



Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli İnvaziv Olmayan Fetal Tarama Testi Geliştirilmesi ve Klinik Validasyonu

PROJE SONUÇ RAPORU

Program Kodu: B-01

Proje No: 33216

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr.Mehmet Ali Ergün

Araştırmacılar: Meral Yirmibeş Karaoğuz, Esra Tuğ, Tuncay Nas, Hasan Hüseyin Kazan, Ekin Çelik

ÖNSÖZ

Bu proje, B GRUBU AR-GE PROJELERİ DESTEK PROGRAMI/2023-B-01 bağlamında TÜSEB tarafından 33216 numaralı proje numarasıyla desteklenmiştir.

Bu projeden kaynaklanan “Assessing Digital PCR and Next-Generation Sequencing: A Comparative Analysis of Efficacy, Accuracy, and Applications in Non-Invasive Prenatal Diagnosis” isimli derleme yazımız "Health & Science 2025-III” kitabında uluslararası kitap bölümü olarak Ekim 2025 sayısında yayımlanmıştır.

Prof.Dr.Mehmet Ali Ergün

19/11/2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	5
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2. LİTERATÜR ÖZETİ	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1 . Preklinik Çalışmalar	10
3.1.1. Primer-prob setlerinin dizaynı için intrakromozomal segmental duplikasyonların tespiti	10
3.1.2. İntrakromozomal segmental duplikasyonlara yönelik primer-prob setlerinin dizaynı	11
3.1.3. Primer-prob setlerinin optimizasyonu	14
3.1.4. Dijital PCR çalışmaları	15
3.2. Klinik Çalışmalar	17
3.2.1. Katılımcıların belirlenmesi	17
3.2.2. cfDNA izolasyonu	17
4. BULGULAR	18
4.1. Klinik çalışmalar	22
4.1.1. Daha da alt başlık	22
5. TARTIŞMA/SONUÇ	28
5.1. Öneriler	29
Referanslar	30

Şekiller

Şekil 1. Washington Üniversitesi'nin Segmental Duplications adlı veri tabanından indirilen dosyanın genel özelliklerini gösteren şekil.

Şekil 2. Kromozom Y için seçilen duplike bölgenin BLAST'lanması sonrası interkromozomal duplikasyonu gösteren şekil.

Şekil 3. Kromozom Y için seçilen hedef sekansın, bölgeler arasında baz farklılığını gösteren BLAST sonucu.

Şekil 4. Monopleks olarak her bir primer-prob seti için ayrı ayrı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu. A. Kromozom 1 (CY5), B. Kromozom 13 (HEX), C. Kromozom 21 (FAM), D. Kromozom X (HEX) ve E.

Kromozom Y (FAM) için dizayn edilen primer-prob setleri ile iki farklı referans insan genomu (kadın ve erkek) kullanılarak elde edilen amplifikasyon eğrileri.

Şekil 5. Múltipleks RT-PCR ile elde edilen optimal amplifikasyon eğrileri. Üst: Primer-prob havuzu I (Kromozom 1: Cy5, 13: HEX ve 21: FAM) ve Alt: Primer-prob havuzu II (Kromozom 1: Cy5, X: HEX ve Y: FAM). Materyal: Referans cfDNA.

Şekil 6. Geliştirilen sistem ile referans cfDNA kullanılarak gerçekleştirilen dPCR sonrası elde edilen floresans dağılımı. X eksen: Damlacık (droplet) İndeksi ve Y eksen: Floresans. Sol kolon; Mavi (FAM): Kromozom 21, Teal (HEX): Kromozom 13 ve Kırmızı (Cy5): Kromozom 1 ve Sağ kolon; Mavi (FAM): Kromozom Y, Teal (HEX): Kromozom X ve Kırmızı (Cy5): Kromozom 1. cfDNA materyal cinsiyeti: Erkek.

Şekil 7. Ticari NIPT kiti ve referans cfDNA materyali kullanılarak gerçekleştirilen dPCR sonrası elde edilen floresans dağılımı. X eksen: Droplet İndeksi ve Y eksen: Floresans. Mavi: Kromozom 18, Teal: Kromozom 21, Yeşil Kromozom 1, Sarı: Fetal hedef, Kırmızı: Kromozom 13 ve İnfrared: Kromozom Y. cfDNA materyal cinsiyeti: Erkek.

Şekil 8. İzole cfDNA'ların boyut analizi. A. 11 örnek için analiz sonucu ve B. Bir hasta için detaylı boyut analizi görseli.

Şekil 9. dPCR sonrası sayısal olarak elde edilen temsili sonuçlar. Materyal: Referans cfDNA; Kit: Ticari dPCR NIPT kiti.

Şekil 10. dPCR sonrası sayısal olarak elde edilen temsili sonuçlar. Materyal: Normal fetal cfDNA; Kit: Ticari dPCR NIPT kiti.

Tablolar

Tablo 1. RT-PCR bileşenleri, konsantrasyonları ve hacimleri.

Tablo 2. RT-PCR için termal profil.

Tablo 3. dPCR için kullanılan termal profil.

Tablo 4. iSAFE™ Non-Invasive Prenatal Test Assay kitinin floresan boya-hedef eşleşmeleri.

Tablo 5. İntrakromozomal segmental duplikasyon lokusları (GRCh37).

Tablo 6. Eşleşmeyen baz analizi sonrası dizayn edilen dejenere primer-prob setleri.

Tablo 7. Kromozom 1, 13 ve 21'i hedefleyen havuz için revize edilen reaksiyon miksi içeriği.

Tablo 8. Kromozom 1, X ve Y'yi hedefleyen havuz için revize edilen reaksiyon miksi içeriği.

Tablo 9. İzole cfDNA konsantrasyonları.

Tablo 10. Klinik örnekler için kıyaslamalı olarak gerçekleştirilen tarama sonuçları.

ÖZET

İnvaziv olmayan fetal tarama testi (NIPT) olarak adlandırılan yöntemde, fetal kromozomal değişiklikler, anne kanında fetüse ait hücre dışı DNA (cfDNA)'nın taranması ve analizi ile değişen yüzdelerde tespit edilebilmektedir. NIPT'de fetal DNA yüzdesi çeşitli stratejilerle hesaplandıktan ve maternal diskriminasyon sağlandıktan sonra kromozom 13, 18 ve 21 ve cinsiyet kromozomları yüksek doğrulukla taranabilmektedir. NIPT yaygın ve kabul görür bir şekilde, anne kanındaki fetal cfDNA'nın yeni nesil dizileme (NGS) sistemleri ile dizilenmesi sayesinde yüksek doğrulukla gerçekleştirilebilmektedir. Ancak, yüksek maliyeti, uzman çalışan gerektirmesi, analizin kapalı ve şirketler tekelinde olması, biyolojik verinin bulut teknolojisi ile yurtdışına çıkması ve maliyetleri minimize etmek için örneklerin bekletilmesi NGS sistemlerinin dezavantajlarındandır. Bu nedenlerle, NIPT'de farklı yöntemlerin denenmesi zorunludur. Dijital polimeraz zincir reaksiyonu (dPCR), örnek içerisinde çok az sayıdaki hedef bölgenin amplifikasyon ve kantifikasyonunu gerçekleştirebilen ve bu özellikleri ile standart ve gerçek zamanlı PCR'lere önemli ölçüde üstünlük sağlayan yöntemlerdendir. Ancak bu yöntemin NIPT'de kullanımı yaygın değildir ve klinik geçerlilik kazanmamıştır. Sistem bileşenlerinin düşük maliyeti, yürütme başına gerekli örnek sayısı ve analizin açık ve kurum içerisinde gerçekleştirilir olması, dPCR'nin NIPT'de NGS'ye kıyasla avantaj sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Sunulan proje, ülkemizde ilk defa, NIPT için kromozom 13, 18 ve 21 ve cinsiyet kromozomlarını taramaya yönelik dPCR kitlerinin geliştirilmesini ve klinik validasyonunu amaçlamıştır. Projede kromozom 1'in kontrol olarak tutulmasıyla kromozom 13 ve 21 ve cinsiyet kromozomlarını taramaya yönelik intrakromozomal segmental duplikasyon bölgelerinden dPCR primer-prob setleri dizayn edilmiştir. Dizayn setler, ticari insan genomik DNA'sı ve yapay cfDNA ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile optimize edilmiştir. Son olarak geliştirilen sistem, bir ticari kontrol kiti varlığında, NGS ile sonucu bilinen klinik örneklerde valide edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, dPCR'ın, önerilen strateji ile NIPT'de klinik geçerliliği olabileceğine işaret etmiştir. Sunulan çalışma ile açığa çıkartılan sistem, dPCR temelli NIPT kiti olmasının yanı sıra özellikle yenidoğanda sayısal kromozomal anomalilerin taranmasında kullanılabilir. Bu durumda, periferik venöz kandan izole edilecek yoğun miktardaki genomik materyalle çalışmalar RT-PCR ve/veya dPCR ile gerçekleştirebilir ve yenidoğanda yaşamla bağdaşan sayısal kromozomal anomaliler tespit edilebilir. Bu çalışmaların yürütülmesine araştırma grubumuzca devam edilmektedir.

Sonuç olarak; girişimsel olmayan prenatal tanı da NGS ile 24 kromozoma ait sonuç verilmesi çığır açıcı bir yöntem olmakla beraber dPCR ile hızlı ve düşük maliyetli tarama yapılmasının toplum sağlığı açısından büyük bir önem taşıdığını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Hücre Dışı Nükleik Asitler, Anöploidi, Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Prenatal Tanı, İnvaziv Olmayan Prenatal Tanı, Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ABSTRACT

In the non-invasive fetal screening test (NIPT), fetal chromosomal alterations can be detected in varying percentages by screening and analyzing fetal cell-free DNA (cfDNA) in maternal blood. After calculating the fetal DNA percentage using various strategies and ensuring maternal discrimination, NIPT can screen chromosomes 13, 18, and 21, as well as the sex chromosomes, with high accuracy. NIPT is widely accepted, and can be performed with high accuracy by sequencing fetal cfDNA in maternal blood using next-generation sequencing (NGS) systems. However, disadvantages of NGS systems include high costs, the need for specialized personnel, the closed and corporate monopoly nature of the analysis, the export of biological data via cloud technology, and the storage of samples to minimize costs. For these reasons, it is necessary to experiment with different methods in NIPT. Digital polymerase chain reaction (dPCR) is a method capable of amplifying and quantifying very small numbers of target regions within a sample, offering significant advantages over standard and real-time PCR. However, this method is not widely used in NIPT and has not gained clinical validation. The low cost of system components, the number of samples required per run, and the fact that the analysis is open and performed in-house suggest that dPCR may offer advantages over NGS in NIPT.

The presented project aimed to develop and clinically validate dPCR kits for screening chromosomes 13, 18, and 21, and sex chromosomes, for the first time in Türkiye. Using chromosome 1 as a control, dPCR primer-probe sets were designed from intrachromosomal segmental duplication regions for screening chromosomes 13 and 21 and sex chromosomes. The designed kits were optimized using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with commercial human genomic DNA and synthetic cfDNA. Finally, the developed system was validated using NGS on clinical samples with known results, in the presence of a commercial control kit. The results indicated that dPCR may have clinical validity in NIPT with the proposed strategy. The system developed in the presented study, in addition to being a dPCR-based NIPT kit, can be used to screen for numerical chromosomal anomalies, particularly in newborns. In this case, studies can be performed using RT-PCR and/or dPCR using large amounts of genomic material isolated from peripheral venous blood, and numerical chromosomal anomalies compatible with life can be identified in newborns. Our research group continues to conduct these studies.

In conclusion, while providing results for all 24 chromosomes with NGS in non-invasive prenatal diagnosis is a groundbreaking method, we believe that rapid and cost-effective screening with dPCR is of great importance for public health.

Keywords: Cell-Free Nucleic Acids, Aneuploidy, Multiplex Polymerase Chain Reaction, Prenatal Diagnosis

1. GİRİŞ

Prenatal tanı, önleyici sağlık uygulamalarının en önemli unsurlarından biri olarak sağlıklı yenidoğanın ve popülasyonun garanti altına alınmasında önem arz etmektedir. Prenatal tanı ile erken gebelik haftalarında farklı yaklaşımlarla fetüse dair patogenezelelerin tespiti mümkündür. Bu sayede, uygun yasal düzenlemeler çerçevesinde ve ebeveyn kararı ile gebeliği sonlandırmak ya da sonlandırılmayan gebeliklerde, yenidoğanda görebilecek anomalilerin önceden bilinmesi ile ebeveynlerin sosyoekonomik olarak bu duruma hazırlıklı olmasını sağlamak mümkündür.

İnvaziv olmayan prenatal test (non-invasive prenatal testing; NIPT), prenatal tanıda büyük ilerleme haline gelerek fetal genetik hastalıkların erken tanısında devrim oluşturarak hem anne hem de fetus için riskleri en aza indirmiştir. 2012 yılında başlayan NIPT uygulaması, anne kanında bulunan hücre dışı fetal DNA (cell-free DNA; cfDNA)'nın analizine dayanmaktadır ve kromozomal anöploidilerin yüksek hassasiyet ve güvenlikle tespit edilmesini sağlar. Geleneksel olarak, amniyosentez (AS), koryon villus örnekleme (chorionic villus sampling; CVS) ve kordosentez (KS) gibi doğum öncesi tarama yöntemlerinin, spontan düşükler ve invaziv işlemlerle ilişkili teorik komplikasyonlar dahil olmak üzere bazı riskleri olabilir. NIPT, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğüyle birlikte anne adayları için cazip bir seçenek haline getiren invaziv olmayan bir alternatif sunar [1].

Geleneksel olarak doğum öncesi testler büyük ölçüde invaziv olup öncelikle AS, CVS ve KS gibi yöntemleri kapsamaktadır. 1980'lerde maternal serum taramasının ortaya çıkışı, Down Sendromu gibi hastalıklar için bir risk değerlendirme yaklaşımı sunarak doktorların doğum öncesi bakıma yaklaşımını kökten değiştirdi. Ancak, bu yöntemler değerli bilgiler sağlasa da genellikle düşük duyarlılık ve özgüllük karakterize edildikleri için önemli oranda yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlara yol açmıştır [4].

NIPT'nin 2012 yılında kullanıma sunulması, prenatal tanıda yeni bir dönemin habercisi olmuştur. Bu yaklaşım, öncelikle maternal plazmada dolaşan cfDNA'nın analiz edilebilmesiyle sağlanmıştır. cfDNA'nın tanımlanması, daha sonraki çalışmalarda maternal kanda fetal genetik materyalin varlığının doğrulanmasıyla prenatal tanı test seçeneklerinin önünü açmıştır. NIPT, geleneksel tarama yöntemlerine kıyasla yaygın anöploidiler için belirgin şekilde iyileştirilmiş duyarlılık ve özgüllük göstererek doğum öncesi bakıma dönüştürücü bir yaklaşım olarak kendini kanıtlamıştır [4,5].

Özellikle 2000'li yılların başından itibaren yaygınlık kazanan yeni nesil dizileme (next-generation sequencing; NGS) sistemleri, NIPT için de sıkça tercih edilen yöntemlerden olmuştur. Nitekim NGS, gebe bireyin kanından izole edilen cfDNA'nın hedefli ya da total taranması ve farklı stratejilerle (örneğin metilasyon profillemesi, Y kromozomu deteksiyonu ve polimorfik bölgelerinin diskriminasyonu) maternal-fetal ayrımı ile fetüse ait tüm kromozomal anomalileri tarama potansiyeline sahipti. Ancak, tek nokta varyantlarının raslantısal tespit edilebilirliği, NGS'in sadece sayısal kromozomal anomalilerin ve büyük delesyon/duplikasyonların tespitinde kullanılabilmesi ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, nadir görülen sayısal kromozomal anomalilerin fetal gelişimin erken evrelerinde ölümle sonuçlanması, NGS ile bu tür klinik vakaların validasyonunu kısıtlamıştır. Bu nedenle NGS, NIPT'de kromozom 13, 18 ve 21 ve sayısal cinsiyet kromozomlarının varyasyonlarının tespiti ile sınırlanmıştır. Bu kromozomlar için sistemin doğruluğu >%95 iken diğer nadir değişimler için doğruluk oranı oldukça düşük yüzdeli olabilmektedir. NGS, dizileme sonrası elde edilen veride, tek bir bütün olarak dizilenen ve ampikon olarak adlandırılan fragmanların sayılması ve değişim görülmeyen kromozomlara ve çalışma içerisindeki diğer örneklerle korelasyonu ile sayısal varyasyon tayini yapabilmektedir. Ancak kantifikasyon, kapalı informatik araçlarla yapılmaktadır ve biyolojik verinin yurtdışına çıkışını zorunlu kılmaktadır. Aynı zamanda, sistem bileşenlerinin pahalı olması, maliyetlerin azaltılması amacıyla örneklerin bekletilmesi, NGS sistemlerinin yaygınlığının göreceli olarak az olması ve uzman çalışan gereksinimi, sistemin diğer dezavantajları arasındadır.

NGS'e alternatif olarak, moleküler biyolojideki amplifikasyon teknolojilerindeki gelişmeler, özellikle kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative real-time polymerase chain reaction; qRT-PCR) tekniklerinin entegrasyonu yoluyla NIPT'nin işlevsel hale getirilmesini kolaylaştırmıştır. Bu gelişmelere rağmen, mevcut düşük miktardaki fetal genetik materyali yeterli şekilde ölçmek veya analiz etmek için etkili bir yöntem olmaksızın, karışık maternal-fetal cfDNA'ların analiz edilmesinde zorluklar devam etmiştir. Bu noktada, qRT-PCR'a kıyasla yeni bir teknoloji olan dijital PCR (dPCR), NIPT'nin doğruluğunu ve

güvenilirliğini artıran yenilikçi bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır [6]. dPCR mekanizmasının merkezinde, numuneyi, her biri ideal olarak hedef DNA dizisinin bir veya sıfır kopyasını içeren çok sayıda bireysel reaksiyona bölme kavramı yer alır. Bu bölme, spesifik olmayan amplifikasyonla ilişkili arka plan gürültüsünü önemli ölçüde azaltır ve nadir genetik varyantların tespit edilme olasılığını artırır. Bu nedenle dPCR, qRT-PCR'de yaygın olarak kullanılan standart eğrilere ihtiyaç duymadan DNA konsantrasyonlarının mutlak kantifikasyonunu sağlama yeteneğiyle karakterize edilir. Bu hassasiyet, fetal DNA konsantrasyonlarındaki küçük farklılıkların bile tanınması için önemli öneme sahip olabileceği doğum öncesi test senaryolarında özellikle avantajlıdır [7].

dPCR'nin hassasiyeti, maternal plazmadan ekstrakte edilen cfDNA kullanılarak fetüslerde anöploidilerin veya spesifik genetik bozuklukların varlığının değerlendirilmesinde önemli olan düşük frekanslı alellerin tespitini sağlar. Klasik qRT-PCR yöntemleri genellikle amplifikasyon döngülerine bağlı olmalarıyla sınırlıdır; bu nedenle, karmaşık biyolojik numunelerde düşük orandaki hedeflerin tespiti, potansiyel amplifikasyon yanlılığı ve tutarsız sonuçlar nedeniyle zorluklar yaratır. Buna karşılık, dPCR'nin bölümlendirme stratejisinden kaynaklanan doğal sağlamlığı, örnek girdilerinin heterojenliğiyle ilgili sorunları etkili bir şekilde azaltabileceği ve sonuç olarak fetal genetik materyalin daha güvenilir değerlendirilmesine yol açabileceği anlamına gelir. Ayrıca, dPCR ile ilişkili teknik gelişmeler, tespit sınırlarının iyileştirilmesini mümkün kılmıştır. Son çalışmalar, dPCR'nin Down sendromu gibi durumların erken teşhisi için gerekli olan %1'in altındaki hassasiyet eşiklerine ulaşabileceğini göstermektedir. Hassasiyeti artırarak dPCR, NIPT'nin klinik faydasını artırarak erken müdahalelere ve genetik anomali riski altında olduğu tespit edilen gebeliklerin kişiselleştirilmiş takibine olanak tanır. Bu tür gelişmeler yalnızca daha bilinçli klinik kararları desteklemekle kalmaz, aynı zamanda anne ve fetüs sağlığı sonuçlarını da önemli ölçüde etkileyebilir[7].

dPCR analizlerindeki en önemli gelişmelerden biri, maternal plazmada birden fazla cfDNA hedef dizisinin eş zamanlı olarak kantifikasyonuna olanak tanıyan multipleksleme yeteneklerinin geliştirilmesidir. Bu gelişme, trizomi 21, 18 ve 13 gibi çeşitli anöploidilerin eş zamanlı değerlendirilmesini kolaylaştırarak, tarama sürecini kolaylaştırır. Birden fazla hedefi eş zamanlı olarak analiz edebilme yeteneği, prenatal tanı testleriyle ilişkili maliyet ve süreyi önemli ölçüde azaltırken, aynı zamanda gebelere uygulanan testlerin verimini de artırır. Ayrıca, dPCR sistemlerindeki gelişmiş sinyal tespiti ve analitik hassasiyet, maternal DNA arka planında düşük frekanslı fetal alellerin tespit edilmesini sağlamıştır. Yeni dPCR platformları, daha az miktarda cfDNA'nın tespitine olanak tanıyan gelişmiş floresan teknolojilerini entegre etmiştir. Bu yetenek, özellikle düşük fetal fraksiyonlu vakalarda, önceki test yöntemlerinin güvenilir sonuçlar üretmekte zorlanabileceği durumlarda değerlidir. Son çalışmalarda belirtildiği gibi, dPCR'nin düşük fetal fraksiyonlarda anöploidileri tespit etme yeteneğinin artması, özellikle yüksek riskli popülasyonlarda tarama sonuçlarını iyileştirme potansiyeline sahiptir. dPCR teknolojisindeki bir diğer önemli gelişme, test tasarımındaki uyarlanabilirliktir. Prob kimyası ve amplifikasyon tekniklerinin sürekli gelişimi, belirli genetik koşullara göre uyarlanmış testlerin özelleştirilmesine olanak tanır. Bu esneklik, geleneksel trizomilerin ötesine geçen kapsamlı taramalara olan talebin artması göz önüne alındığında hayati önem taşımaktadır. Örneğin, dPCR testleri mikrodilesyonları veya duplikasyonları hedefleyecek şekilde giderek daha fazla geliştirilmekte ve böylece invaziv olmayan bir şekilde izlenebilen durum yelpazesi genişlemektedir. Bu tür gelişmeler, erken müdahaleleri ve potansiyel ebeveynler için bilinçli karar vermeyi kolaylaştırdıkları için NIPT'nin genel doğruluğuna katkıda bulunmaktadır [2].

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yenidoğanın sağkalımı ve olası anomalilerin doğum öncesi bilinmesi, ebeveynin ilgili duruma psikolojik, sosyokültürel ve ekonomik olarak hazırlanması, ulusal gelişmişlik düzeyinin iyileştirilmesi ve sonraki jenerasyonun garanti altına alınması açısından önem arz etmektedir [8]. Bu nedenle, ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede, ultrason anomalisi ve/veya fetüs sağlığına doğrudan etki edebilecek ileri anne yaşı gibi sebeplerle, çeşitli yaklaşımlarla fetal tarama gerçekleştirilebilmektedir [9]. Bu yaklaşımların temelini, biyokimyasal metotların yetersizliği durumunda, gebelik haftası 8-13 arasında değişecek şekilde fetüse ait hücrelerin toplanmasına imkan veren ve amniyosentez (AS) ve koryonik villus biyopsisi (Chorionic Villus Sampling (CVS)) olarak ikiye ayrılan metotlar oluşturmaktadır. Bu metotlarla, invaziv olarak fetüse ya da fetal-maternal bariyere direkt müdahale sonrası elde edilen fetal materyal, çeşitli yöntemlerle moleküler genetik açısından analiz edilebilmekte ve fetal tanı konabilmektedir. Ancak bu yaklaşımlar, girişimsel özellikleri nedeniyle düşük bir ihtimalle de olsa fetal kayıplara ve maternal strese neden olabilmektedir [10]. Bu nedenlerle, bu yaklaşımlara alternatif sunulması zorunludur.

Sağlık ve mühendislik alanlarındaki teknolojik ilerlemeler, AS ve CVS gibi invaziv yöntemlere alternatif ve invaziv olmayan bir yöntemin geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Gebeliğin belirli haftalarında, fetüse ait fragmente genomun, annenin periferik sisteminde gezindiğinin görülmesi [11], invaziv olmayan prenatal test (non-invasive prenatal testing; NIPT) olarak adlandırılan yeni bir yöntem için öncü olmuştur. NIPT, annenin periferik kanından, fetüse direkt müdahale olmaksızın, fetüse ait fragmente fetal DNA'nın çeşitli yöntemlerle izolasyonuna ve yeni nesil dizileme olarak adlandırılan ileri teknolojik sistemlerle bu DNA'nın karakterizasyonuna işaret eden bir yöntemdir [12]. Sonraki çalışmalar, izole DNA'da, maternal hücre ölümleri sonrası hücre dışında ve periferik sistemde bulunan maternal DNA'nın da yer aldığını göstermiştir; ancak, fetüse ait cfDNA yüzdesinin çeşitli yaklaşımlarla belirlenebiliyor olması ve biyoinformatik araçlarla bu yüzde üzerinden fetüse ait DNA'nın istatistiksel olarak taranabilmesi NIPT'nin yaygın bir şekilde kullanılabilmesini sağlamıştır [13]. NIPT ile teorik olarak tüm kromozomların sayısal ve yapısal olarak taranması mümkün olsa da fetal genomda hayatla bağdaşmayan kromozomal anomalilerin klinik örneklerinin olmaması bu teorinin gerçekleşmesindeki temel engeldir. Ancak, bu sistem özellikle kromozom 13, 18 ve 21 ve cinsiyet kromozomlarının yüksek doğrulukla (>%95) sayısal olarak taranmasına olanak sağlamaktadır [14]. Dahası, NIPT, klinikte bir ön tarama olarak gerçekleştirilmektedir ve herhangi bir anomali durumunda, AS ve CVS ile sonucun doğrulanması önerilir (van Opstal ve Srebniak, 2016) ve bu sistemle olası tüm riskler minimize edilmiş olunur.

NIPT, yeni nesil dizileme (next-generation sequencing; NGS) platformları ile cfDNA'nın dizilenmesi ve biyoinformatik analizi ile rutin olarak gerçekleştirilmektedir [15]. NGS, aynı anda onlarca örneğin dizilenmesini sağlayan ve sıkça tercih edilen bir metottur [16]. Ancak bu platformlar, pahalı cihazlar ve kitler ve uzman çalışan gerektirmektedir. Dahası, bu sistemlerle maliyetlerin azaltılması için örneklerin toplu halde çalışılması gerekliliği ve neticesinde ebeveynlerin geç bilgilendirilmesi, olası anomaliler durumunda, gebeliğin sonlandırılabilmesi için gerekli yasal sürenin aşılmasına neden olabilmektedir [17]. Ek olarak, NIPT'de veri, üretici firmanın inisiyatifinde analiz edilmektedir. NIPT analizi için farklı yazılımlar olsa da üretici firmalar, kendi cihazları ile elde edilen verileri yine kendi programları ile analiz etmektedir. Bu durum, biyolojik verinin ülke dışına çıkması gibi bir riski beraberinde getirmektedir. Olası anomalilerin üretici firmaların veri bankasında biriktiriliyor olması, üreticinin kendi ürünün daha da geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Böylece, ulusal ve uluslararası pazarda, rekabet koşullarının ortadan kalkabileceği ve tekelleşebileceği düşünülmektedir. Bu nedenlerle, NIPT'de, NGS'nin dezavantajlarını aşabilecek ve genetik verinin ülke sınırları içerisinde kalmasını sağlayacak alternatiflerin geliştirilmesi şarttır.

NIPT'de, NGS'ye alternatif olarak, PZR temelli sistemler farklı araştırma gruplarınca denenmiştir. Buna göre, kromozomal anomalilerin sınırlı sayıda ve yüksek hata payıyla PZR temelli yaklaşımlarla tespit edilebileceği gösterilmiştir [18]; ancak, bu sistemler araştırma odaklı geliştirilebilmiş ve ticarileşmemiştir. PZR sistemleri içerisinde, ticarileşmiş ancak yaygınlaşmamış en güçlü aday, NIPT'de dPCR'nin kullanılması olmuştur [19].

dPCR, RT-PCR'nin prensibine dayanan bir sistemdir. RT-PCR'ye kıyasla dPCR, izolat içerisindeki tüm nükleik asitlerin, mikoreaksiyonlar ile aynı anda ve yüksek hassasiyette tespitine izin verir [20]. Öyle ki

dPCR ile yoğun bir örnek içerisindeki sınırlı kopyada hedef bölgenin tespiti mümkündür [21]. Nitekim, dPCR farklı amaçlarla moleküler tanıda tercih edilmiştir [19]. Özellikle kanserde, NIPT'ye benzer şekilde, kanser hücrelerinden açığa çıkan cfDNA'nın dPCR ile taranması, hastalığın moleküler tanısında ve tedavi cevabının takibinde kritik bir uygulama olmuştur [22]. Benzer şekilde, fetal cfDNA'nın dPCR ile taranmasına yönelik kit, Amerikan menşeli bir firma tarafından geliştirilmiştir ve valide edilmiştir [Atila Biosystems, ABD; 23]. Sistem, kromozom 13, 18 ve 21'i tek seferde tarayabilen ve cinsiyet kromozomlarını tarayabilen ve fetal fraksiyon hesaplayabilen olmak üzere iki farklı kit halinde geliştirilmiştir (Atila Biosystems, ABD). dPCR cihazlarının ve kitlerinin NGS sistemlerine göre düşük maliyeti, sistemin uygulanabilirliği ve verinin internet dahi gerektirmeden analiz edilebilirliği, NIPT'de dPCR'nin en önemli avantajları arasındadır.

dPCR'nin NIPT'nin performans değerlerini daha da iyileştirdiğini ve yaygın anöploidiler için %99'dan fazla duyarlılık ve %100'e yakın özgüllük gösterdiği belirlenmiştir. Bu rakamlar, dPCR'nin yalnızca mevcut tarama protokollerini iyileştirme değil, aynı zamanda erken prenatal tanı için yeni ölçütler oluşturma potansiyelini de vurgulamaktadır [3].

dPCR teknolojisindeki gelişmeler yalnızca çeşitli kromozomal anomalilerin tespit yeteneklerini güçlendirmekle kalmamış, aynı zamanda NIPT'nin genel verimliliğini ve doğruluğunu da artırmıştır. Araştırmacılar bu teknikleri geliştirmeye devam ettikçe, klinik uygulama üzerindeki etkileri derinleşmektedir ve anne-fetüs sağlığı sonuçlarında iyileşme ve NIPT'nin gebelik bakımının standart bir bileşeni olarak daha geniş bir şekilde uygulanması potansiyeli vaat etmektedir. dPCR'nin sürekli iyileştirilmesi, daha güvenli ve daha etkili doğum öncesi test metodolojileri arayışında temel bir ilerlemeyi temsil etmektedir. dPCR teknolojisindeki son gelişmeler, özellikle fetal anöploidilerin tespitinde NIPT'nin doğruluğunu önemli ölçüde artırmıştır. dPCR'nin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, kapsamlı çalışmalarla doğrulanmış ve maternal dolaşımdaki düşük fetal DNA seviyelerini tespit etme ve maternal ve fetal genetik materyali olağanüstü bir doğrulukla ayırt etme yeteneği gösterilmiştir [24].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 . Preklinik Çalışmalar

Projenin ilk yılını kapsayan bu iş paketinde, önerilen dPCR sisteminin geliştirilmesi amacıyla, primer-prob setleri dizayn edilmiştir ve klinik örnekler kullanılmadan RT-PCR ile dizayn setler optimize edilmiştir.

3.1.1. Primer-prob setlerinin dizaynı için intrakromozomal segmental duplikasyonların tespiti

Literatürde, sunulan projenin hedefine benzer şekilde segmental duplikasyonların NIPT’de dPCR ile değerlendirilmesi üzerine farklı çalışmalar mevcuttur [2,25]. Ancak bu çalışmalarda takip edilen strateji dikkatlice incelendiğinde, araştırmacıların kromozomlar arasında (interkromozomal) duplike olan segmentleri hedefledikleri görülmektedir. Bu durum, geliştirilen sistemin hassasiyetinin düşmesine ve öngörülemez moleküler hatalara yol açabilmektedir. Bu bakımdan, sunulan projede, bu çalışmalarda raporlanan tekrar bölgeleri yerine primer analizlerle, her bir kromozomun kendi içinde (intrakromozomal) duplike olan segmentler hedeflenmiştir.

Kromozomal segmental duplikasyonlar, Washington Üniversitesi’nin Segmental Duplications adlı veri tabanından (<https://eelegacy.gs.washington.edu/humanparalogy/build37/build37.html>) indirilmiştir. Elde edilen bu dosyada (Şekil 1), duplikasyonun hangi kromozomlar arasında olduğu, duplikasyon boyutu, duplikasyonun kromozomun hangi lokus aralığında olduğu ve duplikasyonlar arası yanlış eşleşme (mismatch) değerleri gibi parametreler listelenmektedir. İlgi dosya, interkromozomal duplikasyonlara da yer vermiştir. Bu nedenle, sadece intrakromozomal duplikasyonları belirlemek adına Microsoft Excel üzerinde filtreleme gerçekleştirilmiştir. Buna göre, Şekil 1’de, kromozomların yer aldığı sütunlar (A ve G) aynı kromozoma sabitlenerek intrakromozomal duplikasyonlar elde edilmiştir. İnkromozomal duplikasyonlar, kromozom 1, 13, 18, 21, X ve Y için ayrı ayrı belirlenmiş ve kaydedilmiştir.

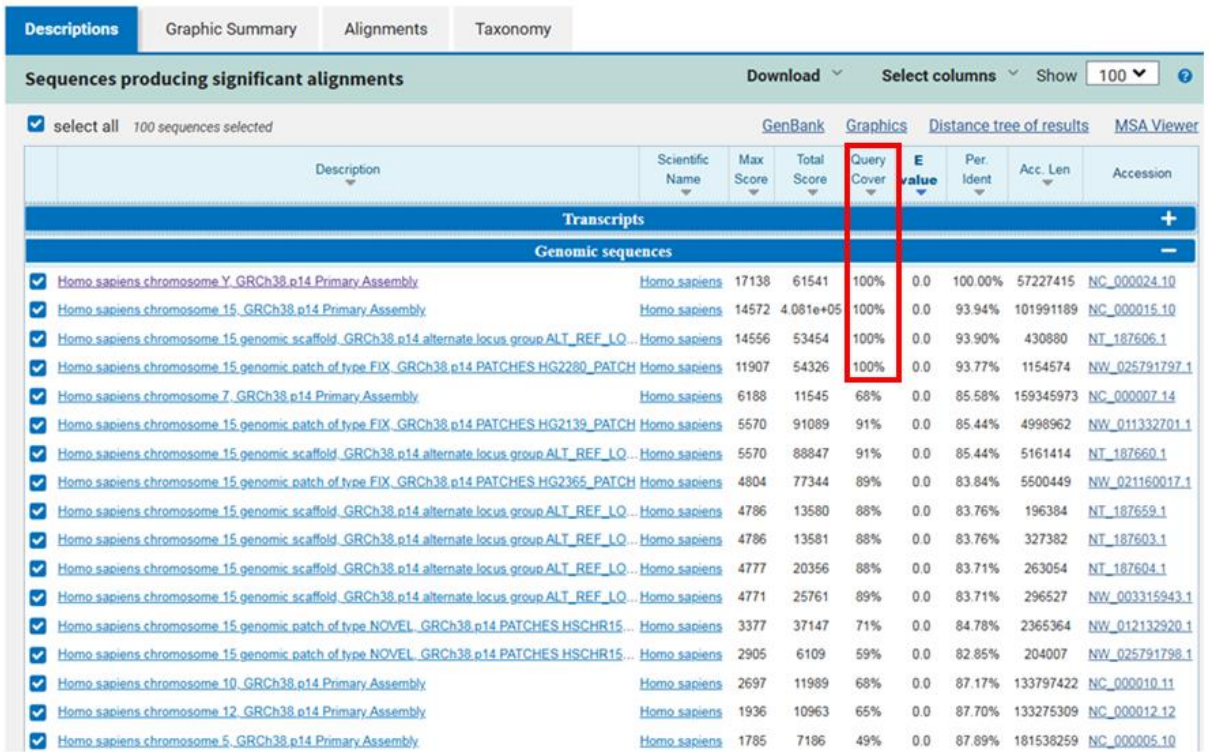
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
1	chrom	chromStart	chromEnd	name	score	strand	otherChro	otherStart	otherEnd	otherSize	uid	posBases	testResult	verdict	chits	ccov	alignfile	alignL	indelN
2	chr1	333676	463991	chr8:1873	0	-	chr8	18732	151012	132280	2248	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	133493	85
3	chr8	18732	151012	chr1:3336	0	-	chr1	333676	463991	130315	2248	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	133493	85
4	chr1	464182	467098	chr8:1000	0	-	chr8	10000	12936	2936	2249	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	2937	5
5	chr8	10000	12936	chr1:4641	0	-	chr1	464182	467098	2916	2249	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	2937	5
6	chr1	464768	471368	chr8:1632	0	-	chr8	163249	169872	6623	2250	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	7449	29
7	chr8	163249	169872	chr1:4647	0	-	chr1	464768	471368	6600	2250	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	7449	29
8	chr1	521368	545057	chr8:2095	0	+	chr8	20959	44823	23864	2251	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	24300	30
9	chr8	20959	44823	chr1:5213	0	+	chr1	521368	545057	23869	2251	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	24300	30
10	chr1	545800	656032	chr8:4448	0	+	chr8	44482	151012	106530	2252	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	106890	84
11	chr8	44482	151012	chr1:5458	0	+	chr1	545800	656032	110232	2252	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	106890	84
12	chr1	711411	712554	chr8:1507	0	+	chr8	150767	151930	1163	2253	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	1164	3
13	chr8	150767	151930	chr1:7114	0	+	chr1	711411	712554	1143	2253	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	1164	3
14	chr1	727046	752672	chr8:3742	0	-	chr8	374226	399944	25718	2254	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	25815	54
15	chr8	374226	399944	chr1:7270	0	-	chr1	727046	752672	25626	2254	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	25815	54
16	chr1	752747	756780	chr8:3244	0	-	chr8	324401	328397	3996	2255	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	4036	5
17	chr8	324401	328397	chr1:7527	0	-	chr1	752747	756780	4033	2255	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	4036	5
18	chr1	759039	764791	chr8:1804	0	-	chr8	180496	186239	5743	2256	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	5758	9
19	chr8	180496	186239	chr1:7590	0	-	chr1	759039	764791	5752	2256	0	N/A	N/A	N/A	N/A	align_bot	5758	9

Şekil 1. Washington Üniversitesi’nin Segmental Duplications adlı veri tabanından indirilen dosyanın genel özelliklerini gösteren şekil.

3.1.2. İntrakromozomal segmental duplikasyonlara yönelik primer-prob setlerinin dizaynı

Bu adımda, bir önceki süreçte belirlenen intrakromozomal duplikasyonları PCR ile amplifiye etmeye yönelik primer-prob setleri dizayn edilmek amaçlanmıştır. Dizayn işlemi, diğer kromozomlara göre çok kısa ve dizaynı kolay olan kromozom Y üzerinden aşağıda detaylandırılmıştır.

Segmental Duplikasyon veri tabanına göre kromozom Y üzerinde 506 satırlık intrakromozomal duplikasyon bilgisine ulaşılmıştır. Bu satırlar, duplikasyon boyutu uzun olacak şekilde rastgele taranmıştır. Seçilen duplikasyonda lokus bilgisi Genome Data Viewer (NCBI, ABD; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv>) aracında GRCh37 referans insan genomu kullanılarak taranmıştır. Bu aracın bir özelliği sayesinde, ilgi lokus aralığında kalan bölgeler FASTA formatında indirilmiştir. Elde edilen segmental sekanslar, Nucleotide BLAST (NCBI, ABD; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) aracı kullanılarak insan referans genomuna hizalanması (alignment) kontrol edilmiştir. Bu sayede, her ne kadar ön filtrasyon ile interkromozomal duplikasyonlar elenmeye çalışılsa da olası sekans benzerliği ile farklı kromozomların hedeflenip hedeflenmediği kontrol edilmiştir. BLAST işlemi sırasında sekans benzerliği, biyoinformatik araçtaki “olası tüm benzer sekansları göster (optimize for somewhat similar sequences; blastn) opsiyonu ile test edilmiştir. İşlem sonunda, interkromozomal duplikasyon olasılığı manuel olarak gözden geçirilmiştir. Örneğin, bir intrakromozomal duplikasyon olarak listelenen ChrY: 27641987-27651489 dizisi BLAST yapılmıştır ve elde edilen sonuç, kromozom Y’ye ait sekansın aynı zamanda kromozom 15’te de tekrarlandığı göstermiştir (Şekil 2). Bu durumda, seçilen duplikasyon yerine başka bir bölge seçilmiştir.



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Transcripts								
Genomic sequences								
✓ Homo sapiens chromosome Y GRCh38.p14 Primary Assembly	Homo sapiens	17138	61541	100%	0.0	100.00%	57227415	NC_000024.10
✓ Homo sapiens chromosome 15 GRCh38.p14 Primary Assembly	Homo sapiens	14572	4.081e+05	100%	0.0	93.94%	101991189	NC_000015.10
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic scaffold GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LO	Homo sapiens	14556	53454	100%	0.0	93.90%	430880	NT_187606.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic patch of type FIX GRCh38.p14 PATCHES HG2280_PATCH	Homo sapiens	11907	54326	100%	0.0	93.77%	1154574	NW_025791797.1
✓ Homo sapiens chromosome 7 GRCh38.p14 Primary Assembly	Homo sapiens	6188	11545	68%	0.0	85.58%	159345973	NC_000007.14
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic patch of type FIX GRCh38.p14 PATCHES HG2139_PATCH	Homo sapiens	5570	91089	91%	0.0	85.44%	4998962	NW_011332701.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic scaffold GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LO	Homo sapiens	5570	88847	91%	0.0	85.44%	5161414	NT_187660.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic patch of type FIX GRCh38.p14 PATCHES HG2365_PATCH	Homo sapiens	4804	77344	89%	0.0	83.84%	5500449	NW_021160017.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic scaffold GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LO	Homo sapiens	4786	13580	88%	0.0	83.76%	196384	NT_187659.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic scaffold GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LO	Homo sapiens	4786	13581	88%	0.0	83.76%	327382	NT_187603.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic scaffold GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LO	Homo sapiens	4777	20356	88%	0.0	83.71%	263054	NT_187604.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic scaffold GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LO	Homo sapiens	4771	25761	89%	0.0	83.71%	296527	NW_003315943.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic patch of type NOVEL GRCh38.p14 PATCHES HSCHR15	Homo sapiens	3377	37147	71%	0.0	84.78%	2365364	NW_012132920.1
✓ Homo sapiens chromosome 15 genomic patch of type NOVEL GRCh38.p14 PATCHES HSCHR15	Homo sapiens	2905	6109	59%	0.0	82.85%	204007	NW_025791798.1
✓ Homo sapiens chromosome 10 GRCh38.p14 Primary Assembly	Homo sapiens	2697	11989	68%	0.0	87.17%	133797422	NC_000010.11
✓ Homo sapiens chromosome 12 GRCh38.p14 Primary Assembly	Homo sapiens	1936	10963	65%	0.0	87.70%	133275309	NC_000012.12
✓ Homo sapiens chromosome 5 GRCh38.p14 Primary Assembly	Homo sapiens	1785	7186	49%	0.0	87.89%	181538259	NC_000005.10

Şekil 2. Kromozom Y için seçilen duplike bölgenin BLAST’lanması sonrası interkromozomal duplikasyonu gösteren şekil.

Rastgele intrakromozomal duplikasyon seçimi, en ideal bölge seçilene kadar gerçekleştirilmiştir. Kromozom Y için en ideal duplikasyon bölgesi belirlenene kadar işleme devam edilmiştir ve sadece hedef kromozom üzerindeki yoğunlaşan bir bölge bulunarak primer-prob dizaynına geçilmiştir. Kromozom 1, kontrol için kullanıldığından, diğer hedef kromozomlarla eşleşmediği sürece sadece bu kromozom için interkromozomal segmental duplikasyonlara izin verilmiştir.

Primer dizaynı, filtrasyonlar sonrası elde edilen intrakromozomal segmental duplikasyon sekansları ile Primer-BLAST aracı (NCBI, ABD; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, cfDNA boyutu olan ~160 baz çifti (base pair; bp) [26] baz alınarak, primerlerin amplifiye edeceği amplikon boyutu 90-150 bp arasında seçilmiştir. Primer erime sıcaklığı (melting temperature; Tm) öncelikli olarak 60°C şeklinde belirlenmiştir. Primer-BLAST ile önerilen ve Tm değerleri optimal (her ikisi için de 60°C ya da birbirlerine çok yakın) primer çifti tercih edilmiştir.

Y kromozomu için seçilen ilk primer çifti aşağıda verilmiştir.

CAAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAGTGA
CTTTCAGTTAAATGTACAAAGAAATAAGATGACCAAATTAATGATAGAG
ACCTCAGTAGGTACAGCAGCAA

FP: CAAACAAACAAGGTGTAGGCTG
RP: TTGCTGCTGTACCTACTGAGG
Tm: 60°C
Ürün boyutu: 126 bp

Primer çiftleri belirlendikten sonra, amplifiye olacak bölgeden prob dizaynına geçilmiştir. Prob üzerindeki floresan boyalar, kromozoma spesifik olacak şekilde dizayn edilmiştir. Sistem dizaynında, otozomal kromozomların (kromozom 1 varlığında 13, 18 ve 21) ve cinsiyet kromozomlarının (kromozom 1 varlığında X ve Y) farklı tüplerde taranması planlanmıştır. Bu amaçla, kromozom 1'de Cy5, kromozom 13'te HEX, kromozom 18'de ROX ve kromozom 21'de FAM tercih edilmiştir. Kromozom X'te HEX ve kromozom Y'de ise FAM seçilmiştir. Prob dizaynı sırasında, seçilen sekans Tm'sinin 65°C ve sekansın iki primerden birine yakın olmasına dikkat edilmiştir. Buna göre kromozom Y için seçilen prob aşağıda verilmiştir.

Prob: [FAM] TAGGGAACACATCTGAGAAGTGACTTTCAG [Q]

Bu ilk tasarı ile intrakromozomal segmental duplikasyonlarda, duplikasyon arası olası baz farklılıkları gözden geçirilmiş ve dejenere primer-prob seti dizaynı aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, öncelikle ilgili amplikon dizisi BLAST edilmiştir. Kromozom Y için hedeflenen amplikon dizisi, kromozom içerisinde 14 farklı bölgede tekrar etmektedir. BLAST sonucunda, her ne kadar baz benzerliği yüksek oranda olsa da bölgeler arasında eşleşmeyen bazların olduğu görülmüştür (Şekil 3).

Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value ▾ Next ▾ Previous ▾ Descriptions

Homo sapiens chromosome Y, GRCh38.p14 Primary Assembly

Sequence ID: [NC_000024.10](#) Length: 57227415 Number of Matches: 14

Range 1: 17846078 to 17848203 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▴ Previous Match

Score	Expect	Identical	Gaps	Strand
228 bits(252)	6e-58	126/126(100%)	0/126(0%)	Plus/Minus

Features: [20048 bp at 5' side: neuron-4, \(joined bottom\)](#)
[20064 bp at 3' side: testis-specific chromosome protein v.2](#)

Query 1	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	60
Sbjct 17846283	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	17846344
Query 61	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	120
Sbjct 17846343	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	17846394
Query 121	CAGCAA	126
Sbjct 17846393	CAGCAA	17846398

Range 2: 18059808 to 18059933 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▴ Previous Match ▴ First Match

Score	Expect	Identical	Gaps	Strand
228 bits(252)	6e-58	126/126(100%)	0/126(0%)	Plus/Plus

Features: [20048 bp at 5' side: neuron-4, \(joined bottom\)](#)
[20064 bp at 3' side: testis-specific chromosome protein v.2](#)

Query 1	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	60
Sbjct 18059808	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	18059867
Query 61	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	120
Sbjct 18059868	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	18059927
Query 121	CAGCAA	126
Sbjct 18059928	CAGCAA	18059933

Range 3: 24015728 to 24015853 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▴ Previous Match ▴ First Match

Score	Expect	Identical	Gaps	Strand
201 bits(222)	9e-50	120/126(95%)	0/126(0%)	Plus/Minus

Features: [20048 bp at 5' side: neuron-4, \(joined bottom\)](#)
[20064 bp at 3' side: testis-specific chromosome protein v.2](#)

Query 1	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	60
Sbjct 24015728	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	24015794
Query 61	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	120
Sbjct 24015793	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	24015734
Query 121	CAGCAA	126
Sbjct 24015733	CAGCAA	24015728

Range 4: 25654284 to 25654409 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▴ Previous Match ▴ First Match

Score	Expect	Identical	Gaps	Strand
201 bits(222)	9e-50	120/126(95%)	0/126(0%)	Plus/Plus

Features: [20048 bp at 5' side: neuron-4, \(joined bottom\)](#)
[20064 bp at 3' side: testis-specific chromosome protein v.2](#)

Query 1	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	60
Sbjct 25654284	CAACAAACAAGGTGTAGGCTGAGAAAAATTTAGGGAACACATCTGAGAAATGACTTTTCA	25654343
Query 61	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	120
Sbjct 25654344	GTTAAAAATGACAAAGAAATAGATGACCAAAATTAATGATAGAGACCTCAGTAGGTACAG	25654403
Query 121	CAGCAA	126
Sbjct 25654404	CAGCAA	25654409

Şekil 3. Kromozom Y için seçilen hedef sekansın, bölgeler arasında baz farklılığını gösteren BLAST sonucu.

Duplike sekansın bölgeler arasında minimal düzeyde farklılık göstermesi, primerler ve prob için sekansların dejenere hazırlanmasını ve bu sayede olası bağlanma sorunlarının önceden engellenmesini zorunlu kılmıştır. Bu nedenle, primer ve prob dizileri, bir önceki adımdaki BLAST sonucu içerisinde manuel olarak aranmıştır. Primerin diğer duplikasyon bölgesine bağlanabilmesini sağlamak amacıyla eşleşmeyen ilgili bazlar alternatifler olarak dejenere olarak dizayn edilmiştir.

3.1.3. Primer-prob setlerinin optimizasyonu

Projenin bu döneminde son olarak, dizayn edilen dejenere primer-prob setleri, referans genomik DNA ve cfDNA ile RT-PCR yardımıyla optimize edilmeye çalışılmıştır.

RT-PCR, yerli bir üreticinin (ZipPrime Biyoteknoloji) prob master miksi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle tüm primer-prob setleri ayrı ayrı (monopleks) denenmiş ve çalışabilirlikleri gösterilmiştir. Monopleks çalışabilirliği kanıtlanan setlerle dupleks ve mütipleks denemeler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar öncelikle ticari referans insan genomik DNA'sı (Agilent Inc., ABD) ile yürütülmüştür. Kullanılan reaksiyon bileşenleri Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. RT-PCR bileşenleri, konsantrasyonları ve hacimleri.

Bileşen	Hacim
2X Prob Master Miks	10 µl
FP (10 µM)	1 µl
RP (10 µM)	1 µl
Prob (10 µM)	0,5 µl
DNA (20 ng/µl)	5 µl
Moleküler saflıkta su	2,5 µl

RT-PCR için kullanılan termal profil, farklı denemeler sonrası optimize edilmiş ve Tablo 2'de verilmiştir. RT-PCR, BioRad CFX 96 (BioRad, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, amplifikasyon eğrilerinin varlığı ve rölatif floresans biriminin kalitatif kontrolü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. RT-PCR için termal profil.

Sıcaklık	Amaç	Süre	
95°C	Başlangıç denatürasyonu	5 dk	
95°C	Döngü denatürasyonu	10 sn	35 döngü
58°C	Bağlanma, uzama ve sinyal eldesi	30 sn	

Monopleks ilk denemeler sonucu elde edilen sonuçlara göre, kullanılan primerlerin ve problemlerin konsantrasyonları revize edilmiştir ve setler iki havuza ayrılmıştır: Havuz 1) Kromozom 1, 13 ve 21 ve Havuz 2) Kromozom 1, X ve Y. Havuzlama işlemi sonrası elde edilen amplifikasyon eğrilerine göre primerlerin ve problemlerin konsantrasyonları tekrar revize edilmiştir ve denemelere devam edilmiştir.

Referans insan DNA'sı ile gerçekleştirilen çalışmalar sonrası havuzlanarak optimize edilen primer-prob setleri ticari cfDNA ile de test edilerek preklinal çalışmalar tamamlanmıştır.

3.1.4. Dijital PCR çalışmaları

RT-PCR’da denemeler sonrası, dPCR ile denemeler gerçekleştirilmiştir. dPCR çalışmaları, Stilla Naica System, Sapphire Chip ve Naica Multiplex PCR Mix (Stilla, Fransa) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda, 5X PCR miksten 4 µl ve final olarak optimize edilen primer konsantrasyonları kullanılmıştır ve reaksiyon hacmi 20 µl’ye çekilmiştir. RT-PCR’de olduğu gibi dPCR’de de havuzlama yapılmıştır. Reaksiyon işlemi için tercih edilen termal profil Tablo 3’de sunulmuştur. Çalışmada tek örnek, 4 replika halinde reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon sonrası elde edilen veriler, Crystal Miner (Stilla, Fransa) programı aracılığıyla görselleştirilmiştir.

Tablo 3. dPCR için kullanılan termal profil.

Sıcaklık	Amaç	Süre	
40°C	Ayrışma (Partition)	12 dk	
95°C	Başlangıç denatürasyonu	10 dk	
95°C	Denatürasyon	15 sn	10 döngü
58°C	Bağlanma	3 dk	
95°C	Denatürasyon	15 sn	40 döngü
62°C	Bağlanma	1 dk	
25°C'ye düşüş	Salınım	33 dk	

dPCR çalışmaları öncelikle ticari cfDNA (Trizomi 21; fetal fraksiyon: %10) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir primer-prob havuzu için örnekler 4’lü replikalar halinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların optimizasyonu ve kıyaslanması için ticari bir dPCR kiti (iSAFE™ Non-Invasive Prenatal Test Assay; REF: NIPT-100; Atila Biosystems, ABD) de çalışmaya dahil edilmiştir. Bu ticari kit için boya-hedef eşleşmesi Tablo 4’te sunulmuştur.

Tablo 4. iSAFE™ Non-Invasive Prenatal Test Assay kitinin floresan boya-hedef eşleşmeleri.

Boya	Hedef
Mavi	Kromozom 18
Teal	Kromozom 21
Yeşil	Kromozom 1
Sarı	Fetal hedef
Kırmızı	Kromozom 13
Infrared	Kromozom Y

İlk denemeler ve optimizasyon çalışmaları sonrası, klinik çalışmalara geçilmiştir.

3.2. Klinik Çalışmalar

Projenin ikinci yılını kapsayan bu iş paketinde, gebe bireylerden elde edilen cfDNA'larda hedef kromozomların, kontrol ticari kit varlığında geliştirilen sistemle taranması gerçekleştirilmiştir. Klinik çalışmalar öncesi Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan etik onay (Karar Tarihi: 23.01.2023; Karar No: 81) alınmıştır.

3.2.1. Katılımcıların belirlenmesi

Çalışmaya 25 gebe birey retrospektif bir şekilde dahil edilmiştir. Buna göre, rutin NIPT işlemi için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran gebe bireylerden, NGS için alınan kanlardan izole edilen ve olası bir işlem tekrarı için -20°C'de saklanan plazma örnekleri kullanılmıştır. İşlem öncesi, bireylerden yazılı ve sözlü onam alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen örneklerin NGS sonuçları bilinmektedir. Buna göre, 25 örnekten 12'si 46, XX, 12'si 46, XY ve bir tanesi 47, XX (Trizomi 21; fetal fraksiyon: 4,75)'tir.

3.2.2. cfDNA izolasyonu

Plazma örneklerinden cfDNA izolasyonu, cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, İsviçre) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Protokolde kısaca 200 µl plazma örneği plazma üzerine 250 µl proteinaz K ve 2 ml kit bileşeni olan DNA PBB eklenmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda, 500 µl izopropanol eklenmiştir ve iyice karıştırılmıştır. Karışım, kit bileşeni olan HPEA FT kolonlarına yüklenmiştir ve kolonlar 4000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası, HPEA FT bir koleksiyon tüpüne alınmıştır ve filtre tüpü (FT), önce kit bileşeni olan 500 µl wash buffer I ve sonra 500 µl wash buffer II ile 8000 g'de 1 dk santrifügasyon sayesinde yıkanmıştır. FT, 16000 g'de 1 dk boş santrifüjlenerek alkol tamamen uzaklaştırılmıştır. Son olarak, filtre üzerine 20 µl elüsyon tamponu eklenmiştir ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. FT'ler 8000 g'de 1 dk santrifüjlenerek cfDNA'lar elüt edilmiştir.

İzole cfDNA'ların konsantrasyonları Qubit 4.0 (Thermo Scientific, ABD) ile florometrik olarak belirlenmiştir. Boyut analizleri ise 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, ABD) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

İzole cfDNA'lerde kromozomal anomaliler, geliştirilen kit ve kıyaslama amacıyla dPCR temelli ticari NIPT kiti ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Preklinik Çalışmalar

Preklinik çalışmalarda, hedef kromozomları (kromozom 1, 13, 18 ve 21 ve cinsiyet kromozomları X ve Y) çoğaltabilecek şekilde intrakromozomal segmental duplikasyon bölgeleri belirlenmiştir. Belirlenen lokuslar Tablo 5’te sunulmuştur.

Tablo 5. İntrakromozomal segmental duplikasyon lokusları (GRCh37).

Kromozom	Lokus	Tekrar Sayısı
1	Chr1:235525-267707	6
13	Chr13:42002718-42005879	4
18	Chr18:112546-131692	4
21	Chr21:11097541-11104547	4
X	ChrX:52825890- 52827501	4
Y	ChrY: 20215332-20223161	4

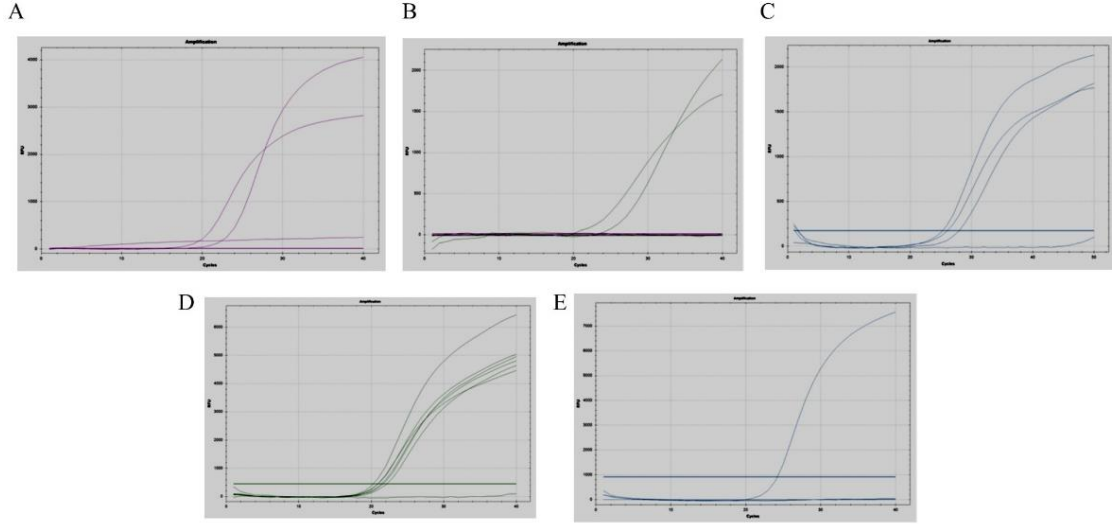
Hedef kromozomlar için intrakromozomal segmental duplikasyonlar belirlendikten sonra dejenere primer-prob setler dizayn edilmiştir. Dizayn setler Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 6. Eşleşmeyen baz analizi sonrası dizayn edilen dejenere primer-prob setleri.

Kromozom	Primer/Prob	Sekans (5’-3’)
1	FP	ACAGCTGACTCATGTTGGGG
	RP	ACAACCAGTGTAGAGCAGAGT
	Prob	[Cy5] TGAGCACCTGGTGTGAGA[T/G]CAAG [Q]
13	FP	G[A/G]T[T/C]CTTTCT[G/A]TACTG[C/T]CA[T/C]CCTC
	RP	TGT[G/A]TA[-/C]CCCC[A/T]GCGAC[T/G][G/T]TAG
	Prob	[HEX] TTCACACCTGG[G/A]ACA[T/C]TATCTTCCAT[C/A]T [Q]
18	FP	[C/T][A/G]CC[T/C]GT[A/G]A[C/T]CCCA[G/A][C/A]ACTT
	RP	GA[G/A]AC[G/T]GGGTTT[C/T][A/G/T]CCATGT
	Prob	[ROX] G[G/T][T/C][C/T][G/A/T][A/C][A/G]G[C/T][A/G]GG[T/C]GGATCAC[C/T]TG [Q]
21	FP	CAG[A/G][T/C][G/A]G[T/A]C[C/T]C[C/T][A/G][C/T][A/G][A/G]CACA
	RP	[T/C][G/A][T/C]GG[C/A]AATCCT[-/C][-/T]CTGA[C/G]CA[C/T]
	Prob	[FAM] GCA[A/T]GGGCC[G/C][G/A]G[T/G]AACCA[T/C]GGTG [Q]
X	FP	AAC[T/C][G/A]ATCTGC[T/C][G/-][C/-][C/-]GCTCC
	RP	CTGTGGGGAAGGGCTTGA[C/A][A/G]
	Prob	[HEX] CTCCATGTTTAATGTTTCATGGTTCACATGGA [Q]
Y	FP	CAAA[C/A]AAACAAGGTG[T/C]AGGCTG
	RP	TTG[C/G]TGC[T/A]GTA[C/T]CTACTGAGG
	Prob	[FAM] TAGG[G/T]AACACATCTGAGAAGTGACTTTTCAG [Q]

Monopleks olarak denenen primer-prob setleri ile elde edilen sonuçlar Şekil 4’te sunulmuştur. Gerçekleştirilen çalışmalar ile kromozom 18 haricindeki tüm hedef kromozomlar amplifiye edilebilmiştir. Kromozom 18 için primer-prob setinin, konsantrasyonlarının ve PCR termal profilinin değiştirilmesine rağmen bir pozitif bir sonuç elde edilememiştir. Kromozom 18’i hedefleyen prob, ROX işaretlidir. Yerli prob

üreticisinin, FAM, HEX ve Cy5 haricinde ürettiği problarda sorun fark edilmiştir. Bu nedenle, kromozom 18 çalışmadan çıkartılmıştır.



Şekil 4. Monopleks olarak her bir primer-prob seti için ayrı ayrı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu. A. Kromozom 1 (CY5), B. Kromozom 13 (HEX), C. Kromozom 21 (FAM), D. Kromozom X (HEX) ve E. Kromozom Y (FAM) için dizayn edilen primer-prob setleri ile iki farklı referans insan genomu (kadın ve erkek) kullanılarak elde edilen amplifikasyon eğrileri.

Monopleks denemeler sonrası, ilk belirlenen konsantrasyonlarla (Tablo 1), mütipleks RT-PCR denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ilk sonuçlara göre havuzlardaki döngü eşiği (cycle threshold; CT) değerleri göz önüne alınarak primer-prob setlerinin konsantrasyonları revize edilmiştir. Buradaki ana hedef, Ct değerlerinin üç boya için de birbirlerine yakın olması sağlamaktır. Buna göre, her bir primer-prob havuzu için oluşturulan reaksiyon miksi içerikleri Tablo 7 ve 8’de sunulmuştur. Bu protokoller ile gerçekleştirilen mütipleks çalışmalar ile optimal (Ct değerleri birbirlerine yakın) amplifikasyon eğrileri elde edilebilmiştir.

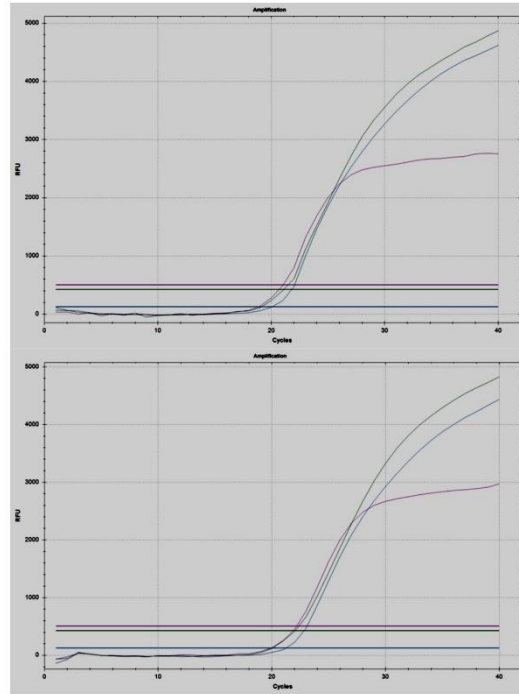
Tablo 7. Kromozom 1, 13 ve 21’i hedefleyen havuz için revize edilen reaksiyon miksi içeriği.

Bileşen	Hacim (µl)
Reaksiyon matarmiksi	10
Kromozom 1 FP (10 µM)	0,5
Kromozom 1 RP (10 µM)	0,5
Kromozom 1 Prob (10 µM)	0,2
Kromozom 13 FP (10 µM)	0,8
Kromozom 13 RP-1 (10 µM)	0,8
Kromozom 13 Prob (10 µM)	0,4
Kromozom 21 FP (10 µM)	0,8
Kromozom 21 RP-1 (10 µM)	0,8
Kromozom 21 RP-2 (10 µM)	0,8
Kromozom 21 RP-3 (10 µM)	0,8
Kromozom 21 RP-4 (10 µM)	0,8
Kromozom 21 Prob (10 µM)	0,5
DNA (1-4 ng/µl)	5
Steril su	1,5

Tablo 8. Kromozom 1, X ve Y'yi hedefleyen havuz için revize edilen reaksiyon miksi içeriği.

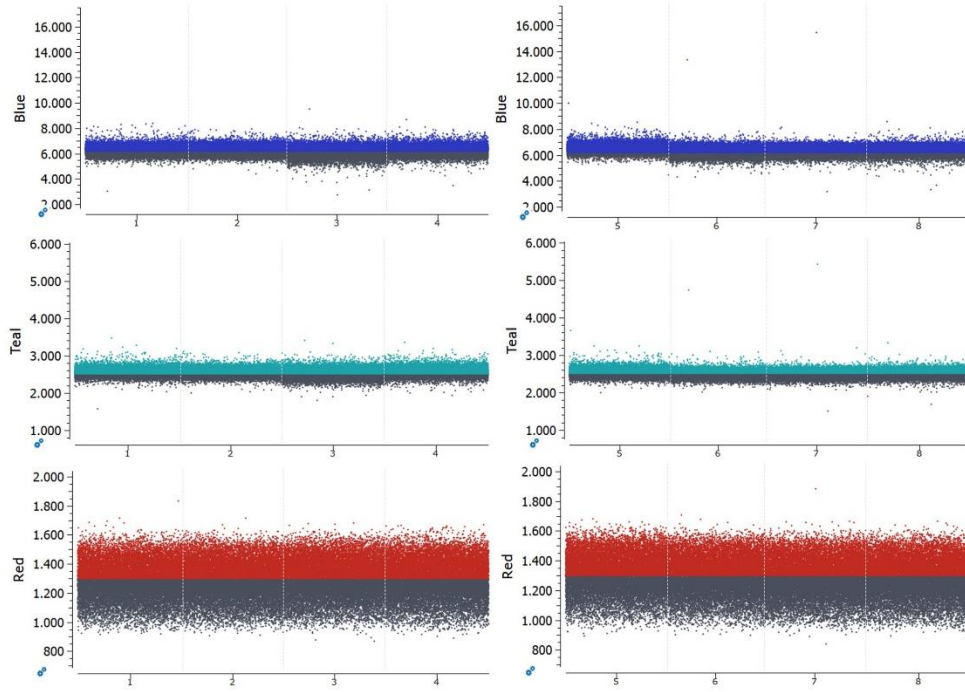
Bileşen	Hacim (µl)
Reaksiyon matermiksi	10
Kromozom 1 FP (10 µM)	0,5
Kromozom 1 RP (10 µM)	0,5
Kromozom 1 Prob (10 µM)	0,2
Kromozom X FP-1 (10 µM)	0,8
Kromozom X FP-2 (10 µM)	0,8
Kromozom X FP-3 (10 µM)	0,4
Kromozom X RP (10 µM)	0,8
Kromozom X Prob (10 µM)	0,5
Kromozom Y FP (10 µM)	1,0
Kromozom Y RP (10 µM)	1,0
Kromozom Y Prob (10 µM)	0,5
DNA (1-4 ng/µl)	5
Steril su	1,8

Multipleks RT-PCR'ın referans insan genomu ile optimizasyonu sonrası, ticari cfDNA ile de yukarıda verilen içerikler kullanılarak RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen primer-prob mikslерinin cfDNA ile de çalışabilirliğini kanıtlamıştır (Şekil 5).

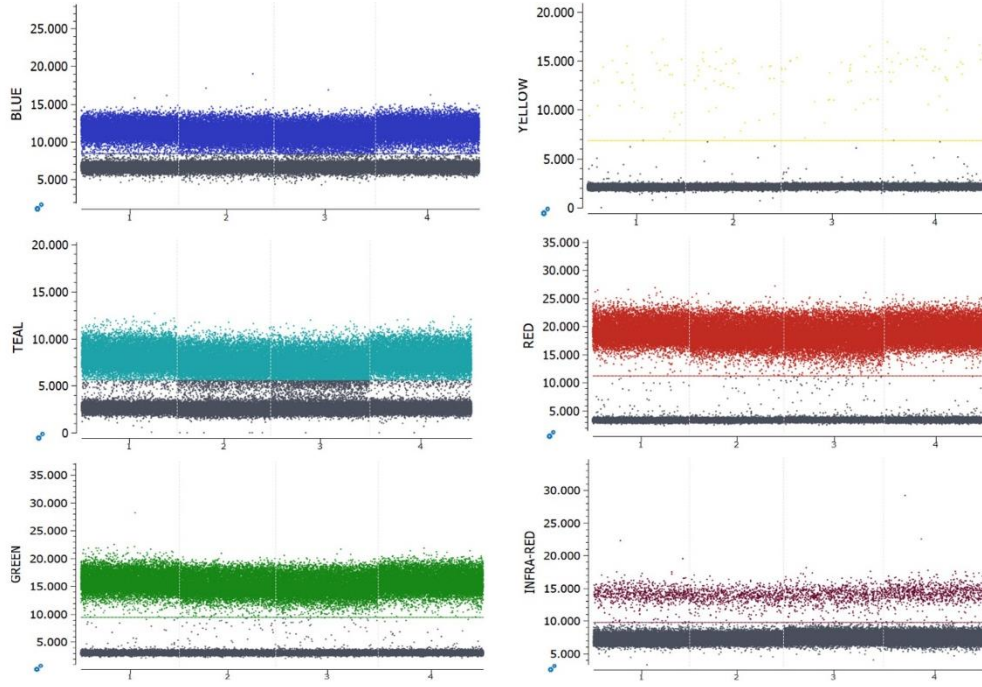


Şekil 5. Múltipleks RT-PCR ile elde edilen optimal amplifikasyon eğrileri. Üst: Primer-prob havuzu I (Kromozom 1: Cy5, 13: HEX ve 21: FAM) ve Alt: Primer-prob havuzu II (Kromozom 1: Cy5, X: HEX ve Y: FAM). Materyal: Referans cfDNA.

RT-PCR işleminin her iki primer havuzu ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin görülmesi ile klinik çalışmalar öncesi geliştirilen sistem ve ticari kit ile bir referans cfDNA (Trizomi 21; fetal fraksiyon: %10) kullanılarak öncü bir dPCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kalitatif olarak değerlendirilmiştir ve geliştirilen sistemin sonuçlarının (Şekil 6) ticari kitinkiler (Şekil 7) ile korele olduğu görülmüştür.



Şekil 6. Geliştirilen sistem ile referans cfDNA kullanılarak gerçekleştirilen dPCR sonrası elde edilen floresans dağılımı. X eksen: Damlacık (droplet) İndeksi ve Y eksen: Floresans. Sol kolon; Mavi (FAM): Kromozom 21, Teal (HEX): Kromozom 13 ve Kırmızı (Cy5): Kromozom 1 ve Sağ kolon; Mavi (FAM): Kromozom Y, Teal (HEX): Kromozom X ve Kırmızı (Cy5): Kromozom 1. cfDNA materyal cinsiyeti: Erkek.



Şekil 7. Ticari NIPT kiti ve referans cfDNA materyali kullanılarak gerçekleştirilen dPCR sonrası elde edilen floresans dağılımı. X eksen: Droplet İndeksi ve Y eksen: Floresans. Mavi: Kromozom 18, Teal: Kromozom 21, Yeşil Kromozom 1, Sarı: Fetal hedef, Kırmızı: Kromozom 13 ve İnfrared: Kromozom Y. cfDNA materyal cinsiyeti: Erkek.

Kantifikasyon analizi için normal olduğu bilinen bir örneğe ihtiyaç duyulduğundan bu adım “Klinik çalışmalar” kısmında sunulmuştur.

4.1.1. Klinik çalışmalar

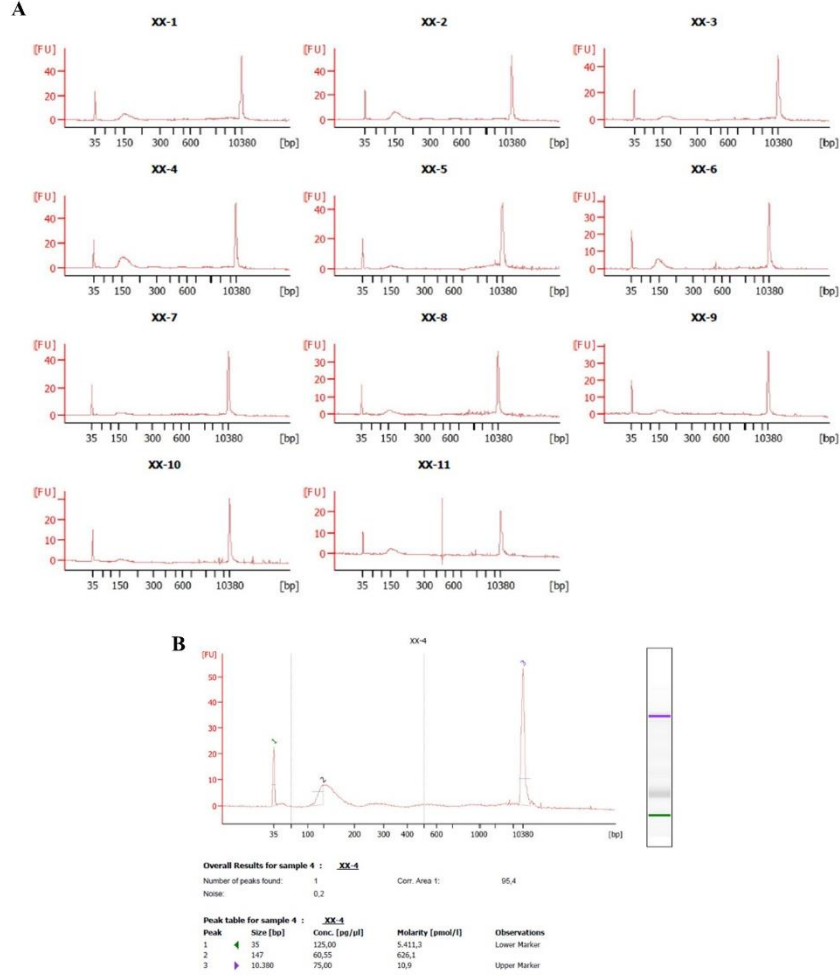
Çalışmaya, 25 örnek retrospektif olarak dahil edilmiştir. Bu örneklerden birinde NGS ile trizomi 21 tespit edilmiştir. Kalan 24 örnek, cinsiyet açısından yarı yarıya dağılmak üzere normal kromozom sayısına sahiptir.

Çalışma amacıyla klinik tanı amacıyla gebe bireylerin periferik venöz kanından ayrıştırılan plazma örnekleri kullanılmıştır. cfDNA izolasyonu sonrası örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir ve bu değerler Tablo 9’da sunulmuştur. Kullanılan plazma ile izole edilen cfDNA miktarlarının göreceli olarak düşük olduğu görülmüştür.

Tablo 9. İzole cfDNA konsantrasyonları.

Örnek	20 µl final hacimdeki miktar (ng)
1	3,63
2	4,73
3	2,38
4	5,45
5	1,55
6	3,58
7	2,18
8	2,445
9	3,16
10	0,49
11	4,68
12	3,36
13	4,82
14	5,34
15	1,25
16	1,13
17	4,01
18	2,17
19	3,05
20	4,13
21	2,00
22	5,87
23	2,93
24	1,98
25	6,70

Konsantrasyon bilgisine ek olarak, izole cfDNA'ların boyut analizi de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, tüm izolatların yaklaşık 150 bp olduğunu göstermiştir (Şekil 8).



Şekil 8. İzole cfDNA’ların boyut analizi. A. 11 örnek için analiz sonucu ve B. Bir hasta için detaylı boyut analizi görseli.

Analizler sonrasında, cfDNA konsantrasyonları düşük bulunmuş olsa da boyutlarının optimal olması nedeniyle dPCR çalışmalarına devam edilmiştir.

Klinik çalışmalar öncesi, kromozom kopya sayısının sayısal olarak analizi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, dörtlü replika halinde çalışılan anomalili (Trizomi 21) cfDNA materyalinin, Cystal Miner programı ile verilen total ve pozitif droplet sayıları (bir örnek sonuç Şekil 9’da paylaşılmıştır), normal olduğu bilinen bir örneğin sonuçlarına korele edilmiştir. Literatürde her ne kadar pozitif droplet sayısının, dPCR sonuçlarının doğrudan kantifikasyonu için kullanılabileceği belirtilse de [21] kopya sayısı değişimi ve dolayısıyla pozitif droplet sayısı minimal olacağından, RT-PCR için geçerli olan ve korelasyona dayanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [27] formülü tercih edilmiştir.

Chamber Name	Chamber Context	Nb Droplets	Blue Channel			Teal Channel			Channel		
			Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos
1. S-0742550-9-A1_Sample1		22560	1	1117	11323	1	1160	11622	1	1156	11594
2. S-0742550-9-B1_Sample2		22133	1	1122	11143	1	1113	11081	1	1190	11596
3. S-0742550-9-C1_Sample3		23579	1	1094	11664	1	1061	11415	1	1169	12205
4. S-0742550-9-D1_Sample4		24091	1	1122	12127	1	1165	12441	1	1173	12503
			Yellow Channel			Red Channel			Infra-Red Channel		
			Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos
			1	2,35	33	1	1144	11511	1	53	733
			1	2,54	35	1	1174	11496	1	53,7	729
			1	2,11	31	1	1195	12389	1	52,7	762
			1	2,33	35	1	1184	12581	1	58,8	867

Şekil 9. dPCR sonrası sayısal olarak elde edilen temsili sonuçlar. Materyal: Referans cfDNA; Kit: Ticari dPCR NIPT kiti.

Sayısal hesaplar için önerilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (dPCR için droplet sayısı) yaklaşımında, her örnek özelinde internal kromozom (kromozom 1) ve total droplet sayısı kullanılarak normalize edilmiştir. Daha sonra elde edilen değerler, birbirleri içerisinde korele edilmiştir. Örnek bir hesaplama, normal örnekle gerçekleştirilen bir çalışma eşliğinde (Şekil 10) aşağıda sunulmuştur.

Chamber Name	Chamber Context	Nb Droplets	Blue Channel			Teal Channel			Channel		
			Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos
1. S-0742369-7-A3_Sample9		25236	1	1134	12794	1	1132	12780	1	1153	12946
2. S-0742369-7-B3_Sample1		21585	1	1198	11365	1	1192	11324	1	1200	11375
3. S-0742369-7-C3_Sample1		21112	1	1177	10979	1	1216	11228	1	1225	11283
4. S-0742369-7-D3_Sample1		19789	1	1158	10182	1	1241	10667	1	1241	10664
			Yellow Channel			Red Channel			Infra-Red Channel		
			Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos	Dilution	C (cp/uL)	Nb Pos
			1	2,99	47	1	1132	12785	1	0,83	13
			1	3,94	53	1	1226	11540	1	1,04	14
			1	3,88	51	1	1225	11279	1	1,37	18
			1	2,84	35	1	1240	10660	1	1,86	23

Şekil 10. dPCR sonrası sayısal olarak elde edilen temsili sonuçlar. Materyal: Normal fetal cfDNA; Kit: Ticari dPCR NIPT kiti.

Çalışma grubu: Referans cfDNA materyali (47, XY; trizomi 21; fetal fraksiyon: %10; Şekil 9)

Kontrol grubu: Normal karyotipe (46, XX; fetal fraksiyon: %4,97) sahip olduğu NGS ile bilinen örnek (Şekil 10).

Çalışma grubu için;

$$N_{total} = \text{Çalışma grubu } N_{total} = (22560 + 22133 + 23579 + 24091) / 4 = 20090,75$$

$$N_{poz_teal} = \text{Çalışma grubu-Kromozom 21(Teal) } N_{poz} = (11622 + 11081 + 11415 + 12441) / 4 = 11639,75$$

$$N_{poz_mavi} = \text{Çalışma grubu-Kromozom 13(Mavi) } N_{poz} = (11323 + 11143 + 11664 + 12127) / 4 = 11564,25$$

$$N_{poz_yeşil} = \text{Çalışma grubu-İnternal(Yeşil) } N_{poz} = (11594 + 11596 + 12205 + 12503) / 4 = 11974,5$$

$$(N_{poz_teal}) - (N_{poz_yeşil}) = 11639,75 - 11974,5 = -334,75$$

$$(N_{poz_mavi}) - (N_{poz_yeşil}) = 11564,25 - 11974,5 = -410,25$$

$$A = [(N_{poz_teal}) - (N_{poz_yeşil})] / N_{total} = -334,75 / 20090,75 = -0,017766855$$

$$B = [(N_{poz_mavi}) - (N_{poz_yeşil})] / N_{total} = -410,25 / 20090,75 = -0,014497147$$

Kontrol grubu için;

$$N_{total} = \text{Kontrol grubu } N_{total} = (25236 + 21585 + 21112 + 19789) / 4 = 21930,5$$

$$N_{poz_teal} = \text{Kontrol grubu-Kromozom 21(Teal) } N_{poz} = (12780 + 11324 + 11228 + 10667) / 4 = 11499,75$$

$$N_{poz_mavi} = \text{Kontrol grubu-Kromozom 13(Mavi) } N_{poz} = (11323 + 11143 + 11664 + 12127) / 4 = 11330$$

$$N_{poz_yeşil} = \text{Kontrol grubu-İnternal(Yeşil) } N_{poz} = (12946 + 11375 + 11283 + 10664) / 4 = 11567$$

$$(N_{poz_teal}) - (N_{poz_yeşil}) = 11499,75 - 11567 = -67,25$$

$$(N_{poz_mavi}) - (N_{poz_yeşil}) = 11330 - 11567 = -237$$

$$C = [(N_{poz_teal}) - (N_{poz_yeşil})] / N_{total} = -67,25 / 21930,5 = -0,003066506$$

$$D = [(N_{poz_mavi}) - (N_{poz_yeşil})] / N_{total} = -237 / 21930,5 = -0,010806867$$

$$\text{Rölatif (Trizomi21/Normal) kromozom 21 kopya sayısı} = 2 \times 2^{-(A-C)} = 2 \times 2^{-(-0,011430642)} = 2,015909176$$

$$\text{Rölatif (Trizomi21/Normal) kromozom 13 kopya sayısı} = 2 \times 2^{-(B-D)} = 2 \times 2^{-(-0,006959988)} = 2,009671903$$

Yukarıda ticari NIPT kiti ile gerçekleştirilen hesaplamalar, üretici firma ile paylaşılmıştır ve hesaplamaların doğruluğu teyit edilmiştir. Buna göre, %10 fetal fraksiyon ile kromozom kopya sayısında virgülden sonra üçüncü rakamın değişimi ile trizomi tanısının konulduğu beyan edilmiştir. Bu hassasiyet, her ne kadar replikalı çalışma ile yakalanabilecek olsa da tarafımızca manipülasyona açık şekilde yorumlanmıştır.

Ticari kitle izlenen bu metodolojinin aynısı, proje kapsamında geliştirilen sistemle de izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, örnek fetal fraksiyon yüzdesine bağlı değişkenlik göstermiştir. Klinik 25 örnek için ticari kit ve proje kapsamında geliştirilen kitle elde edilen sonuçlar Tablo 10'da sunulmuştur. Geliştirilen sistemle elde

edilen sonuçlar, 4 yanlış pozitif ve tek pozitif hasta için yanlış negatiflikle sonuçlanmıştır. Ancak aynı hastalar özelinde olmasa bile yüksek yanlış pozitiflik oranına ticari dPCR NIPT kitinde de rastlanmıştır.

Tablo 10. Klinik örnekler için kıyaslamalı olarak gerçekleştirilen tarama sonuçları.

Örnek	Karyotip (NGS ile)	Fetal fraksiyon % (NGS ile)	Atila sonucu	Geliştirilen sistem sonucu
1	46, XX	1,17	Normal	Monozomi 13?
2	46, XX	5,67	Normal	Normal
3	46, XX	2,83	Normal	Trizomi X?
4	46, XY	4,77	Normal	Normal
5	46, XX	5,44	Trizomi 18?	Normal
6	46, XY	6,02	Normal	Normal
7	46, XY	4,00	Normal	Normal
8	46, XX	3,56	Normal	Normal
9	47, XX	7,82	Trizomi 21	Normal?
10	46, XY	4,02	Normal	Normal
11	46, XX	3,98	Normal	Normal
12	46, XY	1,77	Trizomi 13?	Trizomi 21?
13	46, XX	3,44	Normal	Normal
14	46, XX	8,21	Normal	Normal
15	46, XY	4,11	Normal	Normal
16	46, XY	6,17	Normal	Normal
17	46, XY	5,85	Normal	Normal
18	46, XX	4,19	Normal	Normal
19	46, XX	6,33	Normal	Normal
20	46, XX	2,16	Normal	Trizomi 21?
21	46, XY	3,90	Normal	Normal
22	46, XY	2,76	Normal	Normal
23	46, XY	5,01	Normal	Normal
24	46, XY	3,14	Normal	Normal
25	46, XX	5,93	Normal	Normal

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Sunulan proje, hedef kromozomlarda intrasegmental duplikasyonları hedefleyerek dPCR temelli yeni bir NIPT kiti geliştirmeyi ve muadil kit varlığında klinik validasyonu amaçlamıştır. Bu amaç doğrultusunda, kromozom 1 internal kontrol tutularak, kromozom 13, 21, X ve Y üzerinden intrasegmental duplikasyon bölgeleri belirlenmiştir; mütipleks çalışabilecek primer-prob setleri dizayn edilmiştir; setler referans genomik materyaller yardımıyla optimize edilmiştir ve gerçek klinik örneklerde validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Referans genomik ve cfDNA ile gerçekleştirilen çalışmalar, geliştirilen sistemin çalışabilirliği açısından umut vaat edici olsa da gerçek klinik örneklerle gerçekleştirilen çalışmalarda, özellikle fetal fraksiyonun düşük olduğu vakalarda yanlış pozitiflik oranlarının yüksek olduğu görülmüştür. Ancak, bu durumun ticari olarak mevcut olan kit için de geçerli olduğu fark edilmiştir.

NIPT, sosyoekonomik nedenlerle gebelik yaşının arttığı günümüz dünyasında kritik bir ilk aşama tarama testi rolünü üstlenmektedir. Ancak rutin uygulamalarda sıkça tercih edilen NGS metodu, NIPT'nin ulaşılabilirliğini maliyet ve zaman parametreleri özelinde kısıtlamaktadır. Bu durum, yüksek hassasiyetli deteksiyon olanağı sağlayan dPCR gibi metotların öneme işaret etmektedir. dPCR'nin önemli avantajlarından biri, DNA moleküllerinin mutlak niceliğini üretebilmesi ve fetal anöploidinin doğru tespiti için kritik öneme sahip bir hassasiyet seviyesi sağlamasıdır. Ayrıca, dPCR'nin standart eğrilere ihtiyaç duymadan hedef dizileri çoğaltma ve analiz etme yeteneği, sağlamlığını ve tekrarlanabilirliğini artırarak onu prenatal tanıda değerli bir araç haline getirir [24].

dPCR teknolojilerin NIPT için kullanılmasının ekonomik etkileri de önemli ölçüde farklılık göstermektedir. NGS platformlarının ilk kurulum ve işletme maliyetleri, örnek hazırlama ve veri işleme için gereken gelişmiş altyapı nedeniyle önemli olsa da yüksek verimli uygulamalarda test başına maliyet düşer. Buna karşılık, dPCR sistemlerinin uygulanması nispeten daha ucuzdur ve daha düşük ilk yatırım gerektirirken, özellikle yalnızca belirli anöploidi profillerinin gerekli olduğu durumlarda hedefli testlerde yüksek hassasiyet sağlar. Sonuç olarak, dPCR'nin klinik faydası, belirli testlerin gerekli olduğu durumlarda en üst düzeye çıkarılabilir ve kaynakların kısıtlı olduğu ortamlarda uygun maliyetli bir alternatif sunabilir [28].

Literatürde, dPCR temelli geliştirilen NIPT kitlerine sıklıkla rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda, hedef kromozomlar (özellikle kromozom 13, 18, 21, X ve Y) üzerindeki farklı lokusları hedefleyen primer-prob setleri dizayn edilmiştir ve klinik örneklerde bu setlerin performansları (duyarlılık ve spesifite) test edilmiştir. Bu çalışmalarda, dPCR'nin potansiyeline çokça vurgu yapılmıştır [29].

Sunulan çalışmada, tek set-çoklu bölge yaklaşımıyla intrakromozomal segmental duplikasyonlar hedeflenmiştir. Literatürde intrakromozomal segmental duplikasyonlar üzerinden dPCR NIPT kitleri geliştirildiği iddia edilse de yapılan incelemeler, bu çalışmalardaki primer-probların aslında interkromozomal olduğunu ve bu durumun bu denli hassas bir test için sorun yaratabileceğini göstermiştir [3].

Sunulan proje kapsamında iki farklı primer-prob havuzu şeklinde geliştirilen sistem, özellikle RT-PCR'de ideal bir potansiyel göstermiştir. Ancak, fetal cfDNA'daki sayısal anomalilerin RT-PCR ile tespiti mümkün değildir. dPCR ile gerçekleştirilen çalışmalar ise girdi konsantrasyonuna ve fetal fraksiyona bağlı olarak yanlış pozitiflik ve negatiflik oranının artacağına işaret etmektedir. Fetal fraksiyon, anne kanından izole edilen cfDNA'da fetüse ait genetik materyalin yüzdesini ifade eder ve genellikle %5 civarındadır [30]. Bu nedenle, tespit edilmeye çalışılan fetal anöploidilerde kantitatif olarak görülecek farklılık minimaldir. Bu durum, sadece dPCR'nin değil NIPT'de sıklıkla kullanılan NGS yaklaşımının da en önemli limitasyonudur [31]. Fetal fraksiyon, gebelik süresi uzadıkça artmaktadır; ancak artan gebelik süreleri, gebeliğin sonlanması açısından etik ve yasal sorunları beraberinde getirmektedir [32]. Buna ek olarak, cfDNA materyalini izole eden kit ve plazma saklama süreleri de cfDNA miktarlarını etkileyen parametreler arasındadır [33]. Çalışma kapsamında, retrospektif olarak değerlendirilen plazma örnekleri, düşük cfDNA konsantrasyonu ve artmış yanlış pozitiflik/negatiflik oranları ile ilişkili olabilir. Ancak, cfDNA materyalinin konsantrasyonunun optimal bir dengesinin olmaması, NIPT için hesaba katılması gereken hususlardandır. Nitekim, sadece geliştirilen kit değil ticari olarak mevcut olan kit de benzer yanlış negatiflik/pozitiflik oranları sergilemiştir. Bu durum, dPCR ya da benzeri yöntemlerde ya da rutinde sıkça tercih edilen NGS metodunda, fetal fraksiyonun önemine işaret etmektedir.

Proje kapsamında geliştirilen sistemin göreceli olarak düşük olan yanlış negatifliği, bir ilk basamak tarama yaklaşımı olarak düşünülebilecek NIPT için yine de umut vaat etmektedir. Genetik hastalıkların moleküler tanısı, daha kabul gören ve altın standart olarak görülen sistemlerle doğrulamayı zorunlu kılar. Önerilen sistemin daha da optimize edilmesi ve yanlış negatifliğin ortadan kaldırılması ile yanlış pozitiflik, sonraki doğrulama adımlarına yönlendirme ile ortadan kaldırılabilir. Böylece, tanı amacıyla başvuran birçok gebe bireyde dPCR, minimum maliyetle ilk basamak testi olarak önerilebilir. Yine de daha fazla katılımcı ile ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sunulan çalışma ile açığa çıkartılan sistem, dPCR temelli NIPT kiti olmasının yanı sıra özellikle yenidoğanda sayısal kromozomal anomalilerin taranmasında kullanılabilir. Bu durumda, periferik venöz kandan izole edilecek yoğun miktardaki genomik materyalle çalışmalar RT-PCR ve/veya dPCR ile gerçekleştirebilir ve yenidoğanda yaşamla bağdaşan sayısal kromozomal anomaliler tespit edilebilir. Bu çalışmaların yürütülmesine araştırma grubumuzca devam edilmektedir.

5.1. Öneriler

Girişimsel olmayan prenatal tanı testlerinin 2012 yılında kullanıma sunulması, prenatal tanıda yeni bir dönemin habercisi olmuştur. İlk başta 21. Kromozom, daha sonraki süreçte 13 ve 18. Kromozomlar daha sonra cinsiyet kromozomları eklenmiştir. Güncel olarak bu yöntemlerle 24 kromozoma ait 7-10 Mb düzeyde sonuç verilmesi çığır açıcı bir yöntemdir. Ancak bu yöntem genel toplum taramaları için maliyet etkin değildir. Bu projenin konusu olan dijital PCR ile 21,13 ve 18. kromozomlara ait sayısal anomalilerinin taranması ise hızlı ve düşük maliyetli tarama yapma imkanı vermekle beraber toplum taramalarında maliyet etkin bir yöntem olacağını düşünmekteyiz. Bu nedenle daha büyük vaka serilerinde bu yöntemin güvenilirliğinin gösterilmesini önermekteyiz.

Referanslar

- [1] Wang Y, Chu X, Chen X, Yin A, Yao Y, Wang L, Xu H, Liu F, Chen K, Wu Y. Non-invasive prenatal testing for fetal Ss, Kidd, and CTL2 blood group prediction by multiplex digital droplet PCR. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2023 Aug;14:20406207231179334.
- [2] Parsaei M, Dashtkoohi M, Salmani TA, Najafi MS, Haddadi M, Ghaemi M, Hantoushzadeh S. Potential efficacy of digital polymerase chain reaction for non-invasive prenatal screening of autosomal aneuploidies: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2024 Jul 11;24(1):472.
- [3] Guo Y, Charoenkwan P, Traisrisilp K, Piyamongkol W, Tongprasert F. Application of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT). *Biomolecules*. 2025 Mar 1;15(3):360.
- [4] Abedalthagafi M, Bawazeer S, Fawaz RI, Heritage AM, Alajaji NM, Fageih E. Non-invasive prenatal testing: a revolutionary journey in prenatal testing. *Frontiers in Medicine*. 2023 Nov 9;10:1265090.
- [5] Dondorp W, De Wert G, Bombard Y, Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, Chitty LS, Fellmann F, Forzano F, Hall A, Henneman L. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *European Journal of Human Genetics*. 2015 Oct;23(11):1438-50.
- [6] Nectoux J. Current, emerging, and future applications of digital PCR in non-invasive prenatal diagnosis. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2018 Apr;22(2):139-48.
- [7] Li YQ, Tan GJ, Zhou YQ. Digital PCR and its applications in noninvasive prenatal testing. *Briefings in functional genomics*. 2022 Sep;21(5):376-86.
- [8] Shiffman J. Issue attention in global health: the case of newborn survival. *Lancet*. 2010 Jun 5;375(9730):2045-9.
- [9] Erdem Y, Tekşen F. Genetic screening services provided in Turkey. *J Genet Couns*. 2013 Dec;22(6):858-64.
- [10] Klages, K., Kundu, S., Erlenwein, J., Elsaesser, M., Hillemanns, P., Scharf, A., & Staboulidou, I. Maternal anxiety and its correlation with pain experience during chorion villus sampling and amniocentesis. *Journal of Pain Research*, 2017;10, 591-600.
- [11] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997 Aug 16;350(9076):485-7.
- [12] Tamminga S, van Schendel RV, Rommers W, Bilardo CM, Pajkrt E, Dondorp WJ, van Maarle M, Cornel MC, Henneman L. Changing to NIPT as a first-tier screening test and future perspectives: opinions of health professionals. *Prenat Diagn*. 2015 Dec;35(13):1316-23.
- [13] van Beek DM, Straver R, Weiss MM, Boon EMJ, Huijsdens-van Amsterdam K, Oudejans CBM, Reinders MJT, Sistermans EA. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples. *Prenat Diagn*. 2017 Aug;37(8):769-773.
- [14] Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, Zhu Z, Lin M, Liu Q, Tian Z, Zhang H, Chen F, Lau TK, Zhao L, Yi X, Yin Y, Wang W. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 May;45(5):530-8.
- [15] Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, Balanarasimha M, Hollemon D, Sparks A, Nicolaides K, Musci TJ. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn*. 2015 Dec;35(12):1243-6.
- [16] Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet*. 2012 Jun;81(6):503-10.
- [17] Vigliar E, Malapelle U, de Luca C, Bellevicine C, Troncone G. Challenges and opportunities of next-generation sequencing: a cytopathologist's perspective. *Cytopathology*. 2015 Oct;26(5):271-83.
- [18] Kim SY, Lee SM, Kim SM, Kim BJ, Koo JN, Oh IH, Oh S, Park CW, Jun JK, Lim JH, Ryu HM, Park JS. Novel method of real-time PCR-based screening for common fetal trisomies. *BMC Med Genomics*. 2021 Jul 30;14(1):195.
- [19] Hou Y, Chen S, Zheng Y, Zheng X, Lin JM. Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023;158:116897
- [20] Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods* 2012;9, 541–544.
- [21] Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ, Foy CA. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*. 2011 Sep 1;83(17):6474-84.
- [22] Olmedillas-López S, Olivera-Salazar R, García-Arranz M, García-Olmo D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review. *Mol Diagn Ther*. 2022 Jan;26(1):61-87.
- [23] Haidong W, Zhijie Y, Picchiassi E, Tarquini F, Coata G, You W, Youxiang W, Yu C, Renzo GCD. Non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies using a new method based on digital droplet PCR and cell free fetal DNA. *medRxiv* 2020.12.19.20248553

- [24] Moufarrej MN, Bianchi DW, Shaw GM, Stevenson DK, Quake SR. Noninvasive prenatal testing using circulating DNA and RNA: advances, challenges, and possibilities. *Annual review of biomedical data science*. 2023 Aug 10;6(1):397-418.
- [25] Chen X, Li Y, Huang Q, Lin X, Wang X, Wang Y, et al. Segmental duplication as potential biomarkers for non-invasive prenatal testing of aneuploidies. *EBioMedicine*. 2021;70.
- [26] Shi H, Zhou Y, Jia E, Pan M, Bai Y, Ge Q. Bias in RNA-seq library preparation: Current challenges and solutions. *BioMed Research International* 2021: 6647597.
- [27] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8
- [28] Mittal AK, Shekhawat DS, Patel M, Singh P, Singh K. Economic implications of ddPCR and NGS-based noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy screening. *International Journal of Public Health*. 2024 Dec;13(4):1809-18.
- [29] D'Aversa E, Breveglieri G, Boutou E, Balassopoulou A, Voskaridou E, Pellegatti P, Guerra G, Scapoli C, Gambari R, Borgatti M. Droplet Digital PCR for Non-Invasive Prenatal Detection of Fetal Single-Gene Point Mutations in Maternal Plasma. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 4;23(5):2819.
- [30] Li Y, Zhang S, Snyder MP, Meador KJ. Precision medicine in women with epilepsy: The challenge, systematic review, and future direction. *Epilepsy Behav*. 2021 May;118:107928.
- [31] Boon EM, Faas BH. Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013 Jun;33(6):563-8.
- [32] Deng C, Liu J, Liu S, Liu H, Bai T, Jing X, Xia T, Liu Y, Cheng J, Wei X, Xing L, Luo Y, Zhou Q, Zhu Q, Liu S. Maternal and fetal factors influencing fetal fraction: A retrospective analysis of 153,306 pregnant women undergoing noninvasive prenatal screening. *Front Pediatr*. 2023 Apr 11;11:1066178.
- [33] Polatoglou E, Mayer Z, Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Isolation and Quantification of Plasma Cell-Free DNA Using Different Manual and Automated Methods. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Oct 20;12(10):2550.