

DOWN SENDROMUNUN HIZLI DOĞUM ÖNCESİ TANISINDA D21S1411 KISA TANDEM TEKRAR (STR) BELİRTECİ KULLANILARAK KANTİTATİF FLORESAN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QF-PCR) TEKNİĞİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF QUANTITATIVE FLUORESCENT-POLYMERASE CHAIN REACTION (QF-PCR) TECHNIQUE USING D21S1411 SHORT TANDEM REPEAT (STR) MARKER IN THE RAPID PRENATAL DIAGNOSIS OF DOWN SYNDROME

Hatice KOÇAK EKER¹, Oğuz ALTUNGÖZ², Meral SAKIZLI³, Nuray ALTINTAŞ³

1 Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü, Ankara

2 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

3 Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

Giriş ve Amaç: Doğum öncesi tanı için en sık endikasyon, fetusda artmış trizomi 21 riskidir. Bu çalışmada, trizomi 21'in hızlı doğum öncesi tanısında QF-PCR tekniğinin klinik uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlandı. Ayrıca, bu teknikle trizomi tanısı koyabilmek için gerekli en az hücre sayısı ve bu değerlerin gebelik haftalarıyla ilişkisi değerlendirildi.

Olgular ve Yöntem: 224 gebeye ait amniyon sıvısında hücre sayımı yapıldı ve gebelik haftalarına göre sınıflandırıldı. Amniyon sıvısında bulunan total ve canlı hücre sayısı ile canlı hücre oranının gebelik haftasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu ($p < 0.001$) gösterildi. 135 olgudan DNA ayrımı yapıldı. DNA örnekleri D21S1411 belirleyici ile QF-PCR kullanılarak çoğaltıldı.

Bulgular: Normal örneklerin pik oranı ortalama 1.1 ve trizomik diallelik örneklerin pik oranları 2.0 olarak hesaplandı. 14–22. gebelik haftaları arasında 0.1–1.9 ml amniyon sıvısından elde edilen amniyosit sayısının QF-PCR ile tanı koymak için yeterli olduğu gösterilmiştir. QF-PCR testinin trizomi 21'i teşhis etmede duyarlılığının %90, seçiciliğinin %93.6, pozitif ve negatif öngörü değerlerinin ise %100 olduğu hesaplanmıştır. D21S1411 belirleyicinin heterozigote oranının ise 0.8320 olduğu gösterilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: D21S1411 belirleyicinin Türk toplumunda trizomi 21 tanısı için güvenle kullanılacağı sonucuna varılmıştır. QF-PCR analizi, trizomi 21'in hızlı tanısında uygulanabilecek yardımcı bir testtir. Daha fazla sayıda belirleyici ile çalışmak, testin duyarlılığını arttıracaktır.

Anahtar Sözcükler: Trizomi 21, QF-PCR, doğum öncesi tanı, amniyosit.

Yazışma Adresi:

Dr. Hatice KOÇAK EKER

Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları,
Hematoloji Onkoloji Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik
Bölümü / ANKARA

e-posta: drhaticekocak@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: The most frequent indication for prenatal diagnosis is the increased risk of trisomy 21 in fetus. In this study, it is targeted to show the clinical practicability of QF-PCR technique in the rapid diagnosis of trisomy 21. Additionally, the minimum required number of cells in order to diagnose trisomy and the minimum number of amniocytes in relation to the gestational week were also evaluated with this technique.

Material and Method: Amniotic fluid cell counts were carried out in 224 pregnant women and the findings were classified according to the gestational week. It was proved that there is a statistically significant ($p < 0.001$) relationship between the total and viable cell number, viable cell ratio in amniotic fluid and the gestational week. The DNA isolation was made for 135 case. The DNA samples were amplified with using the determinant of D21S1411 locus on chromosome 21 by QF-PCR.

Results: It was calculated that the average peak ratio of normal samples is 1.1 and the peak ratio of trisomic diallelic samples is 2.0. It was shown that amniocyte number obtained from 0.1–1.9 ml amniotic fluid of 14–22 gestational weeks woman is sufficient to diagnose trisomy by QF-PCR within an acceptable range of certainty. It was calculated that the sensitivity of QF-PCR test in diagnosing trisomy 21 was 90%, specificity was 93.6%, positive and negative predictive values were 100%. It was indicated that the heterozygosity rate of D21S1411 marker was 0.8320.

Conclusion: It is concluded that D21S1411 marker can safely be applied in Turkish population for diagnosis of trisomy 21. QF-PCR analysis is a helping test that could be used for rapid prenatal diagnosis of trisomy 21. Studying with more number of markers will increase the sensitivity of the PCR test.

Key Words: Trisomy 21, QF-PCR, prenatal diagnosis, amniocyte.

GİRİŞ VE AMAÇ

Anöploidi en sık gözlenen ve klinik açıdan en önemli kromozom bozukluğu türüdür. Otozomal anöploidilerin büyük çoğunluğu trizomilerdir. Bunlar içinde en yaygın görüleni trizomi 21 olup, anne yaşına bağlı olarak değişmekle beraber, yaklaşık 700–800 yeni doğandan birinde görülür (1). İnsanlarda tanımlanan ilk kromozomal anomalidir. Fenotip 1866'da John Langdon Down tarafından tanımlanmış ve Down Sendromu olarak adlandırılmıştır. Trizomi 21 tüm Down sendromu vakalarının yaklaşık %95'inden sorumludur. Kalan %5'ini mozaiklik ve Robertson tipi translokasyonlar oluşturur. Mental retardasyonun bilinen en sık sebebidir. Bireylerin bir yaşından fazla yaşayabildiği en sık mozaik olmayan otozomal trizomi durumudur.

Biyokimyasal testler ve ultrason fetal kromozomal anomalilerin taranması için standart işlemler olmuştur. Riski belirlemek için anne yaşıyla beraber değerlendirilirler. Her iki yaklaşım, test edilen annelere fetuslarının major bir kromozomal bozukluğu olup olmayacağı ve tanıyı doğrulamak için girişimsel bir işleme ihtiyaç duyulup duyulmadığı hakkında bilgi verir (2). Yüksek riskli olduğu düşünülen gebelere, gebelik yaşına uygun olarak amniyosentez veya koryon villüs örnekleme gibi işlemler uygulanır. Ancak bunlar girişimsel bir işlem olduğu için gebelerin yaklaşık %1'inde düşüğe sebep olabilir. Örnekleme takiben tam bir karyotip elde edilir. Fetal kromozom anomalilerinin tek kesin tanı yöntemi karyotiplemedir. Bir doğum öncesi karyotip analizinin ortalama rapor edilme süresi yaklaşık 14 gündür (3).

Günümüzde QF-PCR (“Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction”); fetal hücre kültürüne ihtiyacı ortadan kaldırmak ve böylece seçilmiş bazı kromozom anomalilerinin hızlı tanısına olanak sağlamak için doğum öncesi tanı alanına girmiştir (2,3,4,5). QF-PCR; bireyler arasında uzunlukları polimorfizm gösteren kromozoma özgül DNA dizilerinin çoğaltılmasına dayanan moleküler bir yöntemdir. Floresan primerler yoluyla, çoğaltılan kısımlar görüntülenebilir ve otomatik DNA tarayıcıda pik alanları olarak ölçülebilir.

Bu çalışmada Trizomi 21’i saptamada QF-PCR metodunun etkinliğini deneysel olarak göstermeyi amaçladık. Ayrıca, QF-PCR’in en az kaç hücrede trizomi 21’i güvenilir biçimde saptayabildiği test edildi. Her iki değerinde elde edilmesinden sonra QF-PCR’la trizomi saptama yaklaşımının, güvenilir ve en uygun hangi gebelik haftasında ne kadar hacimde amniyon sıvısından yapılabileceğine dair verilere dayalı bir çıkarım elde edildi. Bu sayede daha erken doğum öncesi tanı olanakları test edilmiş oldu.

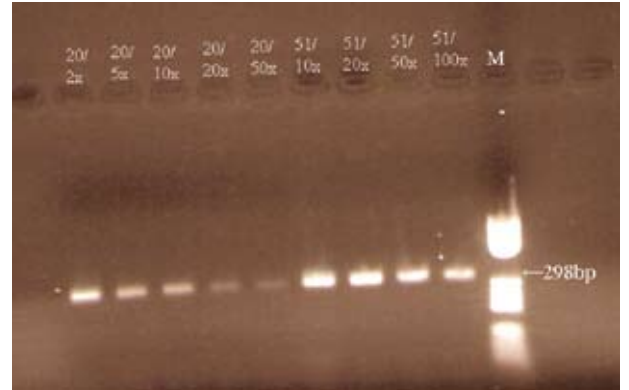
OLGULAR VE YÖNTEM

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Prenatal Tanı Laboratuvarına rutin olarak başvuran hastaların amniyon sıvıları kullanıldı. Ayrıca bu hastalar ile, aynı birime gelen bir CVS materyalinin kültüre edilmiş hücreleri ve daha önce trizomi 21 tanısı konmuş dört çocuğun kanları kullanıldı. Prenatal Tanı Laboratuvarına başvuran 224 hastanın amniyon sıvısında total ve canlı hücre sayımı yapıldı. Bu değerler canlı hücre oranları ile birlikte gebelik haftalarına göre sınıflandırıldı. Bir CVS, 130 amniyosit hücre kültürü olmak üzere 131 materyalin, karyotip analiz sonucu rapor edildikten sonra, kültüre edilmiş hücreleri ile, daha önce trizomi 21 tanısı konmuş dört çocuğa ait kan örneği DNA ayırımı için kullanıldı. Trizomi 21 tanısı alan toplam 11 DNA örneği elde edildi.

Amniyosentez laboratuvarına rutin olarak başvuran 142 hastanın 0,5 ml amniyon sıvılarından ve geleneksel sitogenetik analizi tamamlanmış hastaların 25 cm² tek tabaka (monolayer) kültürlerinden olmak üzere iki tip örnekten, DNA elde edeceğimiz hücre sayısını belirlemek için, hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı hemositometre ile hücre sayımı protokolüne uygun olarak yapıldı.

Karyotip analizi tamamlanmış hastalardan trizomi 21 tanısı konanların kültürlerinden 75 cm² flaska subkültür yapıldı. 25 cm² flastaki kültürden elde edilen hücre çökeltilerinden ve dört hastanın kanından DNA ayırımı yapıldı. Bunun için DNA ayırma kiti [Roche (DNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow/Tissue, Cat No: 2 032 805)] kullanıldı. DNA örneklerinin saflıkları spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi ve yoğunlukları hesaplandı. Çalışmaya, saflığı 1.6–2.0, yoğunlukları 20–120 ng/μl arasında olan DNA örnekleri dahil edildi. %1’lik agaroz jelde yürütülerek ayrılmış DNA’nın kırık olup olmadığının kontrolleri yapıldı.

Amniyon hücre kültürlerinden bir kısmında amniyon sıvısında seri seyreltmeler yapılmış olup, elde edilen hücre sayısına uygun DNA ayırma protokolü uygulanmıştır. En az kaç hücreden elde edilen DNA ile QF-PCR analizi gerçekleştirilebileceğini anlamak amacıyla daha fazla katsayıda seyreltmelerin yapılması hedeflenmiş, ancak elde edilen hücre sayıları DNA ayırma kitinin protokolüne uygun olmadığı için hedeflenen bu seyreltmeler uygulanmamıştır. Bunun yerine 20 ve 51 no’lu iki DNA örneğinden farklı oranlarda seyreltmeler hazırlanmış ve bunlarla PCR kurulmuştur (Resim 1).



Resim 1 20 ve 51 no’lu DNA örneklerinin farklı oranlarda seyreltmesiyle kurulmuş PCR ürünleri

İzolasyonu ve agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmesi yapılan kalıp DNA’ların kromozom 21 üzerindeki mikrosatellit belirleyici bölgelerine özgül floresan işaretli primer çiftleri ile PCR reaksiyonları kuruldu (Tablo1). PCR optimizasyonları yapıldı.

Tablo 1: Mikrosatellit belirleyicilerin karşılaştırması

Belirleyici	Yerleşim	Heterozigozite	Tekrar	Boyut Aralığı (bp)
D21S11-F, -R	21q21.1	0.9	Tetra	225–280
D21S1411-F, -R	21q22.3	0.933	Tetra	256–340
D21S1270-F, -R	21q21-q22.1	0.83 0.86	Tetra	174–198 285–340

Tablo 2: Gebelik haftalarına göre hasta sayısı

Gebelik haftası	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Vaka sayısı	2	12	65	67	44	21	8	2	3

Bir kısım PCR ürünlerinin parça analizi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nda yapıldı. Analiz sonuçları sitogenetik karyotip sonuçlarıyla uyumlu bulundu. ABI Prism 310 Genetik Analizör'de yapılan bu analizlere dayanarak yöntem optimize edildikten sonra, D21S1411 belirleyici ile kurulan PCR ürünlerinin parça analizi ABI Prism 3730 Genetik Analizör'de hizmet alımı şeklinde yaptırıldı (MacroGen, Seoul-Korea).

Araştırmamızda gruplar arasındaki farklılıklar SPSS 10.0 bilgisayar istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplardan en az birinde olgu sayısı <30 olduğu durumlarda parametrik olmayan yöntemlere başvurmak gerektiğinden, istatistiksel analizlerde Kruskal Wallis Testi ve spearman korelasyon testi kullanılmıştır (6). Verilerimizde 14, 15, 19, 20, 21 ve 22. haftadaki olgu sayısı <30 olduğundan aşağıdaki dört parametrenin gebelik haftası ile ilişkisi Kruskal Wallis Testi ile değerlendirildi:

- 1 ml süspansiyondaki hücre (amniyosit) sayısı
- 1 ml süspansiyondaki canlı ("viable") hücre sayısı
- Canlı hücre oranı
- 1 ml amniyon sıvısındaki hücre sayısı

Kruskal Wallis testi sonrasında iki sürekli değişken

arasındaki bağıntıyı (korelasyon) belirlemek amacı ile spearman korelasyon testi kullanıldı. Ölçüm değerleri sıra düzeneğine dönüştürülerek işlem yapıldı; 14 ve 15. haftalar "15. hf \geq " ve 20. 21 ve 22. haftalar "20. hf \leq " şeklinde gruplandırıldı (6).

BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Prenatal Tanı Laboratuvarına 14 Mart–10 Ağustos 2006 tarihleri arasında rutin olarak başvuran 224 gebenin amniyon sıvılarında total ve canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Gebelik haftalarına göre gelen vakaların dağılımı Tablo–2'de gösterilmiştir.

• Kruskal Wallis Testi Sonuçları:

Birim hacimde bulunan total ve canlı hücre sayıları ile canlı hücre oranının, gebelik haftasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu gösterildi (Tablo–3).

• Spearman Korelasyon Testi Sonuçları:

Gebelik haftası azaldıkça gerekli sıvı hacminin arttığı görülmüştür. Böylece daha erken gebelik haftalarında da doğum öncesi tanının mümkün olabileceği ve QF-PCR tekniğinin etkinliğinin gebelik haftasından etkilenmediği gösterildi. Gebelik haftası ile bu dört parametre arasındaki ilişkinin pozitif ve negatif yönde hangi düzeylerde olduğu "r" ile, ve istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı ise "p" ile gösterilmiştir (Tablo–4).

Tablo 3: Kruskal Wallis Testi sonuçları

	Hücre sayısı/ml süspansiyon Ortalama ± SD	p*	Viable hücre sayısı/ml süsp. Ortalama ± SD	p*	Viable hücre oranı Ortalama ± SD	p*	Hücre sayısı/ml amniyon Ortalama ± SD	p*
15. hf≥	27071.43 ± 16088.53	<0.001	13600.00 ± 7356.94	<0.001	53.41 ± 11.29	<0.001	7121.43 ± 4467.52	<0.001
16. hf	55646.15 ± 41862.30		28356.92 ± 22669.40		52.70 ± 10.60		14524.62 ± 10709.66	
17. hf	79119.40 ± 41482.94		36800.00 ± 18466.05		47.61 ± 8.87		20631.34 ± 10688.09	
18. hf	119931.82 ± 56993.82		51181.82 ± 24659.80		44.60 ± 9.37		31552.27 ± 18307.89	
19. hf	192571.43 ± 99894.23		60761.90 ± 32021.72		32.52 ± 9.05		51476.19 ± 26887.95	
20. hf≤	316923.08 ± 163675.73		107000.00 ± 60620.40		34.20 ± 7.49		112076.92 ± 136272.07	

Tablo 4: Spearman Korelasyon Testi sonuçları

	r*	p
Gebelik haftası-Hücre sayısı/ml süspansiyon	0.711	< 0.001
Gebelik haftası-Viable hücre sayısı/ml süsp.	0.624	< 0.001
Gebelik haftası-Viable hücre oranı	-0.531	< 0.001
Gebelik haftası-Hücre sayısı/ml amniyon	0.679	< 0.001

Tablo 5: ABI 310'da yapılan analiz sonuçları (*Trizomi 21)

Belirleyici	DNA örneği	Tepecik "size" 1/2	Tepecik alanı	Tepecik boyu	Veri noktası	Tepecik oranı
D21S11	5/3x*	123.45/139.00	14228/36811	1480/1548	3592/3715	2,58:1
D21S11	6	220.37/224.26	1369/1140	147/143	4712/4745	1,2:1
D21S11	8	224.22/230.07	1047/884	123/110	4643/4691	1,18:1
D21S11	2	224.42/238.14	16484/18113	1181/1443	4586/4696	1,1:1
D21S1270	2	164.55/187.41	108296/215783	7054/6432	4076/4265	1,1:1
D21S1411	38/2x	285.33/297.70	53835/62605	6320/7104	5031/5123	1,16:1

Tablo 6: D21S1411 heterozigote frekansının karşılaştırılması

Belirleyici	Heterozigote Frekansı			
	Referans (Mann et al, 2001)	Referans (Andonova et al, 2004)	Referans (Lee et al, 2004)	Mevcut çalışma (Türk toplumu)
D21S1411	0.933	0.860	0.832	0.832

Genescan Analizi Sonuçları:

- ABI 310'da yapılan analiz sonuçları (Tablo-5).
- Bu verilere göre; analiz sonuçları sitogenetik karyotip sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. ABI Prism 310 Genetik Analizör'de yapılan analizlere dayanarak yöntem optimize edildikten sonra, D21S1411 belirleyiciyi ile kurulan tüm PCR ürünlerinin parça analizi ABI Prism 3730 Genetik Analizör'de yapıldı. D21S1411 belirleyici ile yapılan bu parça analizi sonuçlarına göre 135 örnekten;
 - o 10 başarısız
 - o 125 sonuç elde edildi
- 21 bilgilendirici olmayan
- 104 bilgilendirici (%83.2)

D21S1411 belirleyicisinin toplumumuz için bulunan bu heterozigozite oranı, literatürdeki verilerle kıyaslanması Tablo-6'da verilmiştir.

- İformatif verilerin dağılımı ve istatistik değerlendirilmesi:

ABI 3730'da yapılan genescan analizinin sonuçlarına

göre, QF-PCR metodunun duyarlılık, seçicilik ve pozitif/negatif öngörü değerleri hesaplanmıştır (Tablo 7).

Mevcut veriler ışığında elde edilen öngörü değerleri aşağıdaki gibidir:

Duyarlılık-sensitivite	: % 90
Seçicilik-spesifite	: % 93.6
Pozitif öngörü değeri	: % 100
Negatif öngörü değeri	: % 100

- Bu çalışmada dizomik diallelik örneklerle, diallelik trizomi 21 örneklerin pikleri arasında belirgin bir fark olduğu gösterilmiştir. Yetersiz sonuçların pik oranları ise bu iki değerin ortasında bulunmuştur (Tablo 8).

Onbir Trizomi 21 vakasının dokuzunda QF-PCR analiz sonuçlarının sitogenetik karyotip analiziyle uyumlu olduğu görülmüş, birinden sonuç elde edilememiş ve biri ise yetersiz bulunmuştur. Bu durumda yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç gözlenmemiştir. Bu dokuz trizomi örneğinden yedisinin trizomik diallelik, ikisinin trizomik triallelik olduğu görüldü.

51 no'lu DNA bilgilendirici olmadığından, bu örneğin seri seyreltmeleriyle hazırlanan PCR ürünlerinin par-

Tablo 7: QF-PCR testinin öngörü değerleri

	QF-PCR: + (Trizomi 21)	QF-PCR: - (Normal)	QF-PCR: (Yetersiz)	Toplam
Gold Standart*: + (Trizomi 21)	Gerçek Pozitif 9	Yalancı Negatif 0	1	10
Gold Standart*: - (Normal)	Yalancı Pozitif 0	Gerçek Negatif 88	6	94
Toplam	9	88	7	104

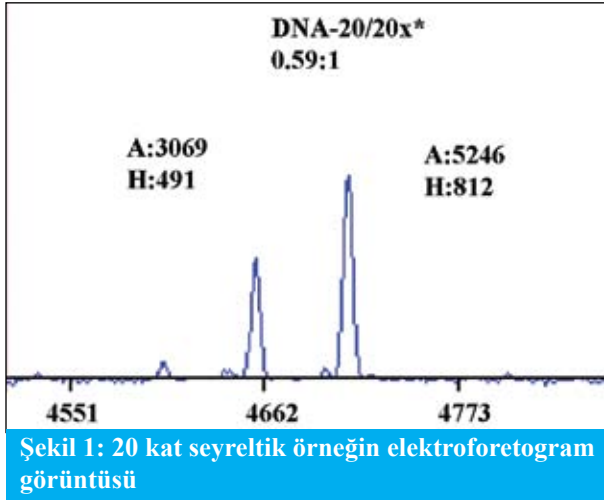
*Sitogenetik analizi

Tablo 8: Diallelik Örneklerdeki Pik Oranları

Belirleyici:	Diallelik Örneklerdeki "Peak Area" Oranları					
	Trizomik Diallelik		Dizomik Diallelik		Yetersiz	
D21S1411	Ortalama	SD*	Ortalama	SD*	Ortalama	SD*
PAR*	2,0	0.29	1.1	0.15	1.54	0.11
PHR*	2,0	0,28	1,16	0.11	1,50	0,08

*PAR: "Peak Area Ratio" *PHR: "Peak Height Ratio" *SD: "Standard Deviation"

ça analizi, en az kaç hücreden tanı konulabilir bir örüntü elde edileceği konusunda bilgi verici olmamıştır. Bu veri, 20 no'lu DNA örneğiyle elde edilmiştir. 20 no'lu örnek trizomik bir vakaya ait olup, ana stoktan ve 2, 5, 10, 20, 50 kat seyreltmelerinden PCR kurulmuştur. Bu ürünlerin elektroforegramlarında 2, 5, 10 kat seyreltik örnekte yetersiz, ana stok ile 50 kat seyreltik formlarda normal örüntü elde edilirken, 20 kat seyreltik örnekte trizomi tanısı konulabilmektedir (Şekil-1).



20 no'lu DNA örneği 270 000 hücreden elde edildi. En az 20 kat seyreltik örnekten pozitif sonuç elde edilebildiğinden, QF-PCR analizi ile trizomi 21 tanısı konulabilecek en az hücre sayınının 13 500 olduğu söylenebilir. Böylece gebelik haftalarına göre, analiz yapılabilecek ortalama amniyon sıvı hacmi belirlendi (Tablo-9).

Tablo 9: QF-PCR analizi için gerekli amniyon sıvı hacminin gebelik haftasına göre dağılımı

	Ortalama hücre sayısı/ ml amniyon	Amniyon sıvı volümü
15. hf \geq	7121.43	~1.9 ml
16. hf	14524.62	~0.9 ml
17. hf	20631.34	~0.7 ml
18. hf	31552.27	~0.4 ml
19. hf	51476.19	~0.3 ml
20. hf \leq	112076.92	~0.1 ml

TARTIŞMA

QF-PCR, her bir STR'ye özgül oligonükleotid primerler vasıtasıyla, floresan boyaların PCR çoğaltma ürünleriyle birleşmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonun, PCR çoğaltımının erken üstel fazında olduğu varsayılırsa, oluşan gen ürününün miktarı başlangıçtaki hedef dizi miktarıyla orantılı olacaktır (7,8). DNA çoğaltımının etkinliğini çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler etkileyebilir. PCR'm düşük denaturasyon sıcaklığından, kalıp DNA miktarının azlığından, DNA saflığından etkilendiği bilinmektedir. Bu etkilerin üstel fazda olması; reaksiyon kinetiğini etkileyecek ve allellerin çoğaltım oranlarında farklılıklara sebep olacaktır. Trizomik olan 20 no'lu DNA örneğimizin yalnızca 20 kat seyreltmesinde trizomik örüntü elde etmiş olmamız, reaksiyon koşullarındaki bu farklılıklarla açıklanabilir. Ayrıca, ana stokta olması muhtemel PCR kısıtlayıcılarının da beraber seyreltilmesi bu sonuçta etkili olabilir. Bu durum doğru bir analiz sonucu elde etmede seyreltmenin önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. DNA örneklerinden daha fazla sayıda, daha farklı oranlarda seyreltmeler hazırlamakla, daha hassas bir sonuca ulaşılabilir. Kanlı ya da rengi bozulmuş bir amniyon sıvısından elde edilen DNA'nın da PCR kısıtlayıcılarını içerebileceği bildirilmiştir (3). Bu çalışmada sonuç elde edemediğimiz tek trizomi vakası olmuştur ki bu DNA örneğinin elde edildiği amniyon sıvısının da kanlı olduğu bilinmektedir.

Zimmermann ve ark., RT Q-PCR ile trizomi 21 tanısının konulabilirliğine dair yaptığı çalışmada, yöntemin belli bir DNA yoğunluk değerinin üzerinde uygulanabileceğiyle ilgilenmiş, 10 kat seyreltik DNA örnekleri kullanıncaya ve DNA yoğunluğu 10 $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşünceye kadar en uygun sonuçları elde etmiştir (9). Bu veriler, bizim çalışmamızdaki 20 kat seyreltik örnekte DNA yoğunluğunun 10.2 $\mu\text{g/ml}$ olması ile son derece uyumludur. Ayrıca, aynı çalışmada bir trizomi 21 vakasında eşik değerinin sıra dışı bir değer gösterip, bu ekstraksiyonun iki seyreltmesinde trizomi 21 için beklenen eşik değerler elde edilmiş olması da çalışmamız ile uyumlu görünmektedir.

Zheng ve ark., farklı allellerden PCR ürünlerinin nisbi miktarlarını tayin etmede pik yüksekliği oranlarının pik alanı oranlarına kıyasla daha iyi olduğunu bulmuştur. Her iki ölçümün birlikte yapılabileceğini bildiren kaynaklar da mevcuttur (3, 8). Çalışmamızda da analiz sonuçları iki

ölçümün birlikte değerlendirilmesi ile elde edildi. Böyle bir ölçümün sitogenetik karyotip analiz sonuçlarıyla yüksek derecede uyumu sebebiyle daha güvenilir olduğu kanaatine varıldı.

Cirigliano ve ark., X kromozom dozajının QF-PCR'la ölçümünde, D21S1411 otozomal belirleyiciyi iç kontrol olarak kullanmıştır. Aynı şekilde, D21S1411'in miktarını tayin etmek için HPRT ürünü de iç kontrol olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir. Kromozom 21'e ait beş STR için homozigot olan bir fetusta bu şekilde allel kopya sayısı belirlenebilmiştir (10).

Doğum öncesi örneklerin test edilmesi, sınırlı örnek miktarı, değişken örnek kalitesi, mozaiklik ve anneye ait hücrelerin bulaşması sebebiyle güçtür (11). Sekizinci ve daha sonraki gebelik haftalarında amniyon sıvısından yeterli DNA ayrılabilirdiği ve PCR'ı kullanarak doğum öncesi tanı için bu örneklerin uygun olduğu gösterilmiştir. Özellikle 14 haftadan daha erken gebeliklerde tek santrifüjden sonra elde edilen hücre sayısı DNA ayırmak için düşük olduğundan, amniyon sıvı hücrelerini yoğunlaştırmak için ardışık santrifüjasyon metodu kullanılmıştır (12). Biz ise çalışmamızda QF-PCR analizinin yapılabileceği en az hücre sayının gebelik haftasıyla ilişkisini gösterdik. Literatürde QF-PCR analizi için 0.5-4 ml ya da örneğin 1/10'u kadar amniyon sıvısı alınması tavsiye edilir (4, 7, 9, 11, 13). Verilerimiz, gebelik haftası arttıkça analiz için gerekli amniyon sıvı hacminin azaldığını ve bu miktarın ortalama 0.1-1.9 ml arasında değiştiğini göstermektedir.

QF-PCR'la ilgili olarak iki problem vardır; mozaiklik seviyesinin tespit edilebilirliği ve direk test sonuçlarıyla fetal genotip arasındaki uyumun derecesi (3). Genomik mozaikliğin moleküler olarak tespit edilmesinde QF-PCR'in sensitivitesi, anöploidili hücre serisinin yüzde oranına bağlıdır. %10-12 mozaiklik oranının QF-PCR analizi ile belirlenemezken, %30 trizomi mozaiklik seviyesinin tespit edilebildiği gösterilmiştir (2,13). QF-PCR testinin mozaik vakalara tanı koymadaki duyarlılık seviyesini ölçmek için yeterli sayıda vakanın araştırılması gerekmektedir. Genellikle bir mozaik genotip örüntü ile iki genotipi gösteren örüntü arasındaki ayrımı yapmak mümkündür (11). İki genotipi gösteren bir örüntü, genellikle anneye ait hücre bulaşımının göstergesidir. Anneye ait kan hücrelerinin bulaştığı düşünülen örneklerde, yük-

sek derecede polimorfik STR'lerin QF-PCR çoğaltımıyla, tüm kromozomlar için fazladan alleller gösteren veya allel pikleri arasında çarpık oranların olduğu bir QF-PCR örüntüsü oluşması beklenir. Bu örüntü genellikle normal ya da trizomik bir örnekle uyumlu olmadığı gibi, triploidi ya da mozaiklikle karıştırılmayacak kadar da karakteristiktir. Bu sebeple yanlış tanı riski yoktur. Cirigliano, görünüşte temiz olan, ancak santrüjden sonra az bir kontaminasyonun görüldüğü, özellikle dişi fetuslarda FISH analizini engelleyebilecek örneklerin tamamını başarıyla çoğaltmış ve tanı koymuştur (14). Çünkü kontaminasyonun çok düşük seviyelerde olduğu bu durumlarda; anneye ait hücrelerin sebep olacağı fazla pikler çok küçük floresan aktivite göstereceklerinden, fetal STR piklerinin oranları arasında anlamlı bir değişikliğe sebep olmayacaklardır. Kontaminasyon düşünülen vakalarda, özellikle fetus kız ise, örnekteki hücrelerin fetal kaynağını belirlemek için, anne kanının eş zamanlı ve aynı belirleyiciler kullanılarak analiz edilmesi gerekir. Fetal örnekteki fazla floresan pikleri annedekilerle aynı ölçülere sahiptir (2, 3, 11). Ayrıca trizomi 21'in mayotik kökeni de QF-PCR analizi ile belirlenebilir (15).

Bu konudaki ilk deneyler, geleneksel sitogenetik analizle daha önce tanı konmuş örneklerde yapıldı (14,16). Sitogenetik analiz sonuçlarını riske atmamak amacıyla biz de çalışmamızda bu yolu izledik. Bu durumda maternal hücre kontaminasyonu riski söz konusu değildir.

STR bazlı çalışmalar Hardy Weinberg dağılımına uygun evliliklerin olduğu toplumlarda daha başarılı olmaktadır. Ülkemiz gibi akraba evliliklerinin yaygın olduğu kapalı toplumlarda Hardy Weinberg kanununun rastgele çiftleşme şartı bozulduğundan, birden fazla alleli herhangi bir lokus için homozigotların toplumda artışı ve buna karşın heterozigotların azalmasıyla sonuçlanmaktadır (17). Bu durum; QF-PCR analizinde bilgilendirici olmayan sonuç yüzdesini artırmaktadır. Bilgilendirici olmayan sonuç yüzdesini en aza indirmek için uygun belirleyici seçimi önemlidir (18). Birkaç tane yüksek derecede polimorfik, özgül belirleyicinin kullanımı, homozigozite olasılığını azaltır, özgüllüğü artırır, yalancı negatif ya da şüpheli sonuçlardan kaçınmayı sağlar (8).

Çalışmamızda yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç görülmemekle beraber, bilgilendirici sonuçlardan yedisi yetersiz bulunmuştur. Bunlardan biri trizomik bir vaka-

ya aitti. Yetersiz pik oranı gösteren örneklerin daha fazla sayıda farklı belirleyici ile analiz edilmesi önerilmektedir (11, 14, 15, 18, 19). Nitekim üç-altı belirleyiciyle yapılan pek çok çalışmada yalancı pozitif sonuç elde edilmemiştir (7, 19). Dört belirleyiciyle yapılan başka bir çalışmada yalancı negatif sonuç gözlenmemiştir (18). Literatürde yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlar çok nadir görülmekle beraber, bunların daha çok mozaik vakalarda olduğu göze çarpmaktadır (20).

Maternal kandan fetal hücre elde edilmesi, preimplantasyon genetik tanı çalışmaları gibi az hücre ile yapılan çalışmalarda kalıp DNA miktarı az olacağından, bir allel ayrıcalıklı olarak amplifiye olurken allellerden birinin amplifikasyonunda yetersizlik olabilir. "Allelik drop out" adı verilen bu etki pik oranlarının sapmasına sebep olacağından kantitatif analiz güvenilir olmayabilir (3, 20, 21, 22). Primer bağlanma bölgesi polimorfizmleri de allelik drop-out ile sonuçlanıp yanlış tanıya sebep olabileceği gibi, yine bu bölgelerdeki mutasyonlarda aynı etki ile bilgilendirici olmayan sonuçlar elde edilebilir (23). Mikrosatellit tekrar büyüklüğü somatik mozaikliği de, analiz için tek belirleyici kullanıldığı zaman yanlış tanıyla sonuçlanabilir (3). Bu sebeplerle en az iki bilgilendirici belirleyiciyle çalışılmasının gerekli olduğu savunulur (15, 19, 24).

Bilgilendirici olmayan sonuçların çok büyük bir ihtimalle trizomi olmadığı kanısı yaygındır (7). Normal bir dizomiğin yüksek derecede polimorfik çok sayıda STR için homozigot olması nadir bir durumdur. Trizomik bir genomun bilgilendirici olmayan örtüntü gösterme ihtimali dizomik bir genoma kıyasla çok daha düşük olacaktır. Literatürde bir vaka hariç, bilgilendirici olmayan sonuçların daima normal dizomiklere ait olduğu görülmüştür (20). Bu çalışmada tek belirleyici ile elde edilen analiz sonuçları değerlendirildi. Ancak çalışmanın yapıldığı İzmir ve yöresinde akraba evliliği oranlarının çok düşük olması, çalışmamızda fazladan olumsuz bir etkiye sebep olmamıştır. Ayrıca kullanılan D21S1411, 30 alleli olan ve şimdiye kadar kromozom 21 için kullanılanlar arasında heterozigozite oranı en yüksek olan belirleyicidir (25). Bilgilendirici olmayan sonuçlarımız 125 olgunun 21'inde (%16.8) görüldü ve bunların tamamı karyotipik olarak normal dizomikti.

STR belirleyicilerinin allel sıklığı ve heterozigozite-

si farklı etnik gruplar arasında değişmektedir (18). Bu çalışmada kullanılan D21S1411 belirleyicinin Türk toplumundaki heterozigozitesi, aynı belirleyicinin yayınlanmış diğer verileriyle kıyaslanmıştır.

Doğum öncesi tanıda QF-PCR'in rolü konusunda yazarlar arasında farklı görüşler vardır. Karyotip analizine alternatif bir test olarak kullanılabileceğini savunanlar olduğu gibi, karyotip analizine yardımcı bir test olduğunu savunanlar da vardır. Bazı yazarlar ise endikasyona göre ayırım öne sürmüşlerdir; anormal ultrasonografi bulguları ya da ebeveynin kromozomal yeniden düzenlenmeleri olan kadınlar tam karyotip analizi gerektirir, ileri maternal yaş ya da pozitif anne serum taraması ve endişe sebebiyle doğum öncesi tanı gereken kadınlara tek başına QF-PCR önerilebilir (24, 26). Ancak, OF-PCR'in ekonomik, hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu konusunda fikir birliği söz konusudur.

KAYNAKLAR

- 1- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Tıbbi Genetik*. Doç. Dr. Boduroğlu K, ed; Prenatal Tanı (içinde). İstanbul: Güneş Kitabevi, 2005:359-374.
- 2- Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:1176-1179.
- 3- Elles R, Mountford R. *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*. In: Mann K. *Prenatal Detection of Chromosome Aneuploidy by Quantitative Fluorescence-PCR*, 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004:141-156.
- 4- Yang YH, Nam MS, Yang ES. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21. *Yonsei Med J*. 2005;46:193-197.
- 5- Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Jencikova N, Goetz P, Stejskal D. QF-PCR-based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. *Eur J Med Genet*. 2008;51:209-218.
- 6- Aksakoğlu G. *Sağlıkta Araştırma ve Çözümleme*. İzmir: D.E.Ü. Rektörlük Basımevi, 2006:294-295.
- 7- Lee MH, Ryu HM, Kim DJ, Lee BY, Cho EH, Yang JH, Kim MY, Han JY, Park SY. Rapid prenatal diagnosis of down syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. *J Korean Med Sci*, 2004;19:341-

- 344.
- 8- Sun X, Yan M, Zhang Y, Zhou X, Wang C, Zheng F, Xiong C. Practical application of fluorescent quantitative PCR on Trisomy 21 in Chinese Han population. *Mol Biol Rep* 2006;33:167-173.
- 9- Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, Hahn S. Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21. *Clin Chem*. 2002;48:362-363.
- 10- Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, Adinolfi M. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:1042-1045.
- 11- Mann K, Ogilvie C, Donaghue C, Mountford R, Mearns C, Warner J, Dunlop N, Levett L, Hardy C, McConnell C, Diack J, McKay F. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy. *ACC Best Practice Guidelines*. 2005.
- 12- Rebello MT, Hackett G, Smith J, Loeffler FE, Robson S, MacLachlan N, Beard RW, Rodeck CH, Williamson R, Coleman DV, Williams C. Extraction of DNA from amniotic fluid cells for the early prenatal diagnosis of genetic disease. *Prenatal Diagnosis* 1991;11:41-46.
- 13- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn*. 1999;19:1099-1103.
- 14- Cirigliano V, Lewin P, Szpiro-Tapias S, Fuster C, Adinolfi M. Assessment of new markers for the rapid prenatal detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann. Hum. Genet*. 2001;65:421-427.
- 15- Machatkova M, Brouckova M, Matejkova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzaova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr. QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in central and eastern Europe. *J Histochem Cytochem* 2005;53:371-373.
- 16- Nakonieczny M, Jezierski G, Woźniak I, Liss J, Pawłowski R, Preis K, Swiatkowska-Freund M, Wójcikowski C, Łukaszuk K. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Przegl Lek*. 2008;65:119-121.
- 17- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Tibbi Genetik*. Prof. Dr. Ayter Ş, ed; *Populasyonlarda Genetik Değişimler (içinde)*. İstanbul: Güneş Kitabevi, 2005:98-99.
- 18- Andonova S, Vazharova R, Dimitrova V, Mazneikova V, Toncheva D, Kremensky I. Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria, estimation of applicability of 6 STR markers on chromosomes 21 and 18. *Prenat Diagn*. 2004;24:202-208.
- 19- Cirigliano V, Voglino G, Cañadas M.P, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod* 2004;10:839-846.
- 20- Yoon HR, Park YS, Kim YK. Rapid prenatal detection of Down and Edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeat markers. *Yonsei Med J*. 2002;43:557-566.
- 21- Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet*. 1998;62:9-23.
- 22- Samura O, Sohda S, Johnson KL, Pertl B, Ralston S, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences. *Clin Chem* 2001;47:1622-1626.
- 23- Heinrich M, Müller M, Rand S, Brinkmann B, Hohoff C. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *Int J Legal Med* 2004;118:361-363.
- 24- Mann K, Ogilvie CM. Prenatal detection of chromosome disorders. *Lancet* 2001;358:1646.
- 25- Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction*. 2003;126:279-297.
- 26- Brun JL, Gangbo F, Wen ZQ, Galant K, Taine L, Maugey-Laulom B, Roux D, Mangione R, Horovitz J, Saura R. Prenatal diagnosis and management of sex chromosome aneuploidy: a report on 98 cases. *Prenat Diagn*. 2004;24:213-218.