

PRENATAL TANIDA MİKRODİZİNİN ROLÜ

The Role of Microarray in Prenatal Diagnosis

Derya Beyza SAYIN KOCAKAP^{1*} , Leyla ÖZER² 

¹Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D., KIRIKKALE, TÜRKİYE

²Mikrogen Genetik Tanı Merkezi, ANKARA, TÜRKİYE

ÖZ

ABSTRACT

Prenatal genetik tanı 1960'lerden beri yapılabilmeyle birlikte, 1980 sonrasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sitogenetik inceleme, bölünebilir hücre ve hücre kültürü gereksinimi, düşük ayırım gücü (<4-5Mb) ve subjektif değerlendirme gibi dezavantajlara sahiptir. Bu sorunların üstesinden gelme umuduyla prenatal mikrodizin incelemesinin kullanımı yaygınlaşmaya başlamış, ancak kendine has başka sorunlar nedeniyle henüz konvansiyonel sitogenetiğin yerini almamıştır. Yüksek ayırım gücüne sahip olması, objektif bir değerlendirme sunması ve bölünen hücreye gerek duymaması mikrodizinin avantajlarını oluştururken; etkisi tam olarak bilinmeyen değişimleri de saptaması ve buna bağlı olarak parental anksiyeteye yol açabilmesi ise dezavantajları arasında yer almaktadır. Ülkeler arasında prenatal kullanımdaki önceliği değişmekle birlikte hepsinde ortak görüş, ultrasonografide yapısal anomalisi olan fetüslerin ve düşük materyallerinin genetik incelemesinde ilk tercih olduğudur.

Although prenatal genetic diagnosis has been in use since the 1960s, it has been widely used after 1980s. The need for divisible cells and cell culture, low discrimination power (<4-5Mb) and subjective evaluation are the disadvantages of cytogenetic analysis. The use of prenatal microarray analysis has been becoming widespread in the hope of overcoming these problems, but has not yet replaced conventional cytogenetics due to its own disadvantages. While having high discrimination power, providing an objective evaluation and not needing dividing cells constitute its advantages; its high discrimination power is also a disadvantage, because of variants of insignificance and incidental findings that can cause parental anxiety. Although the indications of prenatal use varies among countries, the common point is that prenatal microarray analysis is the first choice in the genetic examination of fetuses with structural anomalies detected prenatally and of intrauterin fetal demise.

Anahtar Kelimeler: Mikrodizin, prenatal, genetik

Keywords: Microarray, prenatal, genetic



Yazışma Adresi / Correspondence*:
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D., Yahşihan, KIRIKKALE, TÜRKİYE
Tel / Phone: +90 532 6685899
Geliş Tarihi / Received: 15.03.2021

Dr. Derya Beyza SAYIN KOCAKAP
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yahşihan, KIRIKKALE, TÜRKİYE
E-posta / E-mail: dsayin@kku.edu.tr
Kabul Tarihi / Accepted: 12.04.2021

GİRİŞ

İnsan genomu, 23 çift kromozom halinde paketlenmiş, haploid olarak yaklaşık 3 milyar baz çifti (bç) uzunluğundaki çekirdek genomu ile yaklaşık 16 bin bç uzunluğundaki mitokondri genomundan oluşmaktadır. Genomdaki yapısal ve sayısal değişiklikler ise pek çok genetik hastalığın nedenidir.

Çekirdek genomunu oluşturan DNA'nın yaklaşık %50'lik bir kısmı tekrar dizisi iken, protein kodlayan genlerin egzon kısımları genomun %2'sinden azını oluşturur. Çekirdek genomunda 20-25 bin kadar protein kodlayan gen ile, yaklaşık aynı sayıda RNA kodlayan gen olduğu düşünülmektedir. Hücre içi işleyişte protein kodlayan genler ile RNA genlerinin etkileşimi gen ekspresyon kontrolünü sağlamakta ve her genin uygun hücrede, uygun zamanda ve uygun miktarda ifade edilmesi sağlanmaktadır. Genlerin kromozomlar üzerindeki dağılımı değişiklik göstermektedir: Genden zengin bölgeler arasında subtelomerik bölgeler yer alırken, gen çölleri arasında sentromerler sayılabilir.

Kromozomal hastalıklar ve tek gen hastalıkları genetik hastalıkların iki büyük grubunu oluşturmaktadır. Kromozomal hastalıklarda temel sorun, genomdaki artış ya da azalışa bağlı olarak, yapısal herhangi bir değişiklik taşımayan genlerde gen dozajının değişmesi ve buna bağlı olarak, hücre içi gen ekspresyon dengesinin bozulmasıdır. Tek gen hastalıklarında ise mutasyona uğramış bir genin işleyişinin bozulması etkindir.

Kromozomal hastalıklar, kromozomlarda gözlenen sayısal ve yapısal değişiklikler ile karakterizedir. Sayısal anomaliler, hücre içindeki gen dozajını değiştirerek her zaman belirgin bir fenotipe neden olurken, yapısal anomalilerde fenotipik etki görülmesi, yapısal anomalinin dengeli ya da dengesiz oluşuna bağlıdır. Dengeli yapısal anomalilerde (Karşılıklı/robertsoniyen translokasyon, inversiyon vb.) hücre içindeki DNA miktarında artış/azalış

bulunmazken, dengesiz yapısal anomalilerde (Delesyon, duplikasyon, izokromozom) hücre içi DNA miktarı artar ya da azalır. Dengeli yapısal anomaliler kişinin kendisi için herhangi bir sağlık sorunu oluşturmaz, ancak gametogenez sırasında bu anomaliler dengesiz olarak aktarılabilir ve tekrarlayan gebelik kayıpları ya da çoklu doğumsal anomali, motor-mental retardasyonlu çocuk doğumuna neden olabilir. Dengesiz yapısal anomalilerde fenotipi belirleyen temel etmenler dengesizliğin hangi kromozomal bölgede olduğu (Gen içeriği) ve genomda artışa mı yoksa azalışa mı neden olduğudur. Genomda genel olarak artışlar daha iyi tolere edilir. Haploid genomun %2'sinden fazlasının delesyonu ile %4'ünden fazlasının duplikasyonu intraüterin letal seyredir.

Dengeli kromozomal translokasyonlar ve inversiyonlara prenatal tanıda yaklaşık %0,09 oranında rastlanmaktadır. Kalıtılan bir dengeli yapısal anomalinin ilgili gebelikte bir sorun yaratması beklenmezken, ilerideki üreme sorunları ile ilgili genetik danışmanlık gerektirir. *De novo* görünürde dengeli (Yalnızca karyotip ile tanı konmuş) yapısal anomalilerde ise submikroskopik dengesizliğe bağlı olarak yaklaşık %7 oranında konjenital anomalili bebek riski bulunmaktadır (1).

KROMOZOM ANALİZİNİN TARİHSEL GELİŞİMİ VE PRENATAL TANI

Kromozomlar ilk olarak, bitki hücrelerinde Karl Wilhelm von Nägeli tarafından 1842 yılında gözlenmiş, ardından da Walther Flemming hayvan hücrelerinde tanımlamıştır. X/Y kromozom sistemini 1923 yılında Theophilus Painter açıklamış; 1956 yılında Joe Hin Tjio ise insan hücresindeki toplam kromozom sayısının 46 olduğunu saptamıştır. Amniyosentez (AS) ya da koryon villus biyopsisi (KVB) ile alınan fetal dokudan kromozom analizi 1960'lardan beri yapılabilmesine karşın, rutin kullanımı özellikle *giemsa* bantlama yönteminin

bulunması ile 1980'lerden sonra olmuştur, bu şekilde hem sayısal hem yapısal kromozom anomalileri saptanabilmektedir (2).

Prenatal sitogenetik inceleme yalnızca bölünen canlı hücrelerde yapılabilir, 3-10Mb (1Mb=1 milyon baz çifti) ayırım gücüyle dengeli, dengesiz ve sayısal anomalileri saptayabilir. Ancak kabaca 4-5Mb'den küçük delesyon ve duplikasyonlar için floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi daha yüksek ayırım gücünde bir yöntem gereklidir ki, burada kullanılacak probun seçimi için görece sık rastlanan bir mikrodelesyon/mikroduplikasyon sendromundan klinik olarak şüphelenmek gereklidir ve tüm genom hakkında fikir vermez. Mikrodelesyon/mikroduplikasyon sendromlarının birleşik insidansı yaklaşık 1:1000'dir, anne yaşından bağımsızdır (2).

Prenatal tanı amaçlı mikrodizin analizinde (CMA, *chromosomal microarray*) invaziv yol ile fetal doku alınmalıdır, dokunun bölünebilir olması gerekli değildir. Bu yöntem ile, en az 100-200Kb boyutundaki kopya sayısı değişiklikleri (CNV, *Copy Number Variations*) ve tüm anöploidiler saptanabilirken dengeli yapısal anomaliler saptanamaz. Mikrodizin, temelde kromozomal hastalıkların tanısında kullanılmakla birlikte delete/duplike bölgede, bir tek gen hastalığı ile ilişkili gen bulunması halinde tek gen hastalıklarının da tanısını koymada etkili olabilmektedir.

Yapısal anomalisi olan bebeklerde ilk trimesterde %49, ikinci trimesterde ise %17 civarında kromozomal anöploidi saptanmaktadır. Konvansiyonel sitogenetikle saptanabilen değişiklikler; ileri anne yaşı, pozitif tarama testi gibi endikasyonlarla yapılan invaziv girişimlerde KVB ile %6, AS ile %3 oranında gözlenmektedir. Mikrodizin ile prenatal tanıda yapısal herhangi bir anomali saptanmayan gebeliklerde yaklaşık %1-1.7, yapısal anomali saptananlarda ise %6 oranında submikroskopik değişiklik saptanmaktadır (1,3).

TEKNİK OLARAK MİKRODİZİN

Mikrodizin, yüksek ayırım gücüne sahip, tüm genomdaki submikroskopik/mikroskopik kopya sayısı değişikliklerini saptayan bir yöntemdir. Çip üzerine yerleştirilmiş oligonükleotidler ile hedef DNA'nın melezlenme oranına göre genomdaki artış ve azalışları saptar. Günümüzde rutin tanıda iki tip mikrodizin kullanılmaktadır, ilki karşılaştırmalı genomik hibridizasyon temelli aCGH (Array comparative genomic hybridisation); diğeri ise tek nükleotid polimorfizmi (SNP, single nucleotide polymorphism) temelli SNP dizindir.

aCGH dizinde, mikrodizin kuyucuklarına tüm genomu belli bir ayırım gücüyle (Rezolüsyon) kapsayan oligonükleotid probalar yerleştirilir ve mikrodizin plakası üzerine referans DNA ile hasta DNA'sı farklı florokrom boyalar ile işaretlendikten sonra melezleme için bırakılır. Melezleme için hasta ve kontrol DNA'ları aynı miktarda kullanılır ve hasta DNA'sındaki artış ve azalışların (Duplikasyon/delesyon) referans DNA ile kompetitif olarak, kuyucuklardaki DNA ile melezlenmesi prensibine dayanır. Hastadaki duplike bölgeler referans genoma göre görece daha fazla kopya sayısı içerdiğinden uygun kuyucuğa daha yüksek oranda bağlanarak daha fazla sinyal verecektir. Benzer şekilde hastadaki delete bölgelerde ise referans DNA görece fazla olacağından, referans DNA sinyali artmış olacaktır. Melezleme sonunda her kuyucuktaki hasta/referans DNA sinyalleri otomatize bir şekilde hesaplanarak sonuç elde edilecektir. Hasta/referans DNA sinyali oranının "1" olması, herhangi bir kayıp ya da kazanım olmadığını gösterirken birden yüksek olması bu bölgede duplikasyon/trizomi lehine; birden düşük olması ise delesyon/monozomi lehine yorumlanır. Delesyon/duplikasyon bölgesinin yerleşimi, oranın birden düşük/yüksek çıktığı bölgelerdeki ardışık problemlerin tayini ile yapılır ve gen içeriğine, boyutuna göre patojenik olup olmayacağına karar verilir. aCGH çalışmalarının ayırım gücü

kullanılan problemlerin sayısı ve genomdaki dağılımlarına göre farklılık gösterebilir. Pek çok laboratuvarında postnatal testler 50-100kb üzerindeki değişiklikleri saptarken, bu oran prenatal testlerde daha büyüktür (3). SNP'ler genomda yaygın, popülasyonda ise %1'den sık gözlenen tek nükleotidlik varyasyonlardır. İnsan genomunda yaklaşık 4-5 milyon SNP vardır (Ortalama 1/1000 nükleotid). SNP dizinde problemler, kişiler arasında bulunan tek nükleotid değişimlerini içerecek şekilde tasarlanır ve problemlere sadece hasta DNA'sı melezlenir. Her bir SNP için iki kuyucuk tayin edilerek birine yabancı tip, diğerine ise polimorfik aleli saptayacak şekilde bir tasarım yapılır. Yabancı

tip/polimorfik alel kuyucuklarına bağlanan DNA sinyalinin yoğunluğu, internal kontrol DNA'sının ortalama yoğunluğuna kıyaslanarak kopya sayısı değişiklikleri saptanır. Milyonlarca polimorfik bölgenin genotiplemesi ile DNA'daki delete/duplike bölgelerin saptanması mümkün olur. SNP dizinler ile uzun homozigote bölgeleri saptanabileceği için üniparental dizomi (UPD), zigozite, anne hücresi kontaminasyonu, akrabalık ve triploidi/tetraploidi hakkında da bilgi sahibi olunabilir (4).

Konvensiyonel sitogenetik (karyotip), aCGH ve SNP yöntemlerinin kullanım alanları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Konvensiyonel sitogenetik, aCGH ve SNP dizinin kullanım alanları, avantaj ve dezavantajları

	Konvensiyonel sitogenetik	aCGH dizin	SNP dizin
Anöploidi	+	+	+
Dengeli kromozomal değişiklikler	+	-	-
Triploidi	+	-	+
UPD/akrabalık	-	-	+
Maternal kontaminasyon	-	-	+
<5Mb değişiklikler	-	+	+
<%30 mozaiklik*	+	-	-
Kültür ile hücre çoğaltılma gereği	+	-	-
Test sonuçlanma süresi	~3 hafta	~1 hafta	~1 hafta
Saptanan dengesizlik bölgesinin yerleşimi	Sübjektif	Objektif	Objektif

*Kromozomal mozaiklik amniyosentez ile yaklaşık %0.25, koryon villus biyopsisi ile %1 vakada gözlenir.
aCGH dizin: Komparatif Genomik Hibridizasyona dayalı mikrodizin,
SNP dizin: Tek Nükleotip Polimorfizmine dayalı mikrodizin

KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİ VE SINIFLANDIRMA

Mikrodizin, temelde kopya sayısı değişikliklerini (CNV, copy number variations) saptamada kullanılan bir yöntemdir. Kopya sayısı değişiklikleri, genomda boyutu birkaç kilobazdan birkaç megabaza değişen; bir, iki ya da daha çok sayıda olan yapısal DNA

varyantlarıdır. Delesyon, duplikasyon, inversiyon ya da translokasyonlar gibi genomik yeniden düzenlenmeler ile oluşur. Sağlıklı insanlarda da sıklıkla rastlanır, sağlıklı bir insanda 800 kadar CNV olabilir, çoğu benign ve küçük değişikliklerdir. İnsan genomunun %12'lik bir kısmını oluşturabilir ve kabaca genomik varyasyonun %0.1-7'sinden sorumlu tutulmaktadır (5).

Ancak bununla birlikte, CNV'lerin %40 kadarının genlerle çakışması nedeni ile CNV'lerin gen ekspresyon kontrolünde rolü olduğu da düşünülmektedir (6). Ancak, kritik bir bölgede meydana gelecek dengesizlikler fenotipik bulgular ortaya çıkmasına neden olacaktır.

Popülasyonda %1'den fazla gözlenen CNV'ler kopya sayısı polimorfizmleri olarak adlandırılır ve iki insan arasında SNP'lere göre 100 kat fazla farklılık gözlenir. CNV'lerin çoğu kalıtılırken bir kısmı, yaklaşık 1.7×10^{-6} - 1.2×10^{-4} mutasyon hızıyla *de novo* oluşur, bu mutasyon hızı, *de novo* nokta mutasyon hızından (2×10^{-8}) yüksektir (7).

CNV'ler ACMG (American College of Medical Genetics) ve ESHG (European Society of Human Genetics) standartlarına göre; CNV boyutu, CNV gen içeriği, referans veri tabanlarında ve literatür verilerinde CNV'nin patojenik etkisi olup olmadığı temel alınarak 5 alt grupta değerlendirilmektedir (8,9): Patojenik, olası patojenik, VUS/VOUS (variant of unknown significance), olası benign, benign. CNV'lerin patojenite değerlendirilmesinde kullanılan kriterler Tablo 2'de verilmiştir. Bu derlemede olası benign ve benign sonuçlardan çok patojenik sonuçlar ve VUS'lar üzerinde durulacaktır.

Tablo 2: Kopya sayısı değişikliklerinin patojenite değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

	Patojenik	Benign	VUS
CNV hasta ebeveynden kalıtılmışsa	+		
CNV sağlıklı ebeveynden kalıtılmışsa		+	
CNV ile ilgili veritabanlarında hasta bireyler bildirilmişse	+		
Duplikasyon ve dozaj duyarlı gen içermiyorsa		+	
Delesyon ve morbid OMIM genleri içeriyorsa	+		
Sağlıklı bireylere ait veritabanında tanımlıysa		+	
CNV için tanımlı <i>knockout</i> fare fenotipi tanımlıysa	+		
CNV haployetmezlik gösteren genler içeriyorsa	+		
CNV değişken fenotip gösteriyorsa	+		+
Bildirilmiş CNV sendromu varsa (delesyon veya duplikasyon)	+		
Bilinen CNV bölgesinde olmayan varyantlar		+	+
Varyantın bulunduğu bölge gen içermiyorsa		+	

VUS: Klinik önemi bilinmeyen varyant, CNV: kopya sayısı değişiklikleri, OMIM: Online Mendelian Inheritance In Men veritabanı (www.omim.org)

PATOJENİK VE OLASI PATOJENİK SONUÇLAR

Bilinen sendromlardan sorumlu genleri içine alan CNV'ler sıklıkla patojenik olarak kabul edilir. Riggs ve ark.'a göre en az üç ya da üzeri, birbirinden bağımsız

kayıp veya kazanımın, benzer fenotiple raporlanmış olması sonucun patojenik olduğunun göstergesidir (10).

Patojenik sonuçlar üç grup altında toplanmıştır (11):

A1.Fenotipi açıklayan sonuç

A2.Yatkınlıkla ilişkili lokuslardaki varyantlar (VISL, variants in susceptibility loci): Yüksek düzeyde fenotipik heterojenite, eksik penetrans ve değişken ekspresivite gösteren CNV'lerdir. İnsidansının etkilenmiş bireylerde daha fazla olması nedeniyle patojenik kabul edilir. İstatistiksel olarak da anormal ultrasonografi (USG) bulgusu olan fetüslerde, olmayanlara göre daha fazla saptandığını gösteren çalışmalar vardır. Sıklıkla sağlıklı ebeveynlerden kalıtılır. Fenotipik ekspresyon, genetik ya da genetik dışı faktörler tarafından belirginleşir. Herediter kanser sendromları, epilepsi, otizm, psikiyatrik hastalıklar gibi hastalıklara yatkınlık yaratan varyantlar bu grupta yer alır. Saptanması durumunda, değişken ekspresivite ve eksik penetrans nedeniyle özellikle prenatal tanıda raporlanması tartışmalıdır.

A3.Tesadüfi sonuçlar, (IF, incidental findings): Test endikasyonu ile ilişkili olmayan ancak potansiyel olarak sağlık ve üreme sorunu yaratacak patojenik varyantlar olarak tanımlanır. Alzheimer hastalığı, X'e bağlı ve otozomal resessif hastalıklar için taşıyıcılık (Örneğin; kistik fibrosis, Duchenne müsküler distrofi) ya da etkin tedavi seçeneği bulunan/bulunmayan erişkin başlangıçlı hastalıklar ile ilgili değişikliklerin saptanması bu gruba örnek olarak verilebilir. Burada elde edilen sonuçların hepsinin ya da yalnızca müdahale edilebilecek olanların raporlanması gibi çelişkili görüşler vardır (12).

VUS (Variants of Unknown Significance)

VUS, ender ya da yeni (novel) saptanan, klinik bir tabloyla bağlantısı ya da patojenitesi ne saptanabilen ne de dışlanabilen CNV'lerdir. Bir CNV saptandığında *de novo* olduğunu ya da kalıtıldığını anlamak amacıyla ebeveynlerde de tarama yapılır, normal ebeveynde saptanmadığında fenotipi açıklayıcı olma olasılığı yüksek kabul edilir, ancak CNV'ler ile ilişkili fenotiplerin bir kısmı intraüterin dönemde belirgin değildir, *de novo* CNV oluşma hızı

da düşünüldüğünde her *de novo* değişiklik patojen kabul edilemeyeceği gibi normal ebeveynlerden birinde de saptanan değişikliğin, düşük penetrans/değişken ekspresivite göz önünde bulundurularak benign kabul edilmemesi gerekir. Olası patolojik sonuçlar açısından ebeveynlerden de eşzamanlı DNA örneği alınması süreci hızlandıracaktır (6). Tüm endikasyonlarla prenatal CMA'da VUS saptama oranı kabaca %1.4 olarak verilmektedir (13). CMA ile elde edilen veri sayısı arttıkça VUS sayısı da giderek azalacaktır (1).

Srebniak ve ark.'nın yaptıkları meta-analizde, artmış anne yaşı ya da parental aksiyete nedeniyle incelenen 10.614 fetüste patojenik CNV %0.84 oranında saptanırken: bunlardan %0.37'si erken başlangıçlı sendromik hastalıklar ile ilişkili, %0.3'ü yatkınlıkla ilişkili varyantlar (VISL), %0.11'i ise erişkin başlangıçlı hastalıklar ile ilişkili (toplamda ~%0.8) bulunmuştur (14).

CNV YORUMLANMASI VE RAPORLANMASINDA ÖNEMLİ NOKTALAR

CNV yorumlanması kısmında CNV'nin boyutu ve gen içeriğinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Gen içeriğinin klinik korelasyonu olup olmadığının anlaşılması için hastaya ait klinik bilginin mutlaka laboratuvar ile paylaşılması gerekmektedir. Klinik korelasyon saptanmayan tesadüfi bulguların, penetrans ve ekspresivitenin, referans veritabanlarının ve literatür verilerinin değerlendirilmesi önemlidir. Kalıtımın değerlendirilmesi için parental çalışmalar yapılmalı ve özellikle VUS saptandığında hastalığın kalıtım kalıbı ile VUS'un ailedeki dağılımının uygun olup olmadığı değerlendirilmelidir. Yapılabiliyorsa homozigote bölgelerinin saptanması, akrabalığın ve üniparental dizominin saptanmasında kullanılabilir. Prenatal tanıda maternal hücre kontaminasyonu ile kimerizm/mozaiklik araştırılması da tanının güvenilirliğine önemli bir katkı sağlayacaktır. VUS/VISL bulgularının raporlanması, parental

anksiyeteyi artırabileceği gibi gereksiz medikal abortus kararına da neden olabilir.

USG ANOMALİSİ OLAN VE OLMAYAN FETÜSLERDE CMA

İleri anne yaşı, anormal ilk trimestr tarama bulgusu ya da parental anksiyete nedeniyle yapılan CMA'larda %0.5-2 aralığında patojenik CNV saptanmıştır (11). Kültüre gerek duymadan kısa sürede yüksek ayırım gücünde sonuç vermesi nedeniyle invaziv girişim yapılacak tüm kadınlara CMA uygulanması önerilmiş olmakla birlikte VUS, VISL ve tesadüfi varyantlar nedeniyle bunu uygulamak güçtür. Özellikle ağır çocukluk dönemi ile ilişkili varyantların (Prader-Willi Sendromu, Duchenne Müsküler Distrofi gibi) saptanması durumunda ebeveynler beklenmedik durumun ağırlığı nedeniyle gebeliği sonlandırma kararı verebilmektedir. Normal fetüslerde beklenmedik tesadüfi varyant saptama oranı yaklaşık %0.6 olarak verilmiştir, bu oran anormal fetüslerde %0.5'tir. Yapılan bir çalışmada USG anomalisi olmayan 1330 fetüste 1:148 (%0.67) erken başlangıçlı, sıklıkla ciddi bir hastalık, 1:222 (%0.45) erken başlangıçlı bir hastalık, 1:74 (%1.35) nörolojik hastalık, 1:443 (%0.22) geç başlangıçlı bir hastalık ile ilişkili varyant bulma riski (toplamda %2.69) bulunduğu bildirilmiştir (15).

CNV'ler ile bazı spesifik fetal anomaliler arasında bir bağ olduğu uzun yıllardır bilinmektedir: 22q11.2 delesyonu ile kardiyak anomaliler (DiGeorge Sendromu), 17p13.3 delesyonu ile lizensefali (Miller-Dieker Sendromu) gibi (4). Normal karyotip ve USG anomalisi olan fetüslerde CMA ile %5.2-10 oranında ek kromozomal anomali saptanırken bu oran USG anomalisi olmayan fetüslerde %0.5-2 düzeyindedir (11). CNV'ler ile en çok ilişkisi saptanan yapısal anomaliler farklı çalışmalarda değerlendirilmiştir.

Shaffer ve ark. 2858 USG anomalisi olan fetüste retrospektif olarak CMA sonuçlarını değerlendirdikleri çalışmada, tek USG anomalisi olan vakalarda %5.6 (n=99/1773), iki ya da daha fazla organ sistemi anomalisi olanlarda %9.5 (n=77/808), izole büyüme geriliğinde %2.6 (n=2/76), hafif USG bulgularında ise %2.6 (n=2/77) oranında klinik olarak etkili patojenik CNV saptamışlardır. Anomali tipine göre ise holoprozensefalide %10.6, posterior fossa defektinde %14.6, hipoplastik sol kalpte %16.2, ventriküler septal defekte %10.6, iskelet sistemi anomalisinde %10.7, yarık damak-dudakta ise %16.2'lik bir oran bulmuşlardır (16). Tonni ve ark. ise 112 USG anomalisi ve normal karyotipi olan fetüste; konjenital kalp hastalığı olanlarda %30.4, çoklu doğumsal anomalisi olanlarda %28.5 ve santral sinir sistemi anomalisi olanlarda %18.8 oranında patojenik CNV saptamışlardır (17). Oneda ve ark. ise değişik çalışmalarda yapısal anomalisi olan fetüslerde prenatal tanıda, konvensiyonel sitogenetik ve mikrodizin ile saptanan patojenik değişiklik oranlarını Tablo 3'teki gibi bildirmişlerdir (11).

Yapılan çalışmalarda çoklu yapısal anomalisi olan bebeklerde ve düşük materyallerinde CMA ile patojenik CNV saptama oranı kabaca %8-30 arasında bulunmuştur; ileri anne yaşı nedeniyle CMA yapılan 6732 fetüste %1, anormal USG bulgusu nedeniyle CMA yapılan 2225 fetüste ise %4.4 oranında patojenik CNV saptanmıştır (18). Ancak izole USG anomalisi olan bebeklerle ilgili durum çok net olmamakla birlikte Hillman ve ark.nın 2013 yılında yayınladıkları çalışmada bu oranın çoklu doğumsal anomalisi olan bebeklerdekine yakın şekilde %4.6-7.9 arasında bulunduğu ancak burada izole USG anomalisi sınıflamasında, çalışmalar arasında büyük farklılık ve tutarsızlık olduğu bildirilmiştir (13). Bu nedenle izole USG anomalisi olan fetüslerde CMA kullanımı tartışmalıdır.

Tablo 3: Oneda ve ark.'nın çalışmasında saptanan, değişik çalışmalardaki prenatal ultrasonografi anomalisi olan fetuslarda konvansiyonel sitogenetik ve mikrodizin ile anomali saptanma oranları (11).

Anomali	Doğum oranı	Anormal karyotip oranı	Ek CMA bulgusu	VUS*	En sık CNV gözlenen anomali
Konjenital Kalp Hastalıkları	%0.5-07	%18-22	%7	%3.4	-Ekstrakardiyak anomaliyle birlikte VSD, -sol ventrikül akış defektleri
NT yüksekliği		Genetik hastalıkla birliktelik %0.5-6.6	İzole ise %4 Ek malformasyon + %7	%1	
Yarıklı damak/dudak	1/700	Sendromikse %50 İzoleyse %1	%10-15		
SSS anomalileri	%0.15		%11		Dandy-Walker Holoprozensefali
İntaüterin gelişme geriliği			İzoleyse %1.3 Amniyon sıvısı anomalisi, hafif USG bulguları varsa %5.7		

CMA: Mikrodizin, VUS: Klinik önemi bilinmeyen varyant, CNV: Kopya Sayısı Değişikliği, VSD: Ventriküler Septal Defekt, NT: Ense Kalınlığı (*nuchal translucency*), SSS: Santral Sinir Sistemi, USG: Ultrasonografi

* CMA ile saptanan

MİKRODİZİNİN ENDER KULLANIM ALANLARI

Markır Kromozomların Tanımlanması

SMC (supernumerary marker chromosomes), gen içeriği standart karyotiple genellikle saptanamayan küçük kromozom parçalarıdır, yaklaşık 1/2500 AS'de gözlenir. Çoğunlukla *de novo* oluşmakla birlikte %30 kadarı bir ebeveynden kalıtılır. Markır kromozomun içerdiği kromozom bölgesi için bölgesel trizomi nedenidir ve fenotipik etkisini markır kromozomun içeriğini saptamadan öngörmek imkânsızdır. Satellitsiz markırlarda %15, satellitlilerde %11 kadar anormal fenotip gözlenir. Markır kromozom varlığına rağmen aCGH'de dengesizlik bulunmaması SMC'de yalnızca perisentromerik heterokromatin olduğu ya da çok düşük mozaiklik lehine yorumlanabilir (6).

Triploidi Saptanması

aCGH'de pek çok hücrede elde edilen referans ve test DNA'ları eşit oranda kullanılarak kıyaslama yapılır, bu nedenle tek hücre içindeki haploid genom fazlalığı olan triploidi; her ne kadar 69,XXY kromozom kuruluşunda, cinsiyet kromozomları oranındaki sapma nedeniyle saptanabilse de, 69,XXX aCGH ile saptanamaz; referans DNA kaynağı olarak 47,XXY'li bireylerin kullanılması triploidi ve cinsiyet kromozomu anomalilerini saptama oranını arttırmıştır. Ancak, aCGH'nin triploidi tanısında kullanılamaması, pek çok triploid gebelikte anormal USG bulguları gözleneceği düşünüldüğünde çok büyük bir sorun olarak görülmemelidir (6).

Snp Dizin ile Akrabalık ve Üniparental Dizomi Saptanabilir

Üniparental dizomi sıklıkla trizomik kurtarma sonucu oluşur ve dizomik gameteki bölünme hatası mayoz I'de ise izodizomi, mayoz II'de ise heterodizomi ile sonuçlanır. İzodizomide homolog kromozomlar aynı olacağı için, heterozigozite yokluğu (AOH, absence of heterozygosity) gözlenecektir ve bu da SNP dizin ile saptanabilecektir. Heterodizomide ise homozigozite dizilerinden çok, sadece bir ebeveynin alelleri saptanacaktır, bunun içinse ebeveynlerde de eşzamanlı SNP mikrodizin çalışmak gereklidir. UPD saptanması imprinting kusurlarının, otozomal resesif hastalıkların görülme olasılığının, UPD eksik bir trizomik kurtarma ile oluştu ise mozaik trizomi riskinin göstergesi olabilir. Uzun AOH dizileri ebeveynler arası akrabalığı da ortaya koyabileceği için, pek çok bölgede saptanması; bebeğin, annenin birinci derece akrabası ile birlikteliği sonucu oluştuğunun göstergesi olabilir. Test öncesi danışmanlıkta bunun da açıklanması uygun olacaktır (6).

MİKRODİZİNİN PRENATAL KULLANIMI İLE İLGİLİ ÇEŞİTLİ DERNEK KILAVUZLARININ ÖNERİLERİ

Tıbbi Genetik Derneği'nin "Türkiye Moleküler Karyotipleme Standartları İyi Uygulama Kılavuzu"nda, invaziv girişim yapılacak her gebeye mikrodizin seçeneği sunulabilmekle birlikte ~%1-1.5 yanlış pozitif ya da klinik anlamı bilinmeyen CNV'ler nedeniyle ek testler gerekebileceği ya da bu durumun ailede endişeye yol açabileceği vurgulanmaktadır. Aşağıdaki prenatal endikasyonlarda ise mutlaka moleküler karyotipleme (mikrodizin) önerilmesi belirtilmektedir:

1. Patolojik fetal ultrason bulgusu saptandığında (gebelik haftasından bağımsız)
2. İlk trimestir taramasında NT artışı saptandığında
3. Fetal karyotip analizinde markır kromozom veya *de novo* basit veya kompleks dengeli yeniden

düzenlenmelerde (yüksek çözünürlükte >750K kitler kullanılmalıdır)

4. Daha önceki gebeliklerinde açıklanamamış anomalili bebek/ölü doğum/tekrarlayan gebelik kaybı öyküsünde (olası kriptik dengesizlikleri saptamak amacıyla)

5. Fetal karyotip analiz kalitesinin düşük olması (<400 kb) durumunda ya da şüpheli bir kromozom saptandığında ve diğer tekniklerle (bantlamalar ve FISH) açıklanamayan durumlarda (19).

Avrupa İnsan Genetiği Birliği (ESHG, European Society of Human Genetics), prenatal tanıda CMA'yı yalnızca yapısal anomalisi olan fetüsler için önermekte ve USG bulgusunu açıklamayan CNV'lerin raporlanmamasını önermektedir (9).

ACOG'un (The American College of Obstetricians and Gynecologists) ve SMFM (*Society for Maternal Fetal Medicine*) kılavuzunda, USG anomalisi olmayan ve normal karyotip saptanan bebeklerde patolojik CNV saptama oranı kabaca %1.7'dir, bu nedenle USG anomalisi olmayan bebeklerde invaziv girişim yapılacaksa mikrodizin önerilebilir denmektedir. USG anomalisi olan ve normal karyotip saptanan bebeklerde ise patolojik CNV saptama oranı kabaca %6'dır ve mikrodizin karyotipten önce ilk test olarak önerilmektedir. Eğer USG bulguları bir anöploidiyi işaret ediyorsa mikrodizinden önce karyotip ve/veya FISH önerilirken, düşük materyallerinde ise canlı dokuya ve kültüre gerek duyulmaması nedeniyle ilk önerilen test mikrodizindir (20). CMA ile saptanan anomali sıklığı anne yaşından bağımsız olduğu için testin kullanımı sadece ileri anne yaşıyla sınırlandırılmaması, test yaptırmak isteyen tüm kadınlara test öncesi ve sonrası uygun genetik danışmanlık verilmesi ve hastanın VUS riskini kabul etme gereği vurgulanmaktadır. Ayrıca CMA ile klinik önemi olan tüm genetik değişikliklerin saptanamayabileceği, sonuçların yorumunun güç olabileceği, VUS, farklı biyolojik baba, akrabalık ya da

erişkin başlangıçlı hastalıklar bulunabileceği belirtilmektedir.

Kanada Obstetrisyen ve Jinekologları Derneği ve Tıbbi Genetik Derneği kılavuzunda (CCGM, Canadian College of Medical Genetics, SOGC, Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada) yapısal kromozom anomali riski düşük gebeliklerde (Örneğin: ileri anne yaşı, pozitif tarama testi, önceki gebeliklerde anöploidi öyküsü, fetal USG'de yumuşak bulgular gibi) CMA önerilmemekte; çoklu fetal anomali ya da NT ≥ 3.5 mm saptandığında hızlı anöploidi taramasından sonra CMA önerilmektedir. Test öncesi uygun genetik danışmanlık verilmesi önerilmekte; VUS için 500 Kb'den küçük delesyonlar ile 1 Mb'den büyük duplikasyonların, patojenite lehine yeterince veri olmadan raporlanmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Çocukluk ya da erişkin dönemi başlangıçlı hastalıklar için elde edilen ikincil verilerin, tıbbi olarak müdahale edilebilir durumlarda raporlanması gerektiği ancak aile ister ise her durumda raporlanabileceği bildirilmektedir (21).

FETAL KAYIPLARDA CMA KULLANIMI

Gebelik kayıplarından, büyük oranda sitogenetik anomaliler (%50-70) sorumludur. Bunların %60 kadarında otozomal trizomiler, %20 kadarında monozomi X, %20 kadarındaysa poliploidi gözlenir. 5 gebelik haftasından küçük düşüklerde %90, 10-20 gebelik haftası arası düşüklerde %30, 20 gebelik haftasından sonraki gebelik kayıplarındaysa %6-12 oranında kromozomal anomali gözlenir. Karyotip analizinde kültür başarısızlığının yüksek riskinin yanında maternal hücre kontaminasyonu ve maternal hücrelerin büyüme avantajı nedeniyle hatalı sonuç verilebilir. CMA için fetal ya da plasental doku kullanılabilmesi ve hücrelerin çoğaltılmasına gerek olmaması kullanımını kolaylaştırmakla birlikte yapılan çalışmalarda karyotipe oranla en az %10 daha etkin sonuç verdiği gözlenmiştir (2).

PRENATAL MİKRODİZİM ÖNCESİ GENETİK DANIŞMANLIKTAKİ DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KONULAR

Test öncesi danışmanlıkta testin amacı, yöntemi, fetal dokuyu alma yolları, SNP dizin ile akrabalık ve non-paternitenin saptanabileceği, erişkin başlangıçlı, değişken ekspresivite/eksik penetrans gösteren değişkenlerin tesadüfi olarak saptanabileceği (erişkin başlangıçlı hastalıklar için risk saptanması durumunda ebeveynlerin de risk altında olabileceği, saptanan hastalıkta seyrin kişiden kişiye farklılık gösterebileceği, bebek için hafif mi ağır mı seyredeceğinin bilinemeyebileceği); testin, başta VUS olmak üzere sınırlamaları, VUS saptanması durumunda ebeveynlerden de CMA çalışılması gerekebileceği açıklanmalıdır. CMA ile konvensiyonel sitogenetikle saptanan değişikliklerin çoğunun ve başka değişikliklerin saptandığı, ancak tüm genetik/gelişimsel hastalıkları dışlamadığı ve yaklaşık %2-3'lük bir arka plan riskinin sürdüğü anlatılmalıdır (4,22).

SONUÇ

Fetal USG'de bir ya da daha fazla anomalisi olan bebeklerde ilk tercih mikrodizindir. Konjenital kalp hastalıkları, multipl konjenital anomaliler ve SSS malformasyonları patolojik CNV'si olan hastalarda en sık gözlenen fetal anomalilerdir. Bununla birlikte intraüterin fetal kayıpta, kültür gerekmediği ve yüksek ayırım gücüne sahip olduğu için mikrodizim ilk tercihtir. CMA ile dengeli yapısal anomaliler ve triploidi saptanamaz. Ancak *de novo* dengeli translokasyon ya da markır kromozom gibi dengesizlik potansiyeli taşıyan kromozom anomalilerinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Test öncesi yazılı ve sözlü olarak aile, yöntemin sınırlamaları, sonuçların yorumlanması ve izlenecek yol hakkında bilgilendirilmeli ve onam formu imzalatılmalıdır. Onam formunda VUS, farklı biyolojik baba, akrabalık, geç başlangıçlı hastalıklar saptanabileceği, dengeli yapısal anomalilerin belirlenemeyeceği, normal sonucun tüm genetik ve gelişimsel hastalıkları dışlamayacağı yer almalıdır.

Yetersiz klinik bilgi test öncesi ve sonrası danışmanlıkta güçlükler yol açacağı için tüm anormal fetal ultrasonografik bulgular ve aile öyküsü laboratuvara bildirilmelidir. Laboratuvar ve klinisyen hangi varyantların rapor edileceğine dair karar vermeli, bu konuda aile bilgilendirilmeli (benign ve VUS/VISL olanlar yazılacak mı?) ve laboratuvar ile klinisyen arasında her aşamada iletişim mutlaka devam etmelidir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Çatışma Beyanı: Bu çalışmada herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84.
2. Lo JO, Shaffer BL, Feist CD, Caughey AB. Chromosomal microarray analysis and prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol Surv.* 2014;69(10):613-21.
3. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil Steril.* 2018;109(2):201-12.
4. Stosic M, Levy B, Wapner R. The use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):55-68.
5. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;444(7118):444-54.
6. Strassberg M, Fruhman G, Van den Veyver IB. Copy-number changes in prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11(6):579-92.
7. Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet.* 2007;39(7 Suppl):S43-7.
8. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020;22(2):245-57.
9. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet.* 2019;27(1):1-16.
10. Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM et al. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet.* 2012;81(5):403-12.
11. Oneda B, Rauch A. Microarrays in prenatal diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;42:53-63.
12. Patel A, Bi W. Incidental finding in Copy Number Variation (CNV) analysis. *Curr Genet Med Rep.* 2014;2(3):179-81.
13. Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(6):610-20.
14. Srebniak MI, Joosten M, Knapen MFCM, Arends LR, Polak M et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;51(4):445-52.
15. Van Opstal D, de Vries F, Govaerts L, Boter M, Lont D, van Veen S et al. Benefits and burdens of using a SNP array in pregnancies at increased risk

- for the common aneuploidies. Hum Mutat. 2015;36(3):319-26.
16. Shaffer LG, Rosenfeld JA, Dabell MP, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. Prenat Diagn. 2012;32(10):986-95.
 17. Tonni G, Palmisano M, Perez Zamarian AC, Rabachini Caetano AC, Santana EFM, Peixoto AB et al. Phenotype to genotype characterization by array-comparative genomic hybridization (a-CGH) in case of fetal malformations: A systematic review. Taiwan J Obstet Gynecol. 2019;58(1):15-28.
 18. Wang H, Chau MHK, Cao Y, Kwok KY, Choy KW. Chromosome copy number variants in fetuses with syndromic malformations. Birth Defects Res. 2017;109(10):725-33.
 19. Tıbbi Genetik Derneği. Eriřim tarihi: 25 řubat 2021:http://web.citius.technology/upload/Molek%C3%BCler%20Karyotipleme%20Standartlar%C4%B1_T%C3%BCrkiye.pdf.
 20. Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, Committee on Genetics, and Society for Maternal-Fetal Medicine; Practice Bulletin no. 162 summary: Prenatal diagnostic testing for genetic disorders. Obstet Gynecol. 2016;127(5):976-8.
 21. Armour CM, Dougan SD, Brock JA, Chari R, Chodirker BN, DeBie I et al. On-behalf-of the Canadian College of Medical Geneticists. Practice guideline: joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada. J Med Genet. 2018;55(4):215-21.
 22. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Electronic address: pubs@smfm.org, Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. Am J Obstet Gynecol. 2016;215(4):B2-9.