

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**24-28.GEBELİK HAFTALARINDA DOPPLER AKIM
DEĞİŞİKLİKLERİ İLE MATERNAL KANDA FETAL DNA
DEĞERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. İçten KIVANÇLI

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Acar KOÇ**

**ANKARA
2012**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**24-28.GEBELİK HAFTALARINDA DOPPLER AKIM
DEĞİŞİKLİKLERİ İLE MATERNAL KANDA FETAL DNA
DEĞERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. İçten KIVANÇLI

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Acar KOÇ**

**ANKARA
2012**

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Tıpta uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

“24-28. gebelik haftalarında doppler akım değişiklikleri ile maternal kanda fetal DNA değerleri arasındaki ilişki.” başlıklı Dr.İçten KIVANÇLI'ya ait bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

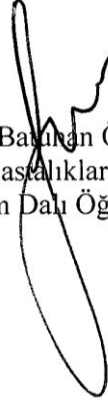
Tez savunma Tarihi: 18/01/2013



Prof.Dr.Acar KOÇ
Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Prof.Dr.Murat SÖNMEZER
Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Doç.Dr.Balıncan ÖZMEN
Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından desteklenen 05B3330014 Nolu "Noninvaziv Prenatal Tanı ve Gebelik Komplikasyonlarının Erken Tanısında; Maternal Dolaşımdaki Hücre Dışı Serbest Fetal DNA'nın Kullanım Etkinliği" başlıklı proje kapsamında gerçekleştirilen uzmanlık tezimin yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında emeği geçen tez danışmanım Prof. Dr. Acar Koç'a, laboratuvar çalışmalarında büyük yardımlarını gördüğüm başta Prof. Dr. Aşlan Tükün, Doç. Dr. Halil Karabulut ve Biyolog Efsun Eren olmak üzere tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ekibine, Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık eğitimim süresince katkılarından dolayı tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Dr. İçten KIVANÇLI

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
SEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TERMİNOLOJİ VE KLASİFİKASYON	3
2.2. İNTRAUTERİN BÜYÜME KISITLILIĞI NEDENLERİ	6
2.3. FETÜS BÜYÜMESİNİN DÜZENLENMESİ	9
2.4. DOPPLER ULTRASONOGRAFİ	10
2.5. MATERNAL PLAZMADA HÜCRE DIŞI SERBEST FETAL DNA	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. HASTA GRUBU	24
3.2. DEĞERLENDİRME	24
3.3. KAN ÖRNEĞİ	26
3.4. MATERNAL KANDAN DNA İZOLASYONU	26
3.5. FETAL VE TOPLAM (FETAL+MATERNAL) DNA KANTİTASYONU	26
3.6. KANTİTASYON	27
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	28
4. BULGULAR	29
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ	39
ÖZET	40
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	44

SİMGELER ve KISALTMALAR

C	: Plazmadaki DNA miktarı (kopya/ml)
DGA	: Date of gestational age
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSO	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
fmRNA	: Fetal messenger ribonükleik asit
IUGR	: İntrauterin gelişme geriliği
NPV	: Negatif prediktif değer
PPV	: Pozitif prediktif değer
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Q	: PCR örneğindeki DNA miktarı (kopya/ml)
RNA	: Ribonükleik asit
RQPCR	: Real time kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SGA	: Gestasyonel yaşa göre küçük
SNT	: Sinsityotrofoblast
SRY	: Sex-determinating region y
ST	: Sitotrofoblast
VDNA	: DNA izolasyonunda elde edilen DNA'nın hacmi (200 mikrolitre)
VPCR	: PCR için kullanılan kalıp DNA hacmi (5 mikrolitre)
Vext	: DNA izolasyonunun yapıldığı plazma hacmi (1000 mikrolitre)

SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Plasentasyon aşamasındaki trofoblast invazyonu	10
Şekil 2.2.	Umbilikal arter için normal ve patolojik akım trasesi.....	12
Şekil 2.3.	Uterin arter için normal ve patolojik akım trasesi.....	13
Şekil 2.4.	Orta serebral arter akım trasesi.....	14
Şekil 2.5.	Ductus venozus için normal ve patolojik akım trasesi	14
Şekil 2.6.	Doppler değişikliklerinin zamansal sıralaması.....	16
Şekil 2.7.	Sinsityotrofoblastlardan DNA materyalinin dökülme modelleri.....	20
Şekil 3.1.	Hasta ve kontrol gruplarında total DNA miktarları	31
Şekil 3.2.	Hasta ve kontrol gruplarında hücre dışı serbet fetal DNA miktarları	32

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. IUGR nedenleri	8
Tablo 3.1. Gebelikte görülen hipertansif hastalıkların tanısı.....	25
Tablo 3.2. Real-time PCR'da kullanılacak primer ve prob dizileri.....	27
Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, örnekleme yapıldığı gebelik haftası, doğum sırasındaki gebelik haftası, fetal ve total DNA değerleri.....	29
Tablo 4.2. Gruplara göre tanımlayıcı istatistik tablosu.....	30
Tablo 4.3. Test istatistikleri.....	31
Tablo 5.1. Preeklampsi ile komplike gebelikler ile normotansif kontrol grubunda maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA konsantrasyonlarını karşılaştıran çalışmalar	38

1. GİRİŞ

Maternal plazmada fetal DNA varlığı, noninvaziv bir yöntemle fetal genetik materyal elde etme imkanı vermesi nedeniyle etraflıca incelenmiştir. Gösterilmiştir ki, maternal plazmaya fetal DNA salınımı erken fizyolojik bir fenomen olup gebelik haftası ilerledikçe artmaktadır (1,2). Artmış fetal DNA salınımı hem fetüs hem de plasentayı etkileyen patolojik durumlar için belirteç olabilir (3,4). Anormal plasantasyon sıklıkla intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ve preeklampsi patogenezinde yer alır ki bunlar izole ya da beraber görülebilir. Preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği (IUGR) plasental yatakta trofoblast invazyonunda anormalliklerle ilişkilidir. Normal gebelikte, uterin spiral arterlerin trofoblastik invazyonu vaküler rezistansı azaltıp uygun fetoplasental kan dolaşımına izin verecek şekilde gerçekleşir. IUGR ve preeklampside bu adaptif fenomen genellikle başarısız olup, spiral arterlerde azalmış infiltrasyon ve modifikasyon uterin sirkülasyonda yüksek direnç sebep olur (5). Uterin arterlerde bozulmuş kan akımı, uterin arter Doppler akım çalışmaları ile gösterilebilir; bunun da preeklampsi ve/veya IUGR için risk altında olan gebe kadınların ayırımında değeri olduğu gösterilmiştir (6). IUGR'de ayrıca fetal dolaşımdaki yeniden dağılım nedeniyle umbilikal arter Doppler akımlarında da değişiklikler meydana gelir. Serebral ve kardiyak kan akımları öncelikli iken vazokonstrüksiyon nedeniyle periferel vasküler direnç artar ve sonuçta diğer organlara kan akımı azalır.

Bozulmuş plasantasyon özellikle uterin duvardaki sitotrofoblastlarda artmış apoptoz oranları ve sinsityotrofoblast mikrovillus partiküllerinin maternal sirkülasyona artmış dökülmesi ile birlikte (7). Her iki fenomen de maternal sirkülasyonda artmış fetal DNA salınımına katkıda bulunabilir.

Birkaç çalışma preeklampsi ile komplike gebeliklerde maternal sirkülasyondaki artmış fetal DNA miktarına işaret etmiş ve bu patolojinin varlığında beş kata kadar artış olduğu konusunda hemfikir olunmuştur (8).

IUGR, preeklampside olduğu gibi sıklıkla bozulmuş plasentasyonun sonucudur ve maternal sirkülasyonda artmış fetal DNA ile ilişkili olabilir.

IUGR ile komplike gebeliklerde plazma fetal DNA konsantrasyonu ile ilgili çalışmalar sınırlı olup sonuçları çelişkilidir.

Biz bu çalışma ile izole ya da preeklampsi ile birlikte görülen IUGR'de maternal dolaşıma geçen hücre dışı serbest fetal DNA miktarını tayin ederek, bu değeri normal gebeliklerdeki miktar ile karşılaştırmayı ve fetal DNA değerlerinin Doppler akım değerlerinde değışiklik ile ilişkili olup olmadığını araştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TERMİNOLOJİ VE KLASİFİKASYON

Fetal büyüme kısıtlılığı gebeliklerin %5-10'unu etkiler ve erken doğumdan sonra perinatal ölümlerin ikinci önemli nedenini oluşturur (9). Erken ölü doğumların %53 'ü ile termdeki yenidoğanların %26'sında büyüme kısıtlılığı bulunmaktadır (10). Gelişimi normal olanlara kıyasla büyüme kısıtlılığı olan yenidoğanlarda perinatal ölüm oranı 6-10 kat daha fazladır.

Küçük fetüsleri/ yeni doğanları tanımlamak için kullanılan terminoloji kafa karıştırıcı olabilmektedir. Düşük doğum ağırlıklı terimi sıklıkla < 2500 g olan doğum ağırlığını tanımlamak için postnatal olarak pediatristler tarafından kullanılmaktadır. Antenatal dönemde gestasyonel yaşa göre küçük (SGA) ve intrauterin gelişme geriliği (IUGR) terimleri sıklıkla birbirinin yerine kullanılmaktadır. Bununla birlikte gestasyonel yaşa göre küçük (SGA) terimi birçok sebebe bağlı olarak küçük olan ve değişik prognozlar gösteren bir grup fetüsü kapsamaktadır. Bu etiyolojiler arasında enfeksiyonlar, konjenital malformasyonlar, anöploidi, çoğul gebelikler, maternal hastalıklar, malnütrisyon ve normal veya konstitüsyonel olarak küçük fetüsler yer almaktadır. İntrauterin gelişme geriliği (IUGR) terimi ise SGA'nın bir alt grubunu ve daha spesifik şekilde patolojik olarak küçük fetüsleri tanımlamaktadır. Gestasyonel yaşa göre ağırlığı 10. persentilin altında olan fetüslerin yaklaşık %70'i konstitüsyonel faktörler nedeniyle (female seks, ailenin etnik kökeni) küçük olup artmış perinatal mortalite ve morbidite riski taşımazlar. IUGR'li fetüslerin büyük çoğunluğunu plasental yetmezlik olanlar oluşturmaktadır.

Literatürde fetal büyüme kısıtlılığının tanımı çeşitlidir. Esasen fetüsün büyüme potansiyeline etki eden ve intrauterin gelişimini kısıtlayan bir durumdur; genetik olarak belirlenmiş büyüme potansiyelini yakalayamamış fetüsler için kullanılır. Bu bağlamda IUGR' si olmayıp gestasyonel yaşa göre

küçük (SGA) olan (konstitüsyonel küçük) ya da IUGR' si olup SGA olmayan (ağırlığı gestasyonel yaşa uygun ancak intrauterin hasar nedeniyle büyüme hızı yavaşlamış ve artmış perinatal riski olan) fetüslerle karşılaşılabılır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSO) fetal gelişme geriliğini 3. persentilin altı olarak tanımlarken, American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG) göre gestasyonel yaşa göre 10. persentilin altı olarak tanımlanır ve sıklıkla plasental yetmezlik ile ilişkilidir. Bazı durumlarda SGA, fetal ağırlığın 5. hatta 3. persentilin altında olması durumu olarak tanımlanmaktadır. Persentil cut-off ne kadar düşük tutulursa gelişme geriliğini yakalama oranı o kadar artar. Büyümede gerileme ve gerileme hızı önemli noktalardır. Bu noktada büyüme eğrileri, standartlar veya basit persentil cut-off lar gelişme geriliği tanısı koymak için yetersiz olabilir. Fetal büyüme kısıtlılığı, intrauterin fetal kayıp, intrapartum morbidite ve operatif doğum insidansının yüksekliği nedeniyle artmış perinatal mortalite ve morbidite ile ilişkilidir. 34. haftadan önce görülen preterm fetal büyüme kısıtlılığında iyatrojenik prematürite önemli bir sorundur. Fetal büyüme kısıtlılığında etkilenen yenidoğanlar, respiratuar distres, polistemi, hipoglisemi, intraventriküler kanama ve hipotermi riski altındadırlar (9,10). Uzun dönemde serebral palsi, gelişme geriliği ve davranışsal bozukluklar ortaya çıkabilir. Artan kanıtlar fetal büyüme kısıtlılığı ile erişkin metabolik sendrom arasında ilişki kurulmasına sebep olmaktadır (11,12). Barker ve arkadaşları, 1924-1944 tarihleri arasında Helsinki Ünivesitesi Hastahanesi'nde doğan 13.517 kadın ve erkek üzerinde yaptıkları bir kesitsel çalışmada, düşük doğum ağırlığının çocukluk çağında hızlı kilo alımı ile seyrettiğini ve koroner arter hastalığı, tip 2 diabet ve hipertansiyon için artmış riskten sorumlu olduğunu tesbit etmişlerdir (11,12).

Fetüsün gestasyonel yaşa göre küçük (SGA) ve dolayısıyla beklenenden küçük olması iyi bilinen bir durumdur. Buradaki tanısız zorluk SGA fetüsleri büyüme kısıtlılığı olanlardan ayırmaktır çünkü SGA fetüslerin çoğu büyüme kısıtlılığı olanlara kıyasla daha iyi prognozla ilişkilidir (13). Maternal ve fetal dolaşımın Doppler ile değerlendirilmesindeki gelişmeler,

fetal kalp hızı analizleri ve biyofizik profil hem SGA hem de IUGR tanısını iyileştirmiştir.

Normal fetal büyüme, fetüsün önceden genetik olarak belirlenmiş büyüme potansiyeli ile bunun fetüsün sağlığı, plasenta ve anne ile olan ilişkilerini yansıtır.

Fetal büyüme süreci 3 ardışık ve örtüşen fazdan oluşur. Birinci faz gebeliğin ilk 16 haftasını kapsar ve selüler hiperplazi fazıdır. İkinci faz 16-32. gebelik haftaları arasındaki hiperplazi ile eş zamanlı hipertrofi fazıdır. 3.faz, selüler hipertrofi fazı, 32. haftadan terme kadar olan dönemde hücre büyüklüğünde hızlı artış ile karakterizedir.

Campbell ve Thom HC/ AC oranını kullanarak fetüsleri simetrik yada asimetrik küçük olarak sınıflamaktadırlar. Buna göre fetal gelişme geriliğini 3 sınıfa ayırmaktadırlar.

Tip 1: Simetrik (orantılı) büyüme geriliğidir. İntrinsik fetal büyüme potansiyelinde azalma olarak tanımlanır. HC, FAC, FL orantılı olarak küçüktür. Fetüsler etiyolojik faktör tarafından selüler hiperplazi fazında erken etkilenmiştir. 2 alt grubu mevcuttur. **Normal küçük fetüslerde** büyüme geriliği 30-32. haftadan önce başlar. HC doğum ağırlığı ile uyumlu ancak gestasyonel yaş ile uyumsuzdur. Bu yenidoğanlar tamamen normal olup konstitüsyonel küçük olarak bilinir. Genellikle gelişmelerinde 2-3 hafta gerilik mevcuttur ancak bu tip gelişme geriliği herhangi bir komplikasyon ile ilişkili değildir. **Konjenital anomalisi olan fetüsler**, kromozomal veya genetik bozukluk ile birlikte embriyonal ya da fetal dönemde erken ve ciddi büyüme geriliği mevcuttur. En kötü prognoza sahip grubu oluştur.

Tip 2: Geç başlangıçlı (30-32.haftadan sonra) ve genellikle asimetrik büyüme geriliğidir. Kafa çevresi ve uzunluğu gestasyonel yaşa uygun iken fetal abdomen çevresi ölçümü küçüktür. Primer etiyolojik faktör plasental yetmezliktir.

Tip 3: Önceki mekanizmaların (tip 1 ve tip 2) birlikteliğidir. Değişiklik 2. trimester sırasında hiperplazi ve hipertrofi fazında meydana gelir. Gebeliğin erken döneminde meydana gelir dolayısıyla fetüste semiharmonik büyüme ve hipotrofi ile karşılaşılır. Etiyoloji ve patogenez embriyonik enfeksiyon ve toksik ajanlarla ilişkilidir.

Fetusta büyüme şekli, gelişme geriliğinin altta yatan nedenine ve olumsuz etkinin süresine bağlıdır. Uteroplasental yetmezlik, genellikle asimetric büyüme kısıtlılığı ile birliktedir. Anöploidi, anöploidi olmayan sendromlar ve viral enfeksiyonlar, büyüme işlevini bozar veya hücrede hiperplazi aşamasında büyümeye etki eder. Bu sorun genellikle simetric büyüme kısıtlılığı ile sonuçlanır. Plasenta hastalığı başlangıçta beyinde göreceli korunma ile birlikte olabilir. Fakat sonuçta, plasental yetmezliğin ağırlaşması ile simetric büyüme kısıtlılığına ilerleyebilir.

IUGR'li fetüslerin takibindeki zorluk, tanı konulması ve sonrasında olumsuz sekelleri en aza indirecek fakat prematür doğumun riskleri ile dengelenecek şekilde yönetebilmektedir. Ultrasonografi ve Doppler akım çalışmaları IUGR tanı ve yönetiminde merkezi rol oynamaktadır.

2.2. İNTRAUTERİN BÜYÜME KISITLILIĞI NEDENLERİ

Fetusta büyüme kısıtlılığı ile sonuçlanan durumlar geniş olarak anne, uterus ve plasentaya ait nedenler ile fetal hastalıkları içermektedir. Bu durumlar; plasentaya besin ve oksijen gönderilmesi (anneye ilişkin nedenler), besin ve oksijenin plasentadan geçişi (plasentaya ait nedenler) ve fetüsün besini alması veya büyüme sürecinin düzenlenmesini (fetüse ait nedenler) etkileyerek büyüme kısıtlılığına yol açabilir.

Fetal büyüme kısıtlılığının anneye ilişkin nedenleri: gebeliğin yüksek kan basıncı ile seyreden hastalıkları, şeker hastalığına bağlı damar hastalıkları, kronik böbrek hastalığı ve trombofili gibi damar hastalıklarını

içerir. Ek olarak yüksek rakımda yaşayanlarda veya siyanotik kalp hastalığı, parankimal akciğer hastalığı olanlarda veya belirli hemoglobinopati ve anemilerde gözleendiği gibi oksijen taşıma yeteneğinde azalma olan kadınlarda, anne oksijenlenmesinde azalma IUGR gelişiminden sorumlu olabilir. Annenin yetersiz kilo alımı, sigara kullanımı, annenin alkol ve kokain kullanımı, ileri anne yaşı IUGR ile ilişkilidir.

Fetoplasental nedenler, fetüs veya plasenta veya her ikisinden kaynaklanan sorunlar nedeniyle, fetal büyüme kısıtlılığı ile sonuçlanabilir. Kromozom bozuklukları, doğumsal sakatlıklar ve genetik sendromlar, IUGR olgularının %10'undan azında bulunur (13). Benzer şekilde uterus içi enfeksiyonlar tüm olguların %10'undan azından sorumludur. İkiz ve üstü çoğul gebelikler IUGR açısından yüksek risk taşıyan bir fetüs grubunu oluşturmaktadır.

Büyüme kısıtlılığı, trizomi 13 olgularının %53'ünde, trizomi 18 olgularının %64'ünde gözlenmekte olup ilk üç ay kadar erken dönemde ortaya çıkabilir (14). Büyüme kısıtlılığı ile birlikte olabilen diğer durumlar iskelet displazileri ve Cornelia De Lange sendromunu içermektedir. Bununla birlikte fetusta büyüme kısıtlılığı ile birlikte olabilen yüzden fazla genetik sendrom sıralanmaktadır. Enfeksiyona ait etmenlerden herpes, sitomegalovirus, rubella ve toksoplazma IUGR'nin iyi bilinen nedenlerindendir.

Anormal plasenta gelişimi ile sonrasındaki plasental yetmezlik sık görülen sorun olup IUGR olgularının yaklaşık üçte birini veya tüm gebeliklerin %3'ünü etkilemektedir. Plasental yetmezlik tekil gebeliklerdeki IUGR 'nin büyük çoğunluğundan sorumludur (15). Plasenta kitlesinde kesin ve göreceli bir azalma, fetüse geçen madde miktarını etkiler ve IUGR gelişimi ile sonuçlanır. Bu nedenle anormal plasental damar gelişimi, plasenta sirkumvallata, kısmi ablasyo plasenta, plasenta akreata, plasental infarkt veya hemanjiom varlığı, büyüme kısıtlılığı ile sonuçlanabilir. Tek umbilikal arter veya mozaizm gibi plasentanın intrinsik patolojileri, bazı büyüme

kısıtlılığı olgularında saptanmıştır. Plasenta previa'da plasentanın aşağı uterus kısmına yerleşmesinin, besin alışverişi için uygun olmadığı düşünülmekte ve kronik kanama olmasa bile IUGR ile sonuçlanabilmektedir.

Tablo 2.1. IUGR nedenleri

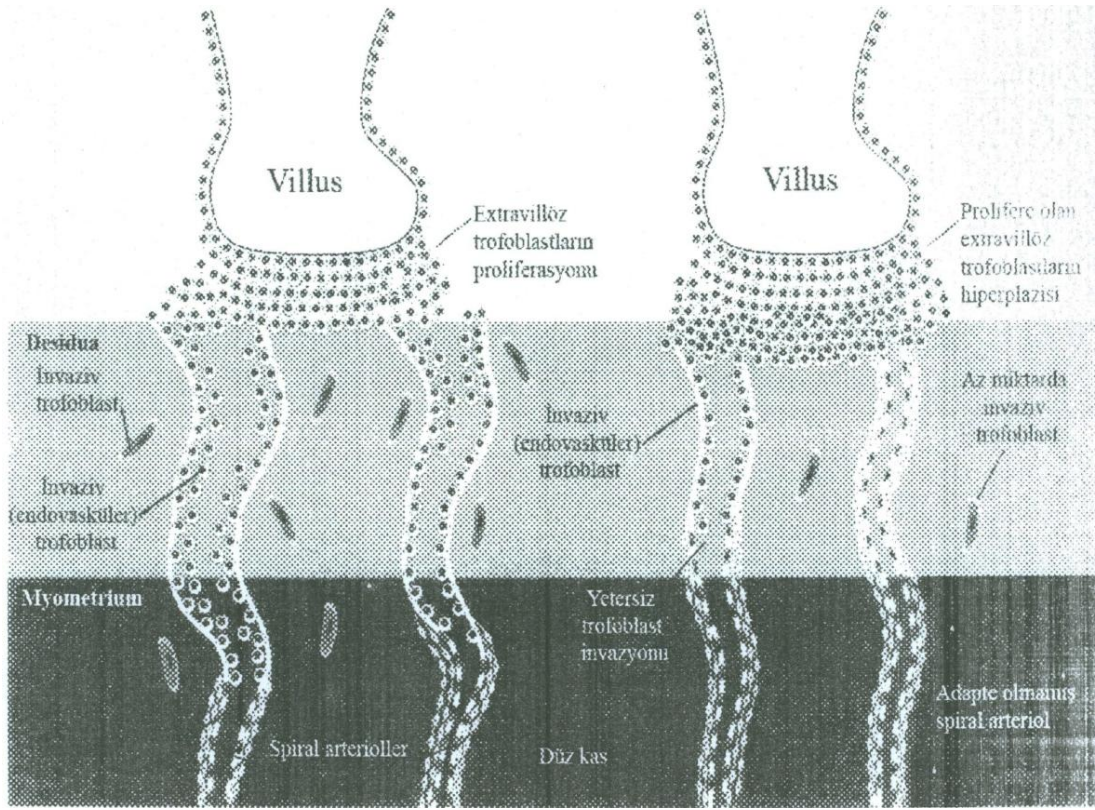
Fetal Anoploidi (trizomi 13, 18, 21, triplodi, uniparental disomi) %5-20 Fetal malformasyonlar (gastroşizis, omfalosel) Çoğul gebelikler Enfeksiyon (toksoplazmozis, rubella, sitomegalovirus, herpes) %5-10
Maternal Hipertansiyon Diabet Renal hastalıklar Vasküler hastalıklar İnflamatuvar barsak hastalığı Hipoksi (pulmoner ve kardiyak hastalıklar) Trombofili (Faktör 5 Leiden heterozigot, protrombin G20210A heterozigot, MTHFR heterozigot) Maternal uterin malformasyonlar (myomlar, bikornuat veya septat uterus) Yüksek rakımda yaşama
Plasental Plasenta previa Plasental tümörler Mosaisizm Yetersiz plasentasyon- plasental yetmezlik %25-30
Çevresel faktörler Düşük sosyoekonomik durum Malnütrisyon Sigara kullanımı Alkol Madde kullanımı (kokain, eroin, methadon)

Jacqueline E.A.K Bamfo ve Anthony O. Odibo Journal of Pregnancy 2011

2.3. FETÜS BÜYÜMESİNİN DÜZENLENMESİ

Fetüs büyümesi farklı düzeylerde düzenlenir ve fetüse ve anneye ait kısımlar arası plasental ara yüzün başarılı bir şekilde gelişimini gerektirir. İlk üç ayın erken döneminde sitotrofoblastlardan köken alan villuslar desiduayı plasentaya bağlayarak plasentanın tutunmasını sağlar. Bu anne dolaşımı ile villuslar arası boşluklar arasında damarsal bağlantıların oluşmasına izin verir ve giderek artan miktarda plasenta salgıları anne dolaşımına geçer. Plasenta kütlelerinin gelişimi, plasentanın salgılama işlevi açısından çok önemli olup damarsal gelişim oksijen ve besin maddelerinin geçişine basit difüzyon kapasitesinden daha fazla izin verir.

Villöz trofoblastlar anne ile fetüs arasında esas geçiş yeri haline gelir. Üç temel besin maddesi (glikoz, amino asitler ve serbest yağ asitleri) için aktif taşıma işleyişinin olgunlaşması ve villus yüzeyinde artış, plasentadan aktif geçişin etkinliğini ve hacmini artırır. Plasentanın anne ve fetüs tarafında dolaşımdaki kan hacmi de artış gösterir. Villüslerin dışındaki sitotrofoblastların anneye ait spiral arterlere yayılım göstermesi arterin müsküloelastik yapısının giderek kaybolması ile sonuçlanır ve bu süreç fetüs tarafında devam eden villüs dallanması ile eş zamanlı gerçekleşir. Bu durum uterin ve umbilikal damarlarda kan akım direncinde önemli azalma ile sonuçlanarak her iki dolaşımı düşük dirençli, yüksek hacimli damar yatağına dönüştürür.



Şekil 2.1. Plasentasyon aşamasındaki trofoblast invazyonu

Sol tarafta izlenen normal trofoblast invazyonuna karşılık, sağ tarafta izlenen inkomplet trofoblast invazyonu. Anormal plasentasyon ile karakterize gebelik komplikasyonlarında immatür trofoblast sayısında artış, invaziv trofoblast penetrasyonunda bir bozukluk sonucunda trofoblastların düz kas tabakasına kadar penetrasyonunda aksama görülmektedir. (Rogers BB ve ark., 1999)

2.4. DOPPLER ULTRASONOGRAFİ

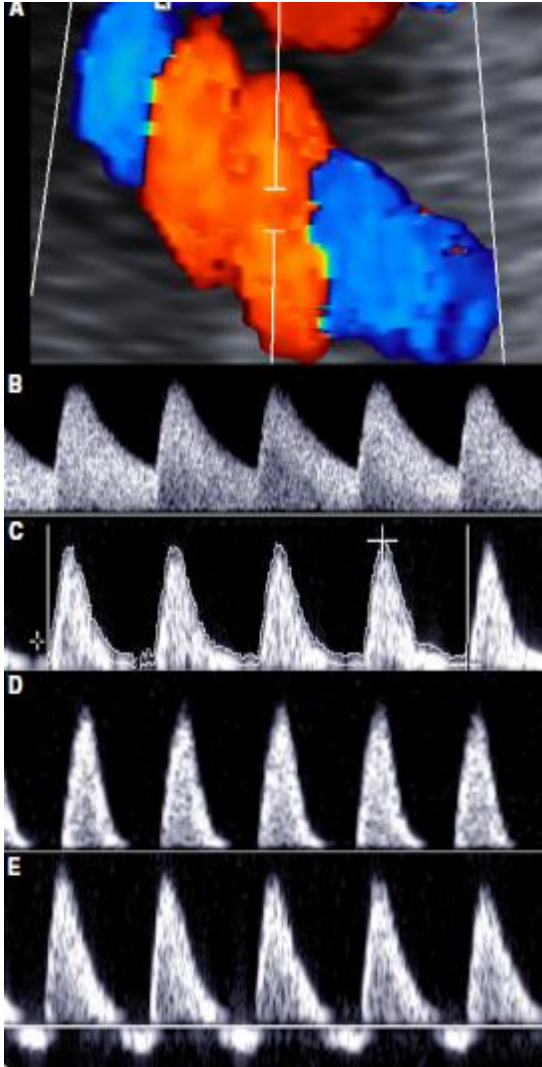
Doppler ultrasonografi, fetal ve maternal fizyoloji ve patofizyolojiyi değerlendirmek için kullanılabilen, hızlı, güvenilir ve girişimsel olmayan bir inceleme yöntemidir. Birçok klinik durumda fetal dolaşımın non-invaziv olarak değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Doppler akım hızı ölçümü takipte olduğu kadar tanıda da yardımcı olduğundan büyüme kısıtlılığı olan fetüsün yönetiminde yeri çok önemlidir. Doppler akım hızı dalga formları fetüste arteriyel ve venöz damar yatağından elde edilebilir. Arteriyel Doppler dalga formları, damar yatağındaki yapısal veya damar gerginliğindeki düzenleyici değişiklikler nedeniyle farklılık gösterebilen, akış yönündeki damar direnci

konusunda bilgi verir. Sistol/Diastol oranı, rezistans indeksi ve pulsatilite indeksi arteriyal akım direncini değerlendirmek için en yaygın kullanılan göstergelerdir. Kan akım direncinde artış her üç Doppler göstergesinde de artış ile sonuçlanan diastol sonu akımda göreceli azalma ile kendini gösterir. Kan akım direnci çok arttığında diastol sonu akım kaybolabilir veya tersine dönebilir.

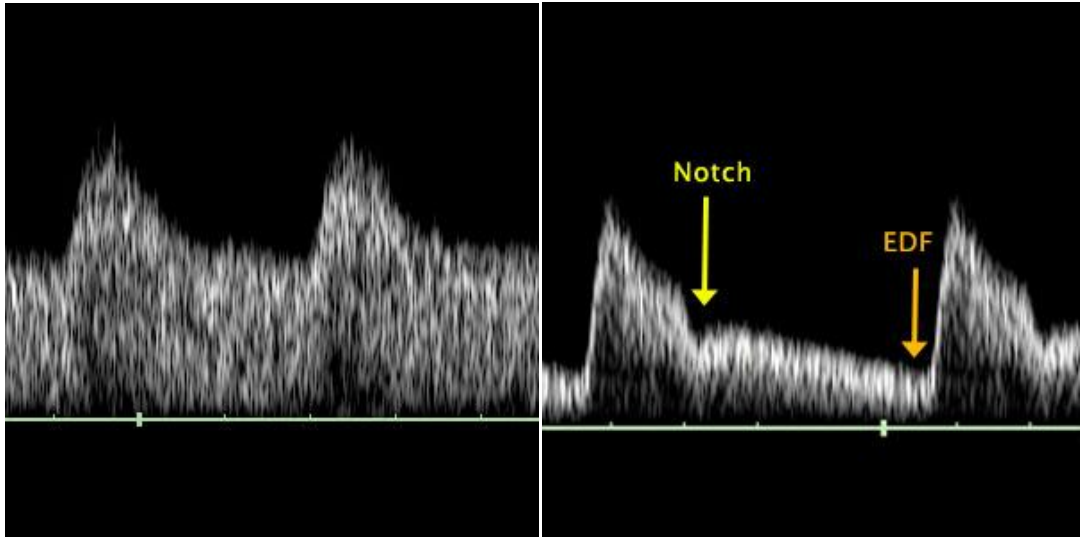
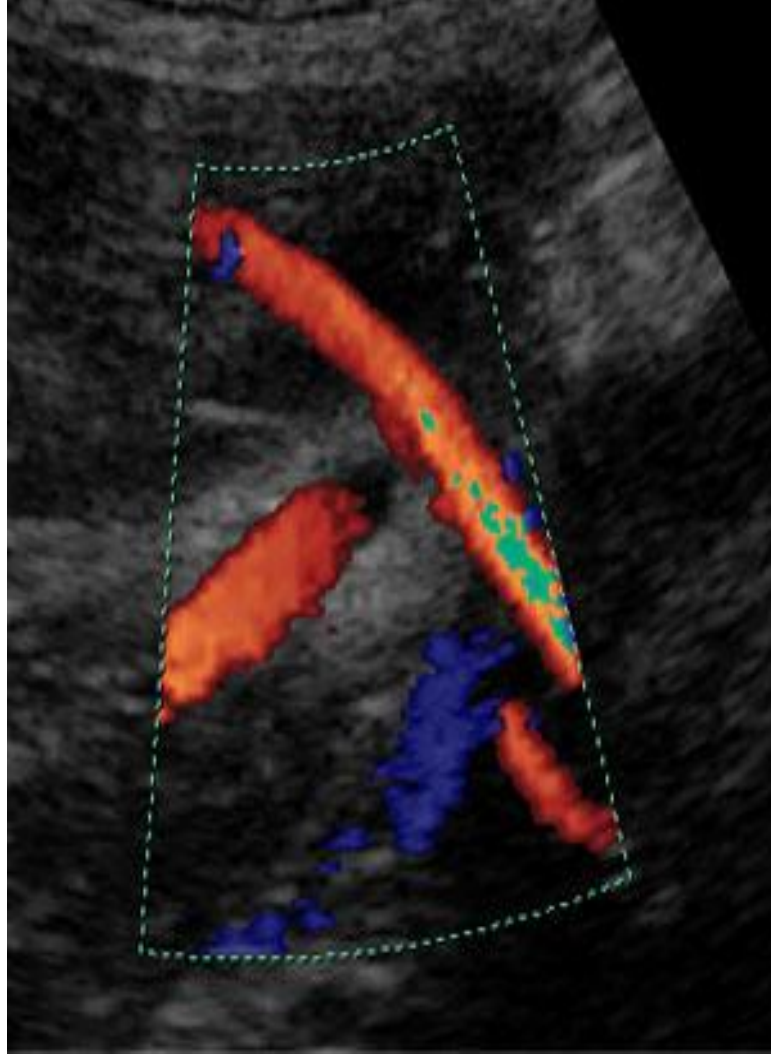
Venöz Doppler değişiklikleri kalbin ileri doğru işlevinin değerlendirilmesini sağladığından, fetal kardiyovasküler durumun incelenmesini tamamlar. Venöz sistemde ileri doğru kan akışı kalbin uyumu (kompliyans), kasılabilirliği ve ön yükü ile belirlenir ve kalp döngüsü boyunca atriyumlardaki basınç değişikliğini yansıtan üç fazlı akım görünümü ile ayırt edilir (16). IVC ve DV, kardiyovasküler sistemdeki prelaod profilini temsil eder. DV dalga formunda ilk pik (S- dalgası) sağ atrial dolumu gösterirken ikinci pik (D- dalgası) erken diastoldeki pasif ventriküler dolumu göstermektedir. a dalgası atrial kontraksiyonu temsil eden bir düşmedir, bu noktada kalbe doğru olan ileri akım normalde en yavaş haldedir. DV anormallikleri a-dalgası hızında düşme ile karakterizedir ve fetüsün durumunda bozulma devam ederse a dalgası görülmeyebilir veya ters yönde olabilir. Bu damardaki anormal akım ile fetüsün asit-baz dengesi arasında güçlü korelasyon vardır. DV da akım yokken veya ters yönde iken perinatal mortalite %63-100 dür. Venöz doppler anormallikleri geç dolaşım bulgularıdır, fetal iyilik halinin monitörizasyonunda kullanılır; tek başına umbilikal arter dopplerine kıyasla ölü doğum ve asidemi prediksyonunu belirgin artırır.

Umbilikal arter için ölçülen Doppler göstergesinin gebelik yaşı ortalamasının 2 SD üzerinde olması ve /veya diastol sonu akımının kaybolması, anormal test sonucu olarak tanımlanır. Büyüme eğrilerine benzeyen, kıyaslanabilir normogramların kullanılması en iyisidir. Orta sebral arter göstergelerinin ortalamadan 2 SD düşük olması normal değildir (17). Uterin arter dalga formları diastol boyunca devam eden yüksek diastol sonu akım hızı ile karakterizedir. Gestasyonel yaş ilerledikçe diastol sonu akım tipik olarak azalır; halbuki spiral arterlerin normal endovasküler

trofoblast invazyonundaki başarısızlık uterin arter vasküler rezistansında artış ve plasental perfüzyonda azalma ile sonuçlanır. Preeklampsi ve/veya IUGR sıklıkla takiben gelişir. 26. haftadan sonra normal gebeliklerde S/D oranı 2.7'den az olmalıdır. Eğer diastol sonu akım gebelik boyunca artmaz veya sistol sonunda çentik tespit edilirse, fetüs IUGR gelişimi için yüksek risklidir. Diastolik akım yokluğu hatta ters akım ciddi plasental disfonksiyonu gösterir ve bu bulgular fetal ölüm veya anormal fetal nörolojik sonuçları önceden işaret edebilir. Ufak fetusta bu bulgular kötü sonuç açısından yüksek risk taşıyan fetusları belirlemektedir.



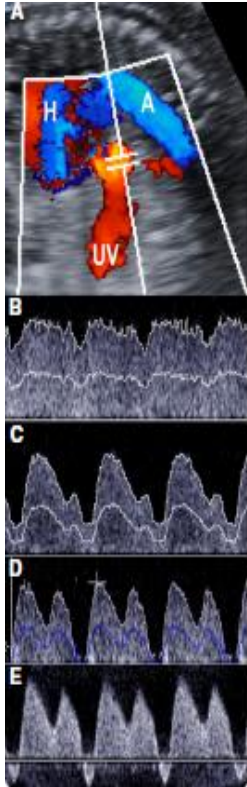
Şekil 2.2. Umbilikal arter için normal ve patolojik akım trasesi



Şekil 2.3. Uterin arter için normal ve patolojik akım trasesi



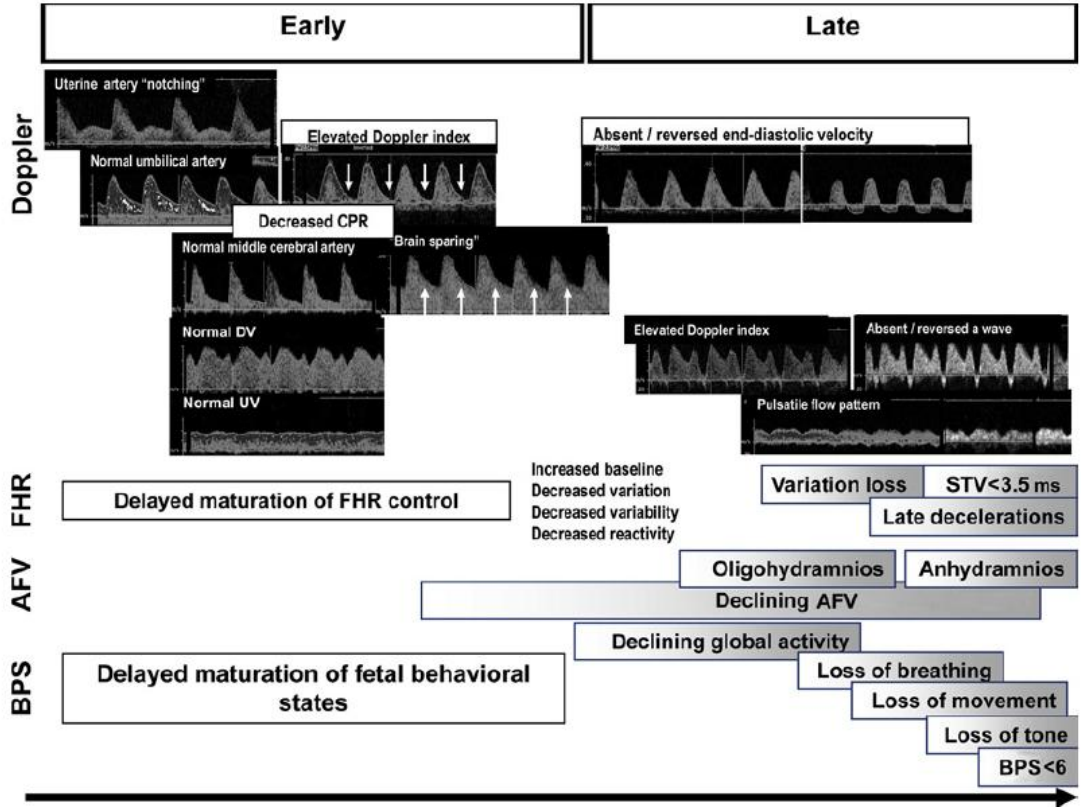
Şekil 2.4. Orta serebral arter akım trasesi



Şekil 2.5. Ductus venozus için normal ve patolojik akım trasesi

Ufak fetusun tanı amaçlı değerlendirilmesi sırasında umbilikal ve orta serebral arterin Doppler incelemeleri, altta yatan neden olarak plasenta işlev bozukluğunun araştırılmasında önemlidir. Randomize çalışmalar ve metaanalizler, fetal biyometre ile umbilikal arter Dopplerinin birlikte kullanımının perinatal ölüm ve girişim sıklığını anlamlı olarak azalttığını doğrulamaktadır. Çünkü plasental vasküler yetersizliğin belgelenmesi, takip ve olası girişim gereği olan büyüme kısıtlılığına sahip fetusları yapısal olarak ufak fetustan etkin biçimde ayırmaktadır (18).

Plasentanın yaklaşık %30'unu etkileyen damar hasarı Doppler indekslerinde yükselmeye neden olmaktadır. Daha ileri bozukluklar umbilikal arterde diastol sunu akım kaybı veya ters akım ile sonuçlanır. Eğer plasentadan gaz geçişi fetal hipoksemiye yol açacak düzeyde azalır, orta serebral arter Doppler direncinde azalma olabilir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan diğer Doppler indeksi, plasental damarlarda daralmayı gösteren umbilikal arter pulsatilitesi ile fetal beyin damarlarında genişleme olduğunu gösteren orta beyin arter pulsatilitesi arasındaki orandır (serebroplasental Doppler oranı (CPR)). Grammellini ve ark. 1.08'in altındaki değerlerin olumsuz sonuç olasılığı olan fetusları belirlediğini göstermiştir (19).



Şekil 2.6. Doppler değişikliklerinin zamansal sıralaması (A.A. Baschat, 2000)

2.5. MATERNAL PLAZMADA HÜCRE DIŞI SERBEST FETAL DNA

Plasentanın gebe kadın ve fetüs arasında geçiren olmayan bir bariyer oluşturduğu şeklindeki geleneksel öğretinin aksine, birçok çalışmada hem intakt fetal hücrelerin, hem de hücre dışı serbest nükleik asitlerin maternal dolaşımında serbestçe dolaştığı gösterilmiştir. Maternal dolaşımında fetal hücrelerin varlığı ilk kez 1893 de Georg Schmorl tarafından eklampsi komplikasyonları nedeniyle hayatını kaybeden kadınların akciğer dokusunda plasental orjinli, çok çekirdekli dev sinsityal hücrelerin varlığının gösterilmesi ile ortaya konmuştur. Her ne kadar maternal dolaşımında fetal hücrelerin varlığı bir asır önceden bildirilmişse de bu fenomenin klinik uygulamada yer bulması çok yakın tarihtedir. Non-invaziv prenatal tanı alanı, 1997 de Lo ve arkadaşlarının maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA (cffDNA) varlığını gözlemlenmeleri ile hızla gelişmiştir (20). Takiben Poon ve

arkadaşları 2000 yılında fetal messenger RNA nın (fmRNA) maternal plazmada sirküle olduğunu göstermişlerdir (21).

Prenatal tanı için kullanılan amniyosentez ve koryon villus örnekleme gibi invaziv teknikler, hem pahalı hem de anne ve fetüs için risk ile ilişkili olması nedeniyle non-invaziv yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Yaklaşımlardan birisi maternal dolaşımdan intakt fetal hücrelerin izolasyonu olup yöntemin uygulanabilmesindeki majör kısıtlılık; maternal dolaşımdaki fetal hücrelerin sayısının düşük olmasıdır (maternal kanın her ml'si için yaklaşık bir fetal hücre) (22).

Kanser hastalarının plazma ve serumlarında dolaşan büyük miktarlarda hücre dışı tümör DNA sının keşfini takiben yeni bir araştırma alanı gelişmiştir (23,24). Hızla büyüyen fetüs ve plasentanın tümör benzeri özelliklerinden yola çıkarak Lo ve ark. öncelikle maternal plazma ve serumda male fetal DNA varlığını göstermişler, aynı grubun takip eden çalışmalarında maternal plazma DNA sında yüksek konsantrasyonda fetal DNA varlığı gösterilmiştir (1,20). Hücre dışı serbest fetal DNA maternal sirkülasyonda en erken gestasyonun 32. gününde tespit edilmiştir ve ilk trimesterde gebelik haftası başına %21 artmaktadır (25). Hesaplamalar maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA konsantrasyonunun eken gebelikte total plazma DNA sının %3.4 ünü ve geç gebelikte %6.2 sini oluşturduğunu göstermektedir. Fetal DNA'nın mutlak konsantrasyonu maternal plazma ve serumda benzerdir. Esas farklılık serumda plazmaya kıyasla daha büyük miktarda bulunan arka plan maternal DNA dır (pıhtıdan salınan). Veriler göstermektedir ki gebelik yaşı ilerledikçe, özellikle gebeliğin son 8 haftasında fetal DNA konsantrasyonu belirgin artmaktadır.

Dolaşan fetal DNA döngüsünün incelendiği çalışmalarda fetal DNA nın doğumu takiben ortadan kalktığı, hatta doğumu takip eden 2. saatte hastaların çoğunda (sekiz hastanın yedisinde) tespit edilemeyecek düzeylerde olduğu izlenmiştir (25). Buradan yola çıkarak fetal DNA nın yarı ömrünün 16.3 dakika olduğu tahmin edilmektedir. Dolaşan fetal DNA

atılımında doğumla birlikte ani değişiklikler olmadığı düşünöldüğünde, kararlı durumun sağlanması için maternal dolaşıma devamlı, büyük miktarlarda fetal DNA salınımının olması gerektiği düşünölmektedir. Bu hızlı dönüőüm nedeniyle fetal DNA ölçümü, fetal DNA üretimi ve atılımı ile ilgili hemem hemen eş zamanlı bir görüntü sağlamakta ve dolayısıyla hızlı dinamikleri olan fetomaternal olayların monitörizasyonu için kullanışlı olmaktadır.

Real-time PCR ile küçük parçaların amplifikasyonundan daha verimli sonuçlar elde edilmesinden yola çıkarak dolaşan fetal DNA fragmanlarının küçük (<450 bp) olduğunu destekler direkt olmayan veriler mevcuttur. Fetal DNA anında metabolize edilmemesi ve plazma veya serumdan hızlıca amplifiye edilmesi nedeniyle dolaşan fetal DNA nın apoptotik yapılar içinde korunduğu veya nüklezomlara bağlı olduğu düşünölmektedir.

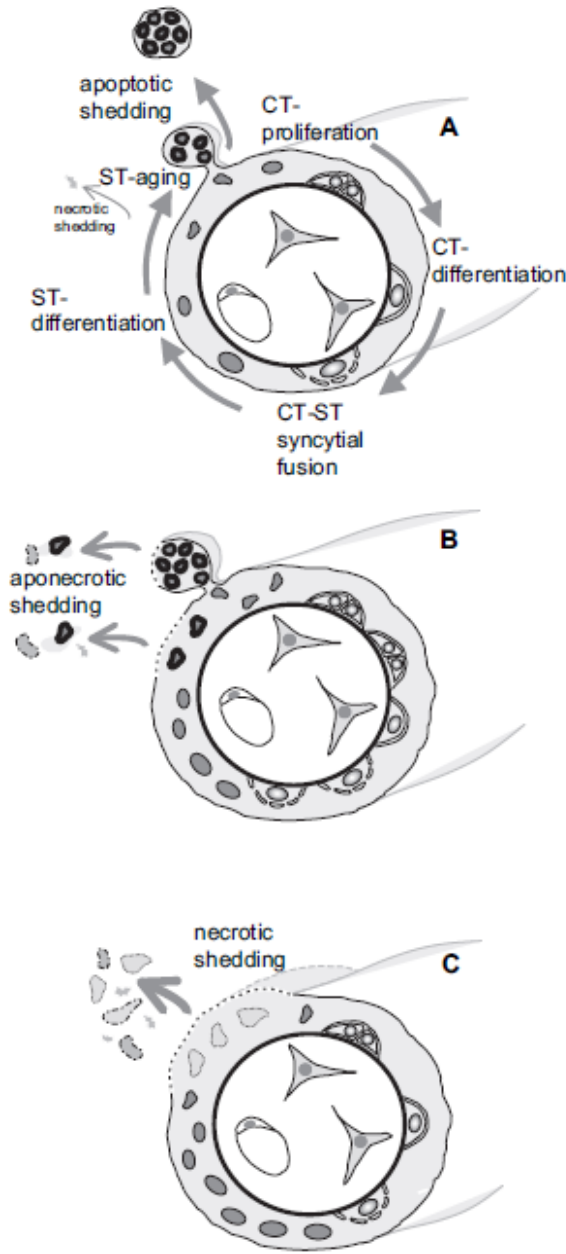
Hücre dışı serbest fetal DNA'nın tam olarak nereden köken aldığı, maternal seruma hangi kaynaktan karıştığı bugün için net olarak bilinmemektedir. Hücre dışı fetal DNA'nın maternal plazmada elde edildiği ilk zamanlarda maternal dolaşıma karışan hücrelerin maternal immün sistemle veya başka yollarla otolizi sonucu fetal DNA'nın açığa çıktığı düşünölmekteydi. Son yıllarda ise plasental trofoblastların apoptozis veya aponekrozis gibi süreçler sonrasında maternal dolaşıma karışan hücre dışı serbest fetal DNA kaynağı olabileceği görüşü hakim olmaya başlamıştır.

Nükleik asitlerin maternal kanda veziküller içinde veya hücre dışında bulunuyor olması DNA ve RNA nın değişik yollardan ölen hücrelerden serbestlendiğini işaret etmektedir (26,27).

Sinsityotrofoblastlardan trofoblastik materyalin klasik olarak salınımı sinsityal hücre kümelerinden membran ile kaplı bu DNA ve RNA paketlerinin apoptotik salınması ile gerçekleşmektedir (28). Buna ek olarak son yıllarda bazı diğer teoriler de gündeme gelmeye başlamıştır. Tesadüfen meydana gelen kırıklar veya nekrozis, fetal nükleik asidin serbest şekilde salınımına neden oluyor olabilir. Aponekrozis olarak adlandırılan ve

trofoblastik materyalin serbest salınımını açıklayan bir görüş daha mevcuttur. Bu mekanizma hücrenin nekrotik disintegrasyonunu takip eden apoptotik sürecin inkomplet kalması ile açıklanmaktadır (28). Sinsityotrofoblastlardaki normal yaşlanma süreci ve bu apoptoz sürecinin son evresi uygun şekilde fonksiyon göremez ise geç apoptotik nükleusun paketlenmesi değişebilecek ve bu durumda normal apoptotik salınım tamamlanamayacak, daha çok nekroza benzer bir mekanizma ile sonuçlanacaktır. Aponekrozis olarak adlandırılan bu durum hipoksik koşullardaki villöz hücre kültürlerinde sinsityotrofoblast sitoplazması içindeki apoptotik DNA yığınlarında gösterilmiştir.

Apoptozis ve aponekrozis yolu ile sinsityotrofoblastlardan salınan hücre dışı serbest veya membranlar ile çevrelenmiş mikropartiküller şeklindeki DNA materyali maternal dolaşıma kaçmaktadır. Bununla birlikte bu partiküllerin kaynağını araştıran invitro çalışmalara ek olarak invivo çalışmalara da gereksinim bulunmaktadır.



Şekil 2.7. Sinsityotrofoblastlardan DNA materyalinin dökülme modelleri

(A) Apoptotik dökülme. Villöz trofoblastların normal döngüsü; sitotrofoblastların (ST) proliferasyon, diferansiyasyonu ve diferansiye olmuş sitotrofoblastların sinsityotrofoblastlara (SNT) dönüşümünü kapsamaktadır. SNT da kendi içlerinde diferansiye olup yaşlandıktan sonra apoptotik materyal paketlenerek maternal dolaşıma karışmaktadır. (B) Nekrotik dökülme. Eğer tesadüfen meydana gelen kırıklar veya apoptozun yer almadığı bir süreçte bağlı sinsityotrofoblastlar, nekrotik materyalin salınımına ve dolayısıyla da maternal inflamatuvar yanıtı neden olarak nekroza giderler. (C) Aponekrotik dökülme. Eğer apoptotik süreç sonuna kadar tamamlanamaz ise apoptotik materyalin nekrotik salınımı gerçekleşir. Bu aponekrotik materyal annede inflamatuvar yanıtı oluşturabilme kapasitesindedirler (Hahn ve ark., 2005)

Fetal DNA öncelikle fetal cinsiyet tayini ile fetal rhesus D (RhD) kan grubu tayini için kullanılmıştır. Y- kromozomuna spesifik dizilerin tayini male fetüs varlığını ortaya koyarken, yokluğunda ise fetüsün female olduğu varsayılmaktadır. Takip eden çalışmalarda Tang ve arkadaşları maternal plazmada X kromozomunda bulunan ve paternal kalıtılan kısa tekrar serilerinin (STR) tespiti ile female cinsiyeti tayin etmişlerdir. SRY, DYS14 ve DAZ gibi Y-kromozomu spesifik loküsler sıklıkla fetal cinsiyet tayininde kullanılmaktadır. 2001 de Sekizewa arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 7-16. gebelik haftasındaki 302 gebe kadının kan örneklerinden Y- kromozomu spesifik DYS14 loküsünün rtPCR ile amplifikasyonu ile male fetal cinsiyeti %97.2 sensitivite, %100 spesifite, %100 PPV ve %97.5 NPV ile belirlemişlerdir. Bu non-invaziv teknikle fetal cinsiyetin tayini, X'e bağlı kalıtılan genetik bozuklukların tanısı için gerekli invaziv işlem sayısını azaltabilir. Maternal plazma kullanılarak fetal cinsiyetin non –invaziv tayini konjenital adrenal hiperplazi, Duchenne müsküler distrofi gibi X'e bağlı resesif kalıtılan hastalıklar ve hemofili için risk altında olan gebeliklerde kullanılmış ve metodun kullanılabilirliği ve güvenilirliği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (29,30).

Maternal plazmada fetal DNA, Rh(-) kadınların gebeliklerinde fetal RhD durumunun belirlenmesi için de kullanılmıştır. Bu uygulama ile anti-D immüno globulin profilaksisinin sadece Rh (+) fetüs taşıyan kadınlara uygulanması ve dolayısıyla gereksiz anti-D immüno globulin uygulamasının önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Lo ve arkadaşları 57 Rh (-) gebe kadının 45'inde ikinci trimester ve sonrasında alınan plazma örneklerinden fetal RhD kan grubunu doğru olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar non-invaziv fetal RhD genotiplendirmesinin maternal plazma kullanılarak ikinci trimesterden itibaren güvenle kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (31). Günümüzde rutin prenatal bakımın parçası olarak non-invaziv fetal RhD genotip tanısı Birleşik Krallık, Fransa ve Hollanda'da kullanılmaktadır.

Maternal plazmada fetal hücre dışı DNA ayrıca tek-gen bozukluklarının prenatal tanısı için de kullanılmıştır. 2000 yılında Sekizewa

ve arkadaşları 30. gebelik haftasında ultrasonografide ekstremitte kısalığı tespit ettikleri bir vakada akondroplazinin non-invaziv prenatal tanısını koymuşlardır; bu maternal plazma kullanılarak fetal tek-gen bozukluğunun bildirildiği ilk vakadır. Takiben Amicucci ve arkadaşları maternal plazmayı kullanarak myotonik distrofinin prenatal tanısını koymuşlardır. Dahası risk altındaki gebeliklerde maternal kanda fetal DNA analizi ile kistik fibrozis, beta-talasemi ve konjenital adrenal hiperplazinin prenatal dışlanması bildirilmiştir (32-34).

Fetal DNA konsantrasyonları gebeliğin çeşitli durumlarından etkilenmektedir. Preeklampsisi olan gebe kadınların plazmalarında artmış fetal DNA konsantrasyonu yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve dolaşan DNA seviyelerinin bu durumun tanısı ve/veya monitörizasyonunda bir belirteç olarak kullanılabilceği sonucuna ulaşılmıştır (3,35). Benzer şekilde Sekizawa ve arkadaşları preeklampsisi olan gebe kadınların plazmalarında artmış fetal DNA seviyeleri gözlemlerken, fetal gelişme geriliği olan ancak preeklampsisi olmayan popülasyonda fetal DNA seviyelerinde artış gözlemlenmemişlerdir (4). Bunun yanında Doppler ultrasonografide patolojik uterin arter akımları tespit edilen seçilmiş bir gebe popülasyonunda artmış fetal DNA seviyeleri bildirilmiştir (36).

Hiperemesis gravidarum patogenezinde anne ve fetus arasındaki immün etkileşimde anormallik olduğu fikrinden yola çıkarak, maternal immün sistemin hiperaktivasyonunun trofoblastlarda hasar ile ilişkili olması beklendiğinden hiperemesis gravidarum olgularında fetal DNA seviyelerinin araştırıldığı çalışmalarda hiperemesis gravidarum ciddiyeti ile fetal DNA seviyelerinin ilişkili olduğu tespit edilmiştir (37).

İnvaziv plasentası olan hastalarda, myometriyuma invazyon sırasında trofoblastların maternal immün sistem tarafından zarar göreceği fikrinden yola çıkarak maternal plazmada artmış fetal DNA konsantrasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve invaziv plasentası olan 2 hastada gestasyonel

yaşa göre eşleştirilmiş kontrollere kıyasla maternal kandaki fetal DNA seviyelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (38).

Fetal DNA'nın preterm eyleme giren hastalarda, termde doğum yapan hastalara kıyasla artmış olduğu gösterilmiş (39), bir başka çalışmada preterm doğum için yüksek riskli olan ve fetal DNA seviyeleri artmış olan hastalarda normal olan gruba kıyasla preterm doğum riskinin fazla olduğu gösterilmiştir (40).

Fetal kromozomal anormalliklerin tanınmasında maternal kanda serbest fetal DNA'nın kantitatif analizi ile ilgili veriler çelişkili olup Lo ve arkadaşları fetüsün trizomi 21 olduğu gebe kadınların serum ya da plazmalarında hücre dışı serbest fetal DNA miktarının artmış olduğunu tespit etmişlerdir (41). Benzer şekilde Zhong ve arkadaşları trizomi 21 gebeliklerinde belirgin artmış fetal DNA seviyeleri bildirirken trizomi 18 varlığında artış olmadığını tespit etmişlerdir (42). Ohashi ve arkadaşları ile Hromadnikova ve arkadaşları ise maternal serumda fetal DNA seviyelerinde normal karyotipe sahip fetüsler ile trizomi 21 ya da 18'i olan fetüsler arasında farklılık olmadığını bildirmişlerdir (43,44).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. HASTA GRUBU

Çalışma ve kontrol grubu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı antenatal takip polikliniğine başvuran, çalışma hakkında bilgilendirilen ve çalışmaya katılım için izinleri alınan gebelerden oluşturulmuştur. Çalışma grubu dahilinde 7 uterin ve umbilikal arter Doppler akımları patolojik, izole IUGR veya preeklampsiye eşlik eden IUGR'si bulunan gebe bulunmaktadır. Kontrol grubu ise mevcut gebeliklerinde herhangi bir gebelik komplikasyonu olmayan 14 gebeden oluşmaktadır.

Çalışmaya tek, canlı, erkek fetüs gebeliği olan, 24-28. gebelik haftaları arasındaki gebeler dahil edildi. Tüm gebelerin gebelik yaşları ilk trimester ultrasonundaki CRL (crown-rump-length) ölçümleri ile doğrulandı. Tüm kan örnekleri doğum eylemi başlamadan önce alındı. Üriner enfeksiyonu tesbit edilen, vajinal kanaması veya pelvik ağrısı olan, aneuploidi veya fetal anomali tesbit edilen, kord insersiyon anomalisi olan, maternal sistemik lupus eritamatozis, diabetes mellitus veya hiper/hipotiroidi gibi sistemik hastalıkları olan gebeler çalışma dışı bırakıldı.

3.2. DEĞERLENDİRME

IUGR tanısı biparietal çap (BPD) ve abdominal çevre (FAC) ölçümleri çerçevesinde fetal büyümenin referans büyüme eğrisinde 2SD altında olduğunda konuldu. Eş zamanlı ultason incelemesi, biyofizik profil ve Doppler incelemeleri yapıldı. Umbilikal ve bilateral uterin arter pulsatilite indeksi (PI = sistol- diastol/ ortalama) ve rezistans indeksi (RI= sistol- diastol/ sistol) hesaplandı. Çalışmanın amacı çerçevesinde sadece umbilikal arterde diastolik akım kaybı veya ters akım varlığında, uterin arterde bilateral erken

diastolik çentik varlığı ve/veya RI'nın 0.62'den büyük olması durumunda paternin patolojik olduğu kabul edildi.

Preeklamsi tanısı NHBPEP (National High Blood Pressure Education Program) çalışma grubunun gebelikte görülen hipertansif bozukluklar 2000 klavuzu esas alınarak değerlendirilip konulmuştur. Bu klavuza göre tanılar tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Gebelikte görülen hipertansif hastalıkların tanısı

Gestasyonel Hipertansiyon TA \geq 140/90 mmHg gebelik süresince ilk defa Proteinüri yok Postpartum 12. haftadan sonra TA normale döner Kesin tanı doğum sonrası konur Epigastik ağrı veya trombositopeni gibi preeklampsinin diğer belirti ve bulguları görülebilir
Preeklampsi <i>Minimum kriter</i> 20. gebelik haftasından sonra TA \geq 140/90 mmHg Proteinüri \geq 300 mg/ 24 saat veya dipstik ile \geq +1 <i>Preeklampsi tanısının kuvvetlenmesi</i> TA \geq 160/110 mmHg Proteinüri \geq 2.0 g/ 24 saat veya dipstik ile \geq +2 Serum kreatinin $>$ 1.2 mg/dL (daha önce normal olduğu biliniyorsa) Trombosit $<$ 100.000/ mm ³ Mikroanjiopatik hemoliz (LDH yüksekliği) ALT veya AST yüksekliği İnatçı baş ağrısı veya görme bozuklukları İnatçı epigastrik ağrı
Eklampsi Preeklampsi dışında herhangi bir sebebe bağlanamayan nöbet
Süperempoze preeklampsi (kronik hipertansiyon zemininde) Hipertansif kadında 20. gebelik haftasından önce olmayan, yeni ortaya çıkan \geq 300 mg/ 24 saat proteinüri Hipertansiyonu ve 20. gebelik haftasından önce proteinürisi olan gebelerde aniden artış gösteren proteinüri veya kan basıncının artması veya trombosit sayısının 100.000/mm ³ altına düşmesi
Kronik hipertansiyon Gebelik öncesi veya gestasyonel trofoblastik hastalık yokluğunda 20. gebelik haftasından önce TA \geq 140/90 mmHg veya 20. gebelik haftasından önce hipertansiyon tespit edilmesi ve postpartum 12. haftadan sonra hipertansiyonun devam etmesi

'NHBPEP (National High Blood Pressure Education Program) çalışma grubunun gebelikte görülen hipertansif bozukluklar klavuzu (2000) ' (Cunningham ve ark., 2005)

3.3. KAN ÖRNEĞİ

Gebelerden vacutainer sistemi ile EDTA'lı tüplere yaklaşık 10 ml periferik kan ön kol venlerinden alındı. 10 ml periferik kan 3.000xg'de 10 dakika santrifüje edilip plazma temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra ikinci bir kez 3.000xg'de 10 dakika santrifüje edilip sonrasında 1'er ml olmak üzere 4 ayrı tüpe dağıtılarak DNA izolasyonuna geçildi. Gebelerden alınan tüm kan örneklerinde hücre dışı serbest fetal DNA miktarının tayini Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.4. MATERNAL KANDAN DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu, 900 mikrolitre plazmadan MagNA Pure LC DNA İzolasyon Kiti kullanılarak MagNA Pure LC Otomatik DNA İzolasyon Cihazı ile yapıldı. Real-time PCR'larda elde edilen DNA'ların 5 mikrolitresi kalıp olarak kullanıldı.

3.5. FETAL VE TOPLAM (FETAL+MATERNAL) DNA KANTİTASYONU

Fetal DNA kantitasyonu SRY lokusunda, toplam DNA kantitasyonu β -globin lokusunda gerçekleştirilen real-time PCR ile yapıldı.

SRY real-time PCR Tablo 3.1'de verilen primer ve proplar kullanılarak LightCycler TaqMan Master kiti ile gerçekleştirildi. RT-PCR'da 95°C'de 10 dakika denatürasyondan sonra 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 3 saniye olmak üzere toplam 45 döngü uygulandı.

SRY real-time PCR iki kez tekrarlanıp kantitasyonları yapıldıktan sonra ortalamaları fetal DNA miktarı olarak belirlendi (genomik eşdeğer/ml olarak).

B-globin-real-time PCR yukarıdaki reaksiyonlarla eş zamanlı olarak, Tablo 3.1'de verilen primer ve proplar kullanılarak LightCycler TaqMan

Master kiti ile gerçekleştirildi. RT-PCR'da 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 3 saniye olmak üzere toplam 45 döngü uygulandı. β -globin-real-time PCR her örnek için ikişer kez yapıldı ve kantitasyonların ortalaması toplam DNA miktarı (maternal + fetal) olarak belirlendi (genomik eşdeğer/ml olarak).

Kantitasyonlar aşağıda belirlenen formüle göre hesaplandı (Lo ve ark., 1998).

Tabol 3.2. Real-time PCR'da kullanılacak primer ve prob dizileri

Lokus	Dizi
SRY	
SRY-109F	5'-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC-3'
SRY-245R	5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT-3'
SRY-142T	5'-(FAM)AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA(TAMRA)-3'
β-globin	
β -globin-354F	5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3'
β -globin-455R	5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'
β -globin-402T	5'-(FAM)AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG(TAMRA)-3'

3.6. KANTİTASYON

Konsantrasyonu bilinen erkek kontrol DNA örneğinden 6.6 pg DNA hücre çevirme faktörü kullanılarak 1-100.000 kopya arasında olacak şekilde 10'ar kez sulandırılmış 6 dilüsyon hazırlanıp bu örneklerde gerçekleştirilen real-time PCR ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve diğer örneklerdeki DNA miktarı bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlendi. Plazmadaki DNA miktarları ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C = Q \times (V_{DNA}/V_{PCR}) \times (1/V_{ext})$$

C= plazmadaki DNA miktarı (kopya/ml)

Q= PCR örneğindeki DNA miktarı (kopya/ml)

V_{DNA} = DNA izolasyonunda elde edilen DNA'nın hacmi (200 mikrolitre)

V_{PCR} = PCR için kullanılan kalıp DNA hacmi (5 mikrolitre)

V_{ext} = DNA izolasyonunun yapıldığı plazma hacmi (1000 mikrolitre)

3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm istatistiksel analizler SPSS kullanılarak yapılmıştır. Dağılımın normal olmaması ve hasta sayısının 30'un altında olması nedeniyle kontrol ve hasta grubunda maternal kanda hücre dışı serbest fetal ve maternal DNA karşılaştırması Mann-Whitney Rank Sum Testi kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında değerlendirilen gebelerin yaş, örnekleme yapıldığı sıradaki gebelik haftası, doğum sırasındaki gebelik haftası, total ve fetal DNA miktarları Tablo 4.1’de izlenmektedir.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, örnekleme yapıldığı gebelik haftası, doğum sırasındaki gebelik haftası, fetal ve total DNA değerleri

Hasta no	Hasta yaşı	Örnekleme yapıldığı gebelik haftası	Doğum sırasındaki gebelik haftası	Perinatal komplikasyon	Fetal cinsiyet	Total DNA (ge/ml)	Fetal DNA (ge/ml)
1	30	27 ⁶	40 ⁴	-	E	3603	50
2	26	26 ⁵	39 ⁵	-	E	2611	52.8
3	24	26 ⁵	39 ⁴	-	E	1136	48
4	33	26 ³	40 ⁵	-	E	1972	34
5	29	24 ⁰	37 ⁰	-	E	92400	89.6
6	31	26 ⁰	38 ⁰	-	E	53380	19.2
7	34	25 ⁵	39 ⁰	-	E	48600	17.2
8	29	27 ²	37 ⁶	-	E	240840	428
9	30	27 ⁴	38 ⁰	-	E	1312	384
10	29	26 ³	38 ⁶	-	E	739	142
11	37	24 ⁴	37 ⁵	-	E	266000	24.4
12	31	25 ⁰	41 ²	-	E	2767	33.6
13	21	25 ³	40 ⁰	-	E	9448	20.4
14	24	25 ²	39 ⁵		E	1854	35.2
15	32	28 ²	28 ³	IUGR	E	44680	33.6
16	33	26 ²	26 ²	IUGR	E	2190	172
17	31	26 ⁵	27 ⁶	IUGR	E	3876	640
18	28	25 ⁴	26 ¹	IUGR+PE	E	1560	85.2
19	22	27 ⁰	27 ²	IUGR+PE	E	4400	576
20	33	26 ⁴	28 ⁴	IUGR	E	4398	576
21	24	27 ²	28 ⁴	IUGR	E	739	142

Hasta ve kontrol grubu arasında ortalama anne yaşı (29 – 28.7), örnekleminin yapıldığı gebelik haftası (27 hafta – 28 hafta) arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Hasta grubunda doğum sırasındaki gebelik haftası belirgin olarak daha küçüktür ($p < 0.05$).

Tablo 4.2. Gruplara göre tanımlayıcı istatistik tablosu

KONTROL VE HASTA GRUBU			TOTAL DNA	FETAL DNA
KONTROL	N		14	14
	ORTALAMA		52261,829	98,600
	ORTANCA		3185,500	42,000
	ST. SAPMA		89853,4218	134,9036
	ARALIK (MAX-MİN)		265260,8	411,6
	MİN		739,2	17,2
MAX		266000,0	428,8	
HASTA	N		7	7
	ORTALAMA		8834,829	317,829
	ORTANCA		3876,800	172,000
	ST. SAPMA		15871,5197	265,8894
	ARALIK (MAX-MİN)		43941,0	606,4
	MİN		739,0	33,6
MAX		44680,0	640,0	

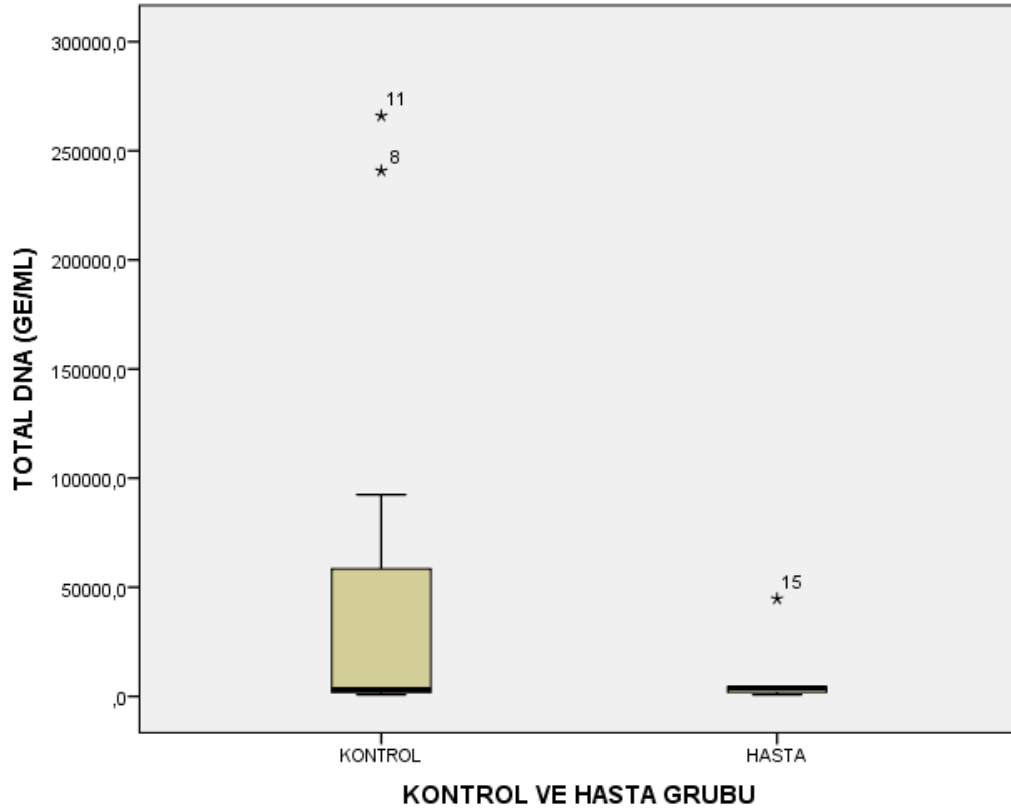
Tablo 4.3. Test istatistikleri (Mann-Whitney Test)

Test Statistics ^a		
	TOTAL DNA	FETAL DNA
Mann-Whitney U	41,000	18,000
Wilcoxon W	69,000	123,000
Z	-,597	-2,315
Asymp. Sig. (2-tailed)	,551	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,585 ^b	,020 ^b

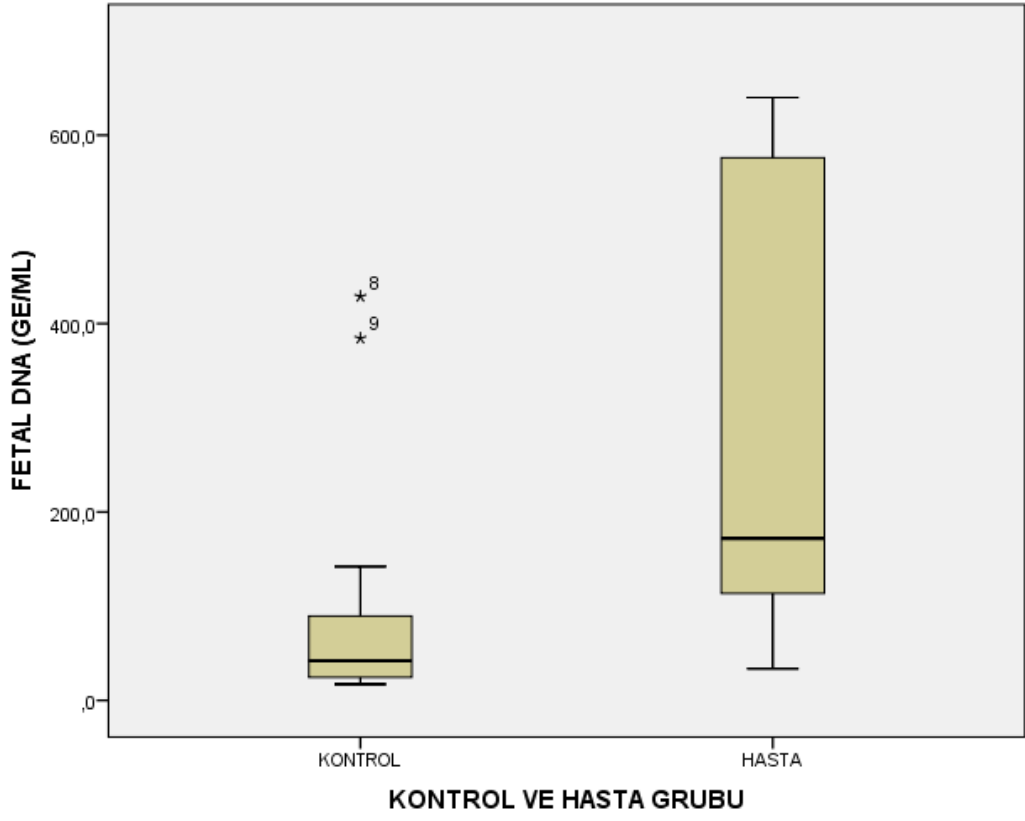
a. Grouping Variable: KONTROL VE HASTA GRUBU

b. Not corrected for ties.

Hasta grubunda maternal kanda hücre dışı serbest fetal DNA, kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek tespit edilirken ($p = 0.021$), total DNA miktarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p = 0.551$).



Şekil 3.1. Hasta ve kontrol gruplarında total DNA miktarları (genomik eşdeğer/ml) ($p=0.551$)



Şekil 3.2. Hasta ve kontrol gruplarında hücre dışı serbet fetal DNA miktarları (geneomik eşdeğer/ml) (p= 0.021)

4. TARTIŞMA

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bilgilere göre uterin ve umbilikal arterde patolojik Doppler akımları bulunan, izole intrauterin gelişme geriliği veya preeklampsiye eşlik eden intrauterin gelişme geriliği olan gebelerde maternal kanda serbest fetal DNA miktarında, herhangi bir gebelik komplikasyonu bulunmayan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulunmaktadır. Önlenebilir perinatal mortalite ve morbiditeye sebep olan gebelik patolojilerinin tanınabilmesi obstetrik bakım sunanların ana hedeflerindedir. Bu durumların tanınabilmesi, perinatal komplikasyonları en aza indirgeyecek kaynakların yönlendirilmesine olanak sağlar. İntrauterin gelişme geriliği tanı kriterlerine göre gebeliklerin %3-7'sini etkileyen, perinatal mortalite hızının ikinci önemli belirleyicisidir. İntrauterin gelişme geriliği çoğu vakada ekstavillöz trofoblastlarca uterin spiral arterlerin anormal invazyonu sonucu gelişen uteroplasental yetmezliğe bağlıdır. Literatürde preeklampsi ile komplike gebeliklerde maternal kanda fetal hücreler ve fetal DNA ile yapılmış çalışmalar mevcutken, intrauterin gelişme geriliği bulunan gebeliklerle ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

İlk olarak Lo ve arkadaşları (1999b) yayımladıkları çalışmalarında preeklampsinin maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA miktarında kontrol grubuna göre beş kat artış ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Takip eden retrospektif bir çalışmada (2001) Zhong ve arkadaşları benzer sonucun yanında, dolaşan fetal ve maternal DNA seviyelerindeki artışın hastalık ciddiyeti ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir. Tablo 5.1'de preeklampsi ile komplike gebelikler ile normotansif kontrol grubunda maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA konsantrasyonlarını karşılaştıran çalışmalar izlenmektedir.

Preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği patogenezinde sıklıkla anormal plasentasyon sorumludur ve bunlar izole ya da birlikte görülebilir. Sekizawa ve arkadaşları (2003) yayımladıkları çalışmalarında, Doppler

akımları ile plasental durumu değerlendirmeksizin intrauterin gelişme geriliğini gestasyonel yaşa göre ultrasonografik olarak belirlenmiş fetal ağırlığın 2 SD altında olduğu durum olarak belirlemişler ve fetal DNA konsantrasyonunu kontrol grubu ile benzer tespit etmişlerdir. Takip eden bir başka çalışmada Caramelli ve arkadaşları (2003) patolojik uterin arter Doppler akımları ile birlikte intrauterin gelişme geriliği olan hastalarda hücre dışı serbest fetal DNA 'nın 2.16 kat artmış olduğunu bildirmişlerdir. Smid ve arkadaşları (2006) preeklamside olduğu gibi intrauterin gelişme geriliğinde de fetal DNA 'nın anlamlı yüksek olduğunu ve bunun patolojik umbilikal arter doppler akımları ile korele olduğunu bildirmişlerdir.

Maternal kana fetal DNA salınımına sebep olan fizyolojik ve patolojik faktörler hakkında bilinenler sınırlıdır. Preeklampsinin fetal DNA konsantrasyonunda artışa sebep olduğu ve preeklampsinin klinik prezentasyonundan önce bu artışın belirlenebildiği Leung ve arkadaşlarının (2001) çalışmasında gösterilmiştir. Tespit edilen yüksek değerleri açıklamak üzere trofoblastlar ve eritroblastlar gibi fetal hücrelerin maternal dolaşıma artmış geçişi dahil çeşitli hipotezler sunulmuştur. Ayrıca preeklampitik gebeliklerde sititrofoblastlarda yaygın apoptoz Di Federico ve arkadaşlarının 1999'da yayımladıkları çalışmalarında gösterilmiştir. Bir başka çalışmada da, takiplerinde preeklampsi ve/veya intrauterin gelişme geriliği gelişen hastalarda maternal dolaşımdaki artmış fetal eritroblast trafiği gösterilmiştir (Al- Mufti 2000). İntrauterin gelişme geriliği vakalarında, fetal hipoksinin eritropoetin üretimini stimüle etmesi nedeniyle fetal eritroblast seviyelerinde artış gözlenir. Doppler ultrasonografi vasküler direnç ve indirekt olarak da kan akımı hakkında fikir verir. Normal gebeliklerde 24-26. gebelik haftasına kadar RI'inde tedrici azalma izlenir. Bu fizyolojik azalmanın olmaması durumunda hipertansif hastalıklar ve/ veya intrauterin gelişme geriliği için artmış insidans çok sayıdaki çalışma ile gösterilmiştir. Jacobson ve arkadaşlarının 1990 yılında yayımladıkları çalışmalarında artmış RI'nin preeklampsi ve/veya intrauterin gelişme geriliği için yüksek riskli kadınlarda, gelişme kısıtlılığını %70.6 sensitivite ve %33.3 pozitif prediktif değer ile öngördüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte düşük risk grubunda Doppler incelemeleri fetal gelişme

kısıtlılığı için en fazla %50 sensitivite ve %35 pozitif prediktif değer sunmaktadır. Chen ve arkadaşları 2000 de uterin arter Doppler akım çalışmalarının preeklampsi, intrautein gelişme geriliği ve perinatal ölümü öngörmedeki tanısal etkinliğini değerlendirdikleri bir review yayımlamışlardır. 27 çalışma ve 12.994 hastanın dahil edildiği değerlendirmede yazarlar, düşük ve yüksek risk grubunda bu tarama metodunun düşük prediktif değeri olduğu sonucuna varmışlardır. Her ne kadar literatürde uyumsuz sonuçlar olsa da genel kanı, Doppler verilerinin yüksek risk grubundaki hastalarda gebelik komplikasyonlarını öngörmeye daha etkin olduğu yönündedir. Biz çalışmamızda, Dopplerin taramadaki etkinliğini araştırmayı değil, patolojik Doppler akımlarının fetal DNA kantitasyonundaki belirleyici değerini öngörmeyi amaçladık. Daha yüksek fetal DNA seviyelerinin gözlemlenmiş olması bu grup hastadaki moleküler ve hemodinamik değişikliklerin varlığını destekler niteliktedir.

Yaptığımız bu çalışma ve buna benzer diğer çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği gibi patofizyolojisinde anormal plasentasyonun sorumlu tutulduğu hastalıklarda maternal plazmadaki hücre dışı serbest fetal DNA miktarının artmasında plasentasyon bozukluğunun kilit rol üstlendiğini savunmaktayız.

Bugün için normal plasentasyonda görevli trofoblastların maternal dolaşımdaki hücre dışı serbest fetal DNA'nın ana kaynağı olduğu görüşü birçok yazar tarafından savunulmaktadır. Doğal yaşam siklusunun sonuna gelen trofoblastların apoptoza uğradığı bilinmektedir. DNA normal gebeliklerde de maternal plazmada bulunmakta ve trofoblastlardaki fizyolojik re-modeling nedeniyle ilerleyen gebelik haftası ile seviyesi artmaktadır. Herhangi bir gebelik komplikasyonu gelişmemiş normal gebeliklerdeki maternal plazmada tespit edilen hücre dışı serbest fetal DNA'nın bu şekilde apoptoza uğrayan hücrelerden maternal dolaşıma dökülen partiküllerden oluştuğu görüşü bugün için hakim olan görüştür. İn-vitro çalışmalar, sinsityotrofoblastlarda meydana gelen apoptoz ve nekroz ile ilişkili dejeneratif değişiklikler ile fetal DNA salınımı arasındaki ilişkiyi açıkça

ortaya koymaktadır. Diğer taraftan hem preeklampsi hem de intrauterin gelişme geriliğinde trofoblast hücre ölümü artmakta ve bu sadece apoptoz ile değil aynı zamanda nekroz ile olmaktadır (Formigli 2000, Huppertz 2006). Preeklampsili hastalarda trofoblastlarda proliferasyon ve re-modeling ile birlikte villöz yüzeylerde değişimde artış mevcuttur. Bunun sonucu olarak da plasental materyal, maternal dolaşıma kararlı bir artış ile geçmekte ve muhtemelen sitotrofoblastlardaki dejeneratif değişiklikler ile hücre dışı serbest fetal DNA seviyelerinde direkt ilişki bulunmaktadır. Ciddi preeklampsi gelişecek hastaların plasentalarındaki değişikliğin ne zaman başladığı iyi bilinmiyor olsa da Illanes ve arkadaşlarının 2009 da yayımladıkları çalışmalarında bu değişikliklerin birinci trimester kadar erken olabileceği üzerinde durulmaktadır.

Yetersiz trofoblast invazyonu ve sonucunda gelişen yüksek dirençli plasental kan akımı, hipoksi gibi zorlayıcı koşullar, apoptoz sürecindeki trofoblastları etkilemekte ve aponekrozis olarak adlandırılan daha hızlı ve ciddi bir sürece sokmaktadır. Bu bağlamda, maternal dolaşıma dökülen, fetal DNA içeren aponekrotik partikül sayısı bozuk plasentasyon ile artmaktadır.

Maternal plazmadaki hücre dışı serbest fetal DNA miktarının artışı ile ilgili değişik mekanizmalar öne sürülmektedir. Muhtemel mekanizmalardan biri de maternal dolaşımdan DNA eliminasyonunun yavaşlamasıdır. Böbrekler ve karaciğer dolaşımdaki DNA'nın atılımından sorumlu organlar olarak görülmektedir. Preeklampside böbrek ve karaciğerde tanımlanan değişik patolojilerin hücre dışı serbest fetal DNA atılımında yavaşlamaya sebep olarak miktarını arttırdığını savunan yayınlar bulunmaktadır. Bugün için güncel olan görüş ise hücre dışı serbest fetal DNA'nın büyük bölümünün plasenta kaynaklı olduğu yönündedir.

Sonuç olarak hücre dışı serbest fetal DNA, preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği gibi plasental disfonksiyona ikincil gebelik komplikasyonları için potansiyel non-invaziv bir belirteçtir. Taramada kullanımındaki sınırlayıcı özelliklerden birisi cinsiyet bağımlı olması nedeniyle fetüsün female olduğu

gebeliklerde kantite edilememesidir. Her ne kadar günümüzde çalışmalar plasental dokular ile maternal dokularda gen metilasyonundaki farklılıklar gibi epigenetik değişiklikler üzerine yoğunlaşsa da, maternal plazmada fetal DNA'nın belirlenebileceği evrensel bir metot arayışı sürmektedir.

Özetle hücre dışı serbest fetal DNA, ciddi preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği gelişecek vakalarda klinik tablo oturmadan önce yükselebilmekte ve bu bulguların söz konusu hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. Değişikliklerin doğası ve zamanlamasının belirlenebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Risk altındaki gebeliklerin erkenden tanımlanabilir olması, hem klinik bakımın yönlendirilmesi, hem de ileri çalışmalara ışık tutması anlamında teşvik edicidir.

Tablo 5.1. Preeklampsi ile komplike gebelikler ile normotansif kontrol grubunda maternal plazmada hücre dışı serbest fetal DNA konsantrasyonlarını karşılaştıran çalışmalar (Sifakis., 2009)

Çalışma	Marker	Örnekleme zamanı (hf) ^a	Preeklampsi grubu, n	Genomik eşdeğer/mL ^a	Kontrol grubu, n	Genomik eşdeğer/mL ^a
Preeklampsi olan oastalarla						
Lo et al	SRY	32 (27-41)	20	381 (194-788)	20	76 (54-163)
Zhong et al	SRY	- (28-40)	39	1599 (0-7968)	46	333 (0-1608)
Smid et al	SRY	- (26-40)	17	256 (59-859)	38	24 (0-138)
Swinkels et al	SRY	33 (27-34)	7	781 (503-1212) ^b	10	128 (96-170) ^b
Lau et al	SRY	32 (30-37)	7	521 (274-3089)	10	277 (34-468)
Sekizawa et al	DYS	35 (29-36)	9	2.1 MoM (0.9-9)	20	1.0 MoM (0.4-2.0)
Shimada et al	SRY	- (29-38)	15	173±95 ^c	59	22± 9 ^c
Farina et al	SRY	33.7 ± 3.9 ^d	34	2.6 ± 2.7 MoM ^d	102	1.0 ± 1.5 MoM ^d
Zhong et al	SRY	30 (24-33)	11	Erken preeklampsi: 574 (113-7088)	18	106 (47-269)
		36 (24-41)	12	Geç preeklampsi: 536 (61-1324)	12	125 (38-358)
Smid et al	SRY	32.5 (25-38)	28	Preeklampsi +, IUGR Φ: 195 (45-900)	89	58 (2-391)
		33 (23-36)	15	Preeklampsi+ IUGR: 304.1 (96.5-1682.3)		
Preeklampsi gelişmeden önce						
Leung et al	SRY	17 (11-22)	18	42 (36-2375)	33	22 (4.2-300)
Zhong et al	SRY	20 (19-25)	10	423 (97-1642)	40	129 (31-318)
Levine et al	DYS	- (17-28)	138	36 ± 6 ^c	137	16 ± 6 ^c
Farina et al	DYS	20 ± 2.08 ^d	6	2.4 ± 2.8 MoM ^d	30	1.0 ± 0.8 MoM ^d
Crowley et al	SRY	13 (10-20)	16	31 (0-214) ^e	72	28 (0-1280)
Sifakis et al	DYS	12 (11-13) ^a	44	Erken preeklampsi: 95.5 (72.7-140.9) Geç preeklampsi: 50.8 (25-103.8)	176	51.5 (31.1- 84.9) ^a

IUGR, intrauterin gelişme geriliği; MoM, multiple of the median

^a Veri başka şekilde belirtilmedikçe ortanca olarak verilmiştir; ^b Veri ortalama olarak verilmiştir (%95 güvenilirlik aralığı); ^c Veri ortalama olarak verilmiştir ± SEM; ^d Veri ortalama olarak verilmiştir ± SD; ^e Kontrol grubundan anlamlı farklı değil.

5. SONUÇ

Biz bu çalışma ile uterin ve umbilikal arter Doppler akımları patolojik olup intrauterin gelişme geriliği veya eşlik eden preeklampsisi olan gebelerde maternal dolaşıma karışan hücre dışı serbest fetal DNA miktarını tayin ederek, bu değeri herhangi bir gebelik komplikasyonu bulunmayan, normal gebeliklerdeki miktar ile karşılaştırdık. Böylece patofizyolojilerinde yer alan plasentasyon bozukluğunu da göz önünde tutarak bu durumun patofizyolojik sürece olan katkısını irdeledik.

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bilgilere göre plasental yetmezliğe bağlı intrauterin gelişme geriliği ve preeklampside hücre dışı serbest fetal DNA miktarında herhangi bir gebelik komplikasyonu bulunmayan gebelere kıyasla anlamlı derecede artış bulunmaktadır. Bu artışın ana nedeninin yetersiz trofoblast invazyonu sonucu gelişen anormal plasentasyon olduğu ve maternal dolaşımdaki hücre dışı serbest fetal DNA'nın esas olarak plasenta kaynaklı olduğu görüşüne vardık.

Hedefteki çalışmalarda etiolojisinde plasentasyon bozukluğu bulunan hastalıklarda maternal plazmadaki hücre dışı serbest fetal DNA'nın tablo oturmadan önce, erken prediktif bir belirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

ÖZET

24-28.GEBELİK HAFTALARINDA DOPPLER AKIM DEĞİŞİKLİKLERİ İLE MATERNAL KANDA FETAL DNA DEĞERLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ve preeklampsi plasental yatakta trofoblast invazyonunda anormalliklerle ilişkili hastalıklar olup fetal ve maternal mortalite ve morbiditenin önde gelen sebeplerindedir. Normal gebelikte, uterin spiral arterlerin trofoblastik invazyonu vaküler rezistansı azaltıp uygun fetoplasental kan dolaşımına izin verecek şekilde gerçekleşir. IUGR ve preeklampside bu adaptif fenomen genellikle başarısız olup, spiral arterlerde azalmış infiltrasyon ve modifikasyon uterin sirkülasyonda yüksek direnç sebep olur. Uterin arterlerde bozulmuş kan akımı, uterin arter Doppler akım çalışmaları ile gösterilebilir; bunun da preeklampsi ve/veya IUGR için risk altında olan gebe kadınların ayırımında değeri olduğu gösterilmiştir. IUGR'de ayrıca fetal dolaşımdaki yeniden dağılım nedeniyle umbilikal arter Doppler akımlarında da değişiklikler meydana gelir.

Bozulmuş plasentasyon özellikle uterin duvardaki sitotrofoblastlarda artmış apoptoz oranları ve sinsityotrofoblast mikrovillus partiküllerinin maternal sirkülasyona artmış dökülmesi ile birlikte. Her iki fenomen de maternal sirkülasyonda artmış fetal DNA salınımına katkıda bulunabilir. Biz bu çalışma ile uterin ve umbilikal arter doppler akımları patolojik olan izole ya da preeklampsi ile birlikte görülen intrauterin gelişme geriliği vakalarında maternal dolaşıma karışan hücre dışı serbest fetal DNA miktarını tayin ederek, bu değeri normal gebelikler ile karşılaştırmayı amaçlamaktayız.

Çalışma grubu dahilinde 7 intrauterin gelişme geriliği \pm preeklampsisi olan gebenin periferik venlerinden alınan kanlarından ayrılan maternal plazmalarında real- time PCR yöntemi ile hücre dışı serbest fetal ve maternal DNA miktarları tespit edildi. Bu değer herhangi bir gebelik komplikasyonu olmayan 14 kontrol gebedeki değer ile karşılaştırıldı.

Plasental yetmezliğe bağlı intrauterin gelişme geriliği \pm preeklampsisi olan gebelerde maternal plazmadaki hücre dışı serbest fetal DNA miktarının (172 genomik eşdeğer/ ml) kontrol grubuna göre (42 genomik eşdeğer/ml) anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p= 0.021$). Hasta grubunda saptanan total DNA miktarı (3876 genomik eşdeğer/ ml), kontrol grubuna göre (3185 genomik eşdeğer/ ml) yüksek izlenmiş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.551$).

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bilgilere göre plasental yetmezliğe bağlı intrauterin gelişme geriliği veya preeklampsiye eşlik eden İUGR'de hücre dışı serbest fetal DNA miktarında herhangi bir gebelik komplikasyonu bulunmayan kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış bulunmaktadır. Literatürde real-time PCR kullanılarak benzer şekilde yapılmış ve sonucu destekleyen çalışmalar mevcuttur.

Anahtar sözcükler: Hücre dışı serbest fetal DNA, intrauterin gelişme geriliği, preeklampsi, gebelik, plasentasyon, trofoblast.

SUMMARY

Intrauterine growth restriction and preeclampsia have been linked to abnormalities in trophoblast invasion into the placental bed and are one of the leading causes of fetal and maternal morbidity and mortality. During normal pregnancy, trophoblastic invasion of uterine spiral arteries takes place reducing the vascular resistance and allowing adequate fetoplacental blood supply. In intrauterine growth restriction and preeclampsia this adaptive phenomenon is often insufficient, resulting in a diminished infiltration and modification of the spiral arteries, which lead to the maintenance of a high-resistance uterine circulation. Impeded blood flow in the uterine arteries can be revealed by uterine artery Doppler velocimetry which has been found to have some predictive value for the discrimination of women at risk for preeclampsia and intrauterine growth restriction. In intrauterine growth restriction also umbilical artery Doppler velocimetry is altered because of the blood-flow redistribution in fetal circulation.

Impaired placentation has been found to be associated with both increased levels of apoptosis, predominantly among uterine wall placental syncytiotrophoblast microvilli particles into maternal circulation; both phenomena could contribute to an increased fetal DNA release into the maternal circulation. We attempt to determine the amount of cell free fetal DNA passes through the maternal circulation in women with isolated intrauterine growth restriction or intrauterine growth restriction together with preeclampsia whose uterine and umbilical artery Doppler velocimetry is altered and compare this amount with the normal control cohort.

In this study we measured the amount of cell free fetal and maternal DNA by using real-time PCR in peripheral maternal plasma obtained from the peripheral vein of 7 women with isolated intrauterine growth restriction or intrauterine growth restriction together with preeclampsia and compared this

amount with the samples from 14 pregnant women who has no gestational complication.

We confirmed that the cell-free fetal DNA from women with isolated intrauterine growth restriction or intrauterine growth restriction with preeclampsia is statistically significantly higher than the control cohort (172 genome equivalents/ ml vs 42 genome equivalents/ ml respectively) ($p=0.021$). The cell free total DNA content was also higher in the pathological subsets than in control pregnancies (3876 genome equivalents/ ml vs 3185 genome equivalents/ ml respectively) but this difference is not statistically significant ($p=0.551$).

According to the data from the study, isolated intrauterine growth restriction due to placental insufficiency or with preeclampsia, there is a significant elevation of cell free fetal DNA comparing with the control cohort. There are similar studies in the literature with real-time PCR supporting the results.

Key words: Cell-free fetal DNA, intrauterine growth restriction, preeclampsia, pregnancy, placentation, trophoblast.

KAYNAKLAR

1. Lo YM, Teins MS, Lau TK et al. 1998. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plazma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62: 768-775.
2. Galbiati S, Smid M, Gambini D, et al. 2005. Fetal DNA detection in maternal plazma throughout gestation. *Hum genet* 117: 243-248.
3. Lo YM, Teins MS, Lau TK et al. 1999b. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45: 184-188.
4. Sekizawa A, Jimbo M, Satio H, et al. 2003. Cell –free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 188: 480-484.
5. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. 1972. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclamsia. *Obstet Gynecol Annu* 1:177-191.
6. Papageorghiou AT. Yu CKH. Nicolaides KH. 2004. The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome. *Best Pract Clin Obstet Gynecol* 18: 383-396.
7. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. 1999. Preeclamsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 155: 293-301.
8. Sekizawa A, Farina A, Sugito Y. et al. 2004. Proteinuria and hypertension are independent factors affecting fetal DNA values: a retrospective analysis of affected and unaffected patients. *Clin Chem* 50: 221-224.
9. H.S Brar and S.E.Rutherford. ‘Clasification of intrauterine growth retardation’. *Seminar in perinatology*, vol 12, no 1, pp, 2-10, 1988.

10. P.W.Soothill, K.H.Nicholaides and S.Campbell. 'Perinatal asphyxia, hyperlactemia, hypoglycemia and eritroblastosis in growth retardated fetuses'. British Medical Journal, vol. 294, no.6579, pp 1051-1053, 1987.
11. D.J.P Barker, A.R.Bull, C.Osmond and S.J.Simmonds. 'Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life'. British Medical Journal, vol.301, no.6746.pp. 259-262, 1990.
12. D.J.P Barker, P.D.Winter, C.Osmond, B.Margetts and S.J.Simmonds. 'Weight in infancy and death from ischaemic heart disease'. The Lancet, vol. 2, no. 8663, pp.577-580, 1989.
13. J.S.Dashe, D.D.McIntire, M.J.Lucas and K.J.Lenovo. 'Effects of symetric and asymetric fetal growth on pregnancy outcomes'. Obstet. Gynecol, vol. 96, no.3, pp.321-327, 2000.
14. Wolcocks J, Donald J, Duggan TC, Day N: Fetal cephalometry by ultrasound. J Obstet Gynecol Br Common 71:11, 1964.
15. Campbell S, Dewhurst CJ: Diagnosis of small-for-dates fetus by serial ultrasound cephalometry. Lancet 2:1002, 1971.
16. Wolfe HM, Gross TL, Sokol RJ: Reccurent small for gestational age birth: perinatal risks and outcomes: Am J Obstet Gynecol 157:288, 1987.
17. Gardosi J, Mul T, Mongelli M, Fagan D: Analysis of birthweight and gestational age in antepartum stillbirths. Br J Obstet Gynecol 105:524, 1998.
18. Khory MJ, Erikson D, Cordero JE, McCarthy BJ: Congenital malformations and intrauterine growth retardation: A population study. Pediatrics 82:83-90, 1988.

19. Eydoux P, Choiset A, LePorrier N et al: Chromosomal prenatal diagnosis: study of 836 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment. *Prenat Diagn* 9:255, 1989.
20. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350: 485-487.
21. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 1832-1834.
22. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantification of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997;61:822-9.
23. Chen XQ, Stroun M, Magenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:972-4.
24. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996;2:972-4.
25. Wataganara T, Chen AY, Leshane ES et al 2004. Cell free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 81:638-644.
26. Halica HD, Bedner E, Darzynkiewicz (2000). Segregation of RNA and separate packing of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 260:248-256.
27. Hupertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, Kaufman P. (2003). Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta* 24: 181-190.

28. Fomigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41-49.
29. Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D *et al.* Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn* 2003; 23: 235–238.
30. Chi C, Hyett JA, Finning KM, Lee CA, Kadir RA. Noninvasive first trimester determination of fetal gender: a new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG* 2006; 113: 239–242.
31. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C *et al.* Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1734–1738.
32. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ *et al.* Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946–948.
33. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002; 360: 998–1000.
34. Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002; 48: 778–780.
35. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 138–140.
36. Caramelli E, Rizzo N, Concu M *et al.* Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform

and intrauterine growth restriction – a pilot study. *Prenat Diagn* 2003; 23: 367–371.

37. Sugito Y, Sekizawa A, Farina A *et al.* Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma. *Clin Chem* 2003; 49: 1667–1669.
38. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H *et al.* Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002; 48: 353–354.
39. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352: 1904–1905.
40. Farina A, LeShane E, Romero R *et al.* High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a Risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 421–425.
41. Lo YM, Lau TK, Zhang J *et al.* Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999; 45: 1747–1751.
42. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000; 20: 795–798.
43. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum Genet* 2001; 108: 123–127.
44. Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D *et al.* Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2002; 2: 4.