negatif

Tablo 1'in devamı: Fetüslerin klinik cinsiyet sonuçları ile doğrudan-PCR ile belirlenen cinsiyetlerinin kıyaslanması

Örnek numarası	Gebelik haftası	Fetüsün cinsiyeti	Cinsiyet belirleme yöntemi	DYS14 sonucu	Test Sonucu
21	17h+4g	XY	D	XY	GP
22	18h	XY	USG	XX	YN
23	18h	XX	D	XX	GN
24	19h	XY	USG	XY	GP
25	19h+3g	XY	D	XY	GP
26	20h	XY	USG	XY	GP
27	20h	XX	USG	XX	GN
28	20h	XY	USG	XY	GP
29	21h	XY	D	XX	YN
30	21h+5g	XX	D	XX	GN
31	22h	XY	USG	XY	GP
32	24h	XY	USG	XY	GP
33	24h	XY	USG	XY	GP
34	24h	XY	USG	XY	GP
35	24h	XX	D	XX	GN

AS, Amniyosentez; USG, ultrasonografi; D, doğum; GP, gerçek pozitif; GN, gerçek negatif; YP, yalancı pozitif ve YN, yalancı negatif

Tartışma

Prenatal tanının amacı hem hasta bireylerin hem de ebeveynlerin yaşamlarını psikolojik ve ekonomik olarak etkileyen, aynı zamanda ulusal sağlık sistemlerine ekonomik bir yük getiren genetik hastalıkların görülme sıklığını ve yaygınlığını azaltmaktır. Maternal serumda fetüse ait serbest DNA'nın var olduğunun bulunması ile birlikte, prenatal tanı ve taramada kullanılan geleneksel yaklaşımların yanında, fetüsün genetik bir hastalık bakımından durumunun değerlendirilebildiği yeni bir yaklaşım kullanıma girmiştir.²⁷ Günümüzde özellikle yaygın gözlenen anöploidiler olmak üzere, Rh kan grubu uyumsuzluğu durumunda ve fetüsün cinsiyetini belirlemede serbest fetal DNA'dan yaygın olarak yararlanılmaktadır. Serbest fetal DNA uygulamaları ülkemizde, fetüsün cinsiyetinin belirlenmesi²⁸, Rh durumunun tespit edilmesi^{28,29}, preeklampsi ile ilişkisinin ortaya koyulması³⁰, orak hücre anemisi ve β -talasemi gibi tek gen hastalıklarının tanısının yapılması³¹ ve plasentaya bağlı obstetrik

komplikasyonların tanımlanmasında³² gibi bir çok araştırmanın konusu olmuştur.

Hedeflenen genetik durum, uygulanan analiz yöntemi, uygulandığı laboratuvar gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak testlerin tespit oranları, doğrulukları ve özgünlükleri arasında varyasyonlar gözlenebilmektedir. Maternal plazmadan nested-PCR ile fetüsün cinsiyetinin belirlendiği bir çalışmada, fetüslerin %91.7'sinin cinsiyeti doğru belirlenebilmiş olup, 24 dişi fetüsten 3 tanesinin cinsiyeti hatalı olarak erkek belirlenmiştir.³³ Fetüsün cinsiyetinin belirlendiği başka bir çalışmada, konvansiyonel PCR'in duyarlılık ve özgünlük değerleri sırasıyla % 95.6 ve %98 olarak belirlenirken; gerçek zamanlı PCR ile sırasıyla %91.8 ve %100 değerlerine ulaşılmıştır. Bununla birlikte konvansiyonel PCR ile bir fetüsün cinsiyeti yanlış belirlenirken, dört fetüsün cinsiyeti belirlenememiştir.³⁴ Anöploidilerin belirlenmesinde serbest fetal DNA analizi sonuçları oldukça varyasyon göstermektedir. Yirmi binden fazla gebe kadının dahil edildiği bir çalışmada, düşük

ve yüksek risk taşıyan gebeler arasında trizomi 21 için pozitif tahmin değerinin sırasıyla %85.7 ve %97.5 olduğu; trizomi 18 için sırasıyla %50 ve %81.3 olduğu ve trizomi 13 için sırasıyla %62.5 ve %83.3 olduğu belirlenmiştir.³⁵ Cinsiyet kromozomu anöploidilerinin değerlendirildiği 45773 gebe kadının dahil edildiği bir çalışmada, 45,X, 47,XXX, 47,XXY ve 47,YYY için pozitif tahmin değerinin sırasıyla %12.5, %51.7, %66.7 ve %83.3 olduğu bulunmuştur.³⁶

Maternal dolaşımdaki serbest fetal DNA ile fetüsün genetik durumunun analiz edildiği testlerin güvenilirlik skorlarını etkileyen en önemli etken fetal DNA'nın analiz edilebilir miktarda bulunurluğudur. Maternal dolaşımdaki serbest fetal DNA'nın maternal serbest DNA'ya göre oranının %4 olduğu durumda tespit etme oranının %62.1, %9 ve üzerinde olduğunda bu oranın %100'e çıktığı bulunmuştur.³⁷ Bu sebeple birçok laboratuvar %4'lük serbest fetal DNA oranını, test sonucunu açıklayabilmek için güvenilirliğin bir eşiği olarak kabul etmektedir.³⁸ Ayrıca serbest fetal DNA oranı düşük seyrettiği için genel olarak gebeliğin onuncu haftasından önce prenatal testler için kullanılması önerilmemektedir.³⁹ Biyolojik örnekte analiz edilmek istenen genetik materyalin ya da kaynağının az olduğu durumlarda, moleküler analizlerde tercih edilen bir yaklaşım da nükleik asit izolasyonu yapılmadan biyolojik örneğin doğrudan PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmasıdır. DNA saflaştırması yapılmamış plazmadaki serbest DNA miktarının, nükleik asitlere karşı afinitesi olan bir kolon içeren kit ile izole edilen DNA miktarına göre 2.79 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca klasik fenol kloroform izolasyon yönteminin, sadece serbest DNA'nın yüksek konsantrasyonda olduğu plazma örneklerine uygulanabileceği, bu tür örneklerde de ancak %87.4'ünün izole edilebildiği gösterilmiştir.²⁰ Doğrudan-PCR yöntemi yaygın olarak kan dolaşımındaki virüslerin^{21,22,40} ve bakterilerin^{41,42} tespiti için kullanılmakla birlikte, yeni yaklaşımlarla birlikte yeni doğanlarda spinal musküler atrofi gibi genetik hastalıkların taranmasında da kullanılmaya başlanmıştır.²⁵ Çalışmamızda, maternal serum örneklerinin konvansiyonel PCR

reaksiyonlarında doğrudan kalıp olarak kullanılarak fetal cinsiyetin %91.7 pozitif tahmin değeri ile tespit edilebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte dizayn edilen PCR reaksiyonlarını duyarlılık (%87.5) ve özgünlüğü (%81.8) pozitif tahmin değerinden daha düşük bulunmuştur. Düşük özgünlük ve duyarlılık değerleri yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların varlığından kaynaklanmaktadır. Doğumdan hemen sonra maternal dolaşımda serbest fetal DNA çok kısa sürede tükenmektedir⁴³, bu sebeple yalancı pozitif sonuçların önceki gebelikte fetüsün erkek olması ile ilişkisi bulunmamaktadır. Bu durumda yalancı pozitif sonuçlar, analiz sırasında çeşitli basamaklarda örnekler arasındaki bulaştan kaynaklanmış olabilir. Diğer yandan yalancı negatif sonuçların sebebi konvansiyonel PCR'in tespit etme hassasiyetinin gerçek zamanlı PCR gibi daha hassas yöntemlere göre daha düşük kalmasına bağlanabilir.

Sonuç

Çalışmamız, daha hassas dizayn edilecek moleküler analizler ile ve kontaminasyon risklerinin ortadan kaldırıldığı koşullarda, maternal serumun doğrudan fetüsün genetik durumunu tespit etmekte kullanılabileceğini göstermektedir.

Yazar Katkıları: Fikir/Kavram: UA, ÇEY; Tasarım: UA, ÇEY; Veri Toplama ve İşleme: UA; Analiz ve Yorum: UA; Kaynak Taraması: UA; Makale Yazımı: UA.

Çıkar Çatışması: Bu çalışmada herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Mali Destek: Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından "2005.KB.SAG.004" proje numarası ile desteklenmiştir.

Teşekkür: Araştırma için gerekli olan serum örneklerinin ve klinik bulguların elde edilmesinde katkılarından dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından Dr. Namık Demir, Dr. Murat Celiloglu, Dr. Sebahattin Altınyurt ve Dr. Serkan Güçlü'ye teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Alfirevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*. Sep 4 2017;9(9):CD003252. doi:10.1002/14651858.CD003252.pub2
2. Evans MI, Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic procedures 2005. *Semin Perinatol*. Aug 2005;29(4):215-8. doi:10.1053/j.semperi.2005.06.004
3. Nassr AA, Hessami K, D'Alberty E, et al. Obstetrical outcomes following amniocentesis performed after 24 weeks of gestation: A systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn*. Oct 2023;43(11):1425-1432. doi:10.1002/pd.6435
4. Society for Maternal-Fetal M, Berry SM, Stone J, Norton ME, Johnson D, Berghella V. Fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol*. Sep 2013;209(3):170-80. doi:10.1016/j.ajog.2013.07.014
5. Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am*. Jun 2017;44(2):245-256. doi:10.1016/j.ogc.2017.02.004
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. Aug 16 1997;350(9076):485-7. doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0
7. Minear MA, Alessi S, Allyse M, Michie M, Chandrasekharan S. Noninvasive Prenatal Genetic Testing: Current and Emerging Ethical, Legal, and Social Issues. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2015;16:369-98. doi:10.1146/annurev-genom-090314-050000
8. Gupta AK, Holzgreve W, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Hahn S. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles generated in vitro. *Clin Chem*. Nov 2004;50(11):2187-90. doi:10.1373/clinchem.2004.040196
9. Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. Jan 2004;50(1):88-92. doi:10.1373/clinchem.2003.024893
10. La Verde M, De Falco L, Torella A, et al. Performance of cell-free DNA sequencing-based non-invasive prenatal testing: experience on 36,456 singleton and multiple pregnancies. *BMC Med Genomics*. Mar 30 2021;14(1):93. doi:10.1186/s12920-021-00941-y
11. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. Apr 1998;62(4):768-75. doi:10.1086/301800
12. Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. Dec 8 2010;2(61):61ra91. doi:10.1126/scitranslmed.3001720
13. Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. Oct 2008;54(10):1664-72. doi:10.1373/clinchem.2008.111385
14. Vora NL, Johnson KL, Basu S, Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S, Bianchi DW. A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI. *Prenat Diagn*. Sep 2012;32(9):912-4. doi:10.1002/pd.3919
15. Zhou Y, Zhu Z, Gao Y, et al. Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma. *Reprod Sci*. Nov 2015;22(11):1429-35. doi:10.1177/1933719115584445
16. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev*. Sep 2007;83(9):563-6. doi:10.1016/j.earlhumdev.2006.11.001
17. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum*

- Reprod Update*. Jan-Feb 2009;15(1):139-51. doi:10.1093/humupd/dmn047
18. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. Apr 2017;17(4):223-238. doi:10.1038/nrc.2017.7
 19. Beranek M, Sirak I, Vosmik M, Petera J, Drastikova M, Palicka V. Carrier molecules and extraction of circulating tumor DNA for next generation sequencing in colorectal cancer. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2016;59(2):54-8. doi:10.14712/18059694.2016.54
 20. Breitbach S, Tug S, Helmig S, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One*. 2014;9(3):e87838. doi:10.1371/journal.pone.0087838
 21. Abe K. Direct PCR from serum: application to viral genome detection. *Methods Mol Biol*. 2003;226:161-6. doi:10.1385/1-59259-384-4:161
 22. Bachofen C, Willoughby K, Zadoks R, Burr P, Mellor D, Russell GC. Direct RT-PCR from serum enables fast and cost-effective phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods*. Jun 2013;190(1-2):1-3. doi:10.1016/j.jviromet.2013.03.015
 23. Nanayakkara IA, Cao W, White IM. Simplifying Nucleic Acid Amplification from Whole Blood with Direct Polymerase Chain Reaction on Chitosan Microparticles. *Anal Chem*. Mar 21 2017;89(6):3773-3779. doi:10.1021/acs.analchem.7b00274
 24. Templeton JE, Taylor D, Handt O, Skuza P, Linacre A. Direct PCR Improves the Recovery of DNA from Various Substrates. *J Forensic Sci*. Nov 2015;60(6):1558-62. doi:10.1111/1556-4029.12843
 25. Shinohara M, Niba ETE, Wijaya YOS, et al. A Novel System for Spinal Muscular Atrophy Screening in Newborns: Japanese Pilot Study. *Int J Neonatal Screen*. Dec 2019;5(4):41. doi:10.3390/ijns5040041
 26. Wagner FF, Flegel WA, Bittner R, Doscher A. Molecular typing for blood group antigens within 40 min by direct polymerase chain reaction from plasma or serum. *Br J Haematol*. Mar 2017;176(5):814-821. doi:10.1111/bjh.14469
 27. Bianchi DW. Pregnancy: Prepare for unexpected prenatal test results. *Nature*. Jun 4 2015;522(7554):29-30. doi:10.1038/522029a
 28. Elgun T, Musteri Oltulu Y, Gok Yurttas A, Agyuz U, Ozkal Molla F, Kilic U. Determination of Rh type and gender using circulating cell-free fetal DNA in early pregnancy of Rh negative women in turkey. *Transfus Clin Biol*. Aug 2023;30(3):324-328. doi:10.1016/j.tracbi.2023.04.004
 29. Aykut A, Onay H, Sagol S, Gunduz C, Ozkinay F, Cogulu O. Determination of fetal rhesus d status by maternal plasma DNA analysis. *Balkan J Med Genet*. Dec 2013;16(2):33-8. doi:10.2478/bjmg-2013-0029
 30. Zeybek YG, Gunel T, Benian A, Aydinli K, Kaleli S. Clinical evaluations of cell-free fetal DNA quantities in pre-eclamptic pregnancies. *J Obstet Gynaecol Res*. Mar 2013;39(3):632-40. doi:10.1111/j.1447-0756.2012.02011.x
 31. Yenilmez ED, Tuli A, Evruke IC. Noninvasive prenatal diagnosis experience in the Cukurova Region of Southern Turkey: detecting paternal mutations of sickle cell anemia and beta-thalassemia in cell-free fetal DNA using high-resolution melting analysis. *Prenat Diagn*. Nov 2013;33(11):1054-62. doi:10.1002/pd.4196
 32. Adiyaman D, Kuyucu M, Atakul BK, et al. Can the Cell-free DNA Test Predict Placenta Accreta Spectrum or Placenta Previa Totalis? *Z Geburtshilfe Neonatol*. Apr 2022;226(2):92-97. doi:10.1055/a-1579-1338
 33. Zolotukhina TV, Shilova NV, Voskoboeva EY. Analysis of cell-free fetal DNA in plasma and serum of pregnant women. *J Histochem Cytochem*. Mar 2005;53(3):297-9. doi:10.1369/jhc.4B6398.2005
 34. Aghanoori MR, Vafaei H, Kavoshi H, Mohamadi S, Goodarzi HR. Sex determination using free fetal DNA at early gestational ages: a comparison between a modified mini-STR genotyping method and

- real-time PCR. *Am J Obstet Gynecol.* Sep 2012;207(3):202 e1-8. doi:10.1016/j.ajog.2012.06.026
35. Dar P, Jacobsson B, MacPherson C, et al. Cell-free DNA screening for trisomies 21, 18, and 13 in pregnancies at low and high risk for aneuploidy with genetic confirmation. *Am J Obstet Gynecol.* Aug 2022;227(2):259 e1-259 e14. doi:10.1016/j.ajog.2022.01.019
36. Lu X, Wang C, Sun Y, Tang J, Tong K, Zhu J. Noninvasive prenatal testing for assessing foetal sex chromosome aneuploidy: a retrospective study of 45,773 cases. *Mol Cytogenet.* Jan 6 2021;14(1):1. doi:10.1186/s13039-020-00521-2
37. Wright D, Wright A, Nicolaides KH. A unified approach to risk assessment for fetal aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* Jan 2015;45(1):48-54. doi:10.1002/uog.14694
38. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* Jul 2013;33(7):667-74. doi:10.1002/pd.4126
39. Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med.* Apr 2011;16(2):88-93. doi:10.1016/j.siny.2010.10.003
40. Nishimori A, Konnai S, Ikebuchi R, et al. Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci.* Jun 1 2016;78(5):791-6. doi:10.1292/jvms.15-0577
41. Imai H, Watanabe Y, Shimada D, et al. Utility of a Cell-Direct Polymerase Chain Reaction-Based Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay for Detection of Bacteria in Peripheral Blood Leukocytes of Suspected Sepsis Cases. *Infect Drug Resist.* 2021;14:5137-5144. doi:10.2147/IDR.S345361
42. Tjhie JH, van Kuppeveld FJ, Roosendaal R, et al. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol.* Jan 1994;32(1):11-6. doi:10.1128/jcm.32.1.11-16.1994
43. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* Jan 1999;64(1):218-24. doi:10.1086/302205