

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**İMMÜN OLMAYAN HİDROPS FETALİS OLGULARINDA  
TÜM EKZOM DİZİLEME İLE ADAY GENLERİN TESPİTİ**

**DR. ARDA KEKİLLİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2021**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**İMMÜN OLMAYAN HİDROPS FETALİS OLGULARINDA  
TÜM EKZOM DİZİLEME İLE ADAY GENLERİN TESPİTİ**

**DR. ARDA KEKİLLİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI: PROF. DR AYFER ÜLGENALP**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                  |             |
|------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>TABLO LİSTESİ</b> .....                                       | <b>iv</b>   |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....                                       | <b>v</b>    |
| <b>KISALTMALAR</b> .....                                         | <b>vi</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....                                            | <b>viii</b> |
| <b>ÖZET</b> .....                                                | <b>ix</b>   |
| <b>SUMMARY</b> .....                                             | <b>xi</b>   |
| <b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....                                    | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                                   | <b>4</b>    |
| 2.1. Prenatal Tanı .....                                         | 4           |
| 2.2. Doğum Öncesi Tanı Endikasyonları .....                      | 5           |
| 2.2.1 İleri Anne Yaşı .....                                      | 5           |
| 2.2.2 Tarama Testlerinde Risk Artışı .....                       | 6           |
| 2.2.3 Fetal Yapısal Anomaliler .....                             | 7           |
| 2.3. Doğum Öncesi Tanı Yöntemleri .....                          | 9           |
| 2.3.1. Koryon Villüs Örnekleme .....                             | 9           |
| 2.3.2. Amniyosentez .....                                        | 10          |
| 2.3.3. Perkutan Umblikal Kord Kanı Örnekleme (Kordosentez) ..... | 11          |
| 2.4. Ense Kalınlığı Artışı ve Kistik Higdroma .....              | 12          |
| 2.4.1. Tanım ve Epidemiyoloji .....                              | 12          |
| 2.4.2. Genetik .....                                             | 13          |
| 2.4.3. Patogenez .....                                           | 15          |
| 2.4.3.1 Kardiyak Malformasyon ve Disfonksiyonlar .....           | 16          |
| 2.4.3.2. Baş ve Boyun Bölgesinde Venöz Konjesyon .....           | 18          |
| 2.4.3.3. Hücre Dışı Matriks Değişiklikleri .....                 | 19          |
| 2.4.3.4. Lenfatik Damar Hipoplazisi .....                        | 21          |
| 2.4.3.5. Konjenital Fetal Enfeksiyon .....                       | 23          |
| 2.5. Hidrops Fetalis .....                                       | 24          |
| 2.5.1 Tanım .....                                                | 24          |
| 2.5.2 Genetik .....                                              | 25          |

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.3 Patogenez.....                                                        | 27        |
| 2.6. Tüm Ekzom Dizileme.....                                                | 30        |
| 2.6.1. Prenatal Olgularda Tüm Ekzom Dizileme ile Tanı .....                 | 33        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER .....</b>                                          | <b>38</b> |
| 3.1 Hasta Seçimi.....                                                       | 38        |
| 3.2 Verilerin Toplanması.....                                               | 38        |
| 3.3 Genomik DNA İzolasyonu.....                                             | 39        |
| 3.3.1 Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....                          | 39        |
| 3.3.2 Koryon Villüs Materyalinden DNA İzolasyonu.....                       | 40        |
| 3.3.3 Amniyosentez Materyalinden DNA İzolasyonu.....                        | 41        |
| 3.3.4 Kordosentez Materyalinden DNA İzolasyonu.....                         | 41        |
| 3.4 Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi ..... | 42        |
| 3.5 Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metotları .....                   | 43        |
| 3.5.1 QF-PCR Analizi ile Hızlı Prenatal Test .....                          | 43        |
| 3.5.2 Kimerizm Analizi .....                                                | 44        |
| 3.5.3 Prenatal Örnek Karyotip Analizi .....                                 | 46        |
| 3.6 Alfa Talasemi Çoklu Ligasyonla Prob Amplifikasyon (MLPA) Tekniği .....  | 47        |
| 3.7 Tüm Ekzom Dizileme (WES) .....                                          | 50        |
| 3.7.1 WES Laboratuvar Aşamaları.....                                        | 51        |
| 3.7.2 WES Biyoinformatik Analizi .....                                      | 54        |
| 3.7.3 WES Verilerinin Klinik Analizi .....                                  | 54        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                     | <b>58</b> |
| 4.1 Tüm Ekzom Dizileme Bulguları .....                                      | 58        |
| 4.2 Olguların Klinik Özellikleri ve Ekzom Dizileme Sonuçları .....          | 61        |
| 4.2.1 Olgu I'e Ait Klinik Bulgular.....                                     | 61        |
| 4.2.2 Olgu II'ye Ait Klinik Bulgular .....                                  | 62        |
| 4.2.3 Olgu III'e Ait Klinik Bulgular.....                                   | 62        |
| 4.2.4 Olgu IV'e Ait Klinik Bulgular.....                                    | 62        |
| 4.2.5 Olgu V'e Ait Klinik Bulgular.....                                     | 63        |
| 4.2.6 Olgu VI'ya Ait Klinik Bulgular.....                                   | 63        |

|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                  | <b>81</b>  |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>                                          | <b>90</b>  |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                                 | <b>91</b>  |
| <b>8. EKLER.....</b>                                                      | <b>111</b> |
| 8.1 EK 1. Etik Kurul Onayı .....                                          | 111        |
| 8.2 EK 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu (Kişinin Kendisi İçin)..... | 113        |
| 8.3 EK 3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu (Fetal Örnek İçin) .....    | 114        |
| 8.4 EK 4. Veri Kayıt Formu .....                                          | 115        |



## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1.** İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) olgularında mutasyon tespit edilen literatürde bildirilmiş genler

**Tablo 2.** WES için kullanılan materyaller

**Tablo 3.** WES için kullanılan ekipman

**Tablo 4.** İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) olgularında bildirilen veya fenotipik serilerde hidrops ile ilişkilendirilmiş genler

**Tablo 5.** Tüm ekzom dizileme kalite parametreleri

**Tablo 6:** İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) olgularında tespit edilen ultrasonografi bulguları

**Tablo 7.** Olgu I'e ait İOHF ilişkili varyantlar

**Tablo 8.** Olgu II'e ait İOHF ilişkili varyantlar

**Tablo 9.** Olgu III'e ait İOHF ilişkili varyantlar

**Tablo 10.** Olgu IV'e ait İOHF ilişkili varyantlar

**Tablo 11.** Olgu V'e ait İOHF ilişkili varyantlar

**Tablo 12.** Olgu VI'ya ait İOHF ilişkili varyantlar

## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1.** İmmün olmayan hidrops fetaliste görülen genel patofizyolojik yollar

**Şekil 2.** Tüm ekzom dizileme ikinci basamak veri analizinde izlenen strateji

**Şekil 3.** Çalışmaya katılan indeks vakaları ve akrabalarını gösteren pedigriler

**Şekil 4.** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji.



## KISALTMALAR

|               |                                                                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>µl</b>     | Mikrolitre                                                                                           |
| <b>ACMG</b>   | Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği -<br>(‘American College of Medical Genetics and Genomics’) |
| <b>bç</b>     | Baz çifti                                                                                            |
| <b>cDNA</b>   | Komplementer DNA                                                                                     |
| <b>CGH</b>    | Komperatif Genomik Hibridizasyon                                                                     |
| <b>CNV</b>    | Kopya Sayısı Değişikliği - (‘Copy number variation’)                                                 |
| <b>CpG</b>    | Sitozin Guanin Nükleotidi - (‘Cytosine guanine nucleotide’)                                          |
| <b>CRL</b>    | Fetal Baş Popo Mesafesi - (‘Crown rump length’)                                                      |
| <b>dbSNP</b>  | ‘The Single Nucleotide Polymorphism Database’                                                        |
| <b>DEÜTF</b>  | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi                                                               |
| <b>DNA</b>    | Deoksiribonükleik asit                                                                               |
| <b>FISH</b>   | Floresan İn Situ Hibridizasyon                                                                       |
| <b>hg19</b>   | ‘Human Genome 19’                                                                                    |
| <b>İOHF</b>   | İmmün Olmayan Hidrops Fetalis                                                                        |
| <b>MAF</b>    | Minör Allel Frekansı                                                                                 |
| <b>MRI</b>    | Manyetik Rezonans Görüntüleme - (‘Magnetic Resonance Imaging’)                                       |
| <b>ng</b>     | Nanogram                                                                                             |
| <b>NGS</b>    | Yeni Nesil Dizileme - (‘Next Generation Sequencing’)                                                 |
| <b>NT</b>     | Nukal Translusion                                                                                    |
| <b>OMIM</b>   | ‘Online Mendelian Inheritance in Men’                                                                |
| <b>PBS</b>    | Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu - (‘Phosphate Buffered Saline’)                                      |
| <b>PCR</b>    | Polimeraz Zincir Reaksiyonu - (‘Polymerase Chain Reaction’)                                          |
| <b>QF-PCR</b> | Kantitatif Floresan PCR                                                                              |
| <b>REVEL</b>  | ‘Rare Exome Variant Ensemble Learner’                                                                |

|              |                                                                       |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>RNA</b>   | Ribonükleik Asit                                                      |
| <b>RPM</b>   | ‘Revolutions per Minute’                                              |
| <b>SNP</b>   | Tek Nükleotid Polimorfizmi - (‘Single Nucleotide Polymorphism’)       |
| <b>Ti/Tv</b> | Transisyon/Transversiyon                                              |
| <b>USG</b>   | Ultrasonografi                                                        |
| <b>UTR</b>   | ‘Untranslated Region’                                                 |
| <b>VUS</b>   | Klinik Önemi Belirsiz Varyant - (‘Variant of Uncertain Significance’) |
| <b>WES</b>   | Tüm Ekzom Dizileme - (‘Whole Exome Sequencing’)                       |
| <b>WGS</b>   | Tüm Genom Dizileme - (‘Whole Genome Sequencing’)                      |

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, çalışmalarımı titizlikle ve sonsuz sabırla takip eden ve güven veren danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp'e,

Bilgi ve tecrübesi, önemli yorum ve değerlendirmeleri ve değerli fikirleri ile desteklerini unutamayacağım Doç. Dr. Altuğ Koç'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteklerini eksik etmeyen Prof. Dr. Murat Erçal'a, Prof. Dr. Özlem Giray Bozkaya'ya, Doç. Dr. Elçin Bora'ya, Prof. Dr. Ahmet Okay Çağlayan'a ve Doç. Dr. Tufan Çankaya'ya,

Asistanlık eğitimim boyunca omuz omuza birlikte keyifle çalıştığım, manevi destekleri ve varlıklarıyla beni mutlu eden Dokuz Eylül Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Çocuk Genetik Bilim Dalında bulunan arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında bana destek olan ve fedakarlıkları, sevgileri ile beni her zaman destekleyen annem, babam ve kız kardeşime,

Şükranlarımı sunmayı borç bilir ve teşekkür ederim.

Arda Kekilli

## ÖZET

### İMMÜN OLMAYAN HİDROPS FETALİS OLGULARINDA TÜM EKZOM DİZİLEME İLE ADAY GENLERİN TESPİTİ

Dr. Arda KEKİLLİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İZMİR

İmmün-olmayan hidrops fetalis gebelik takiplerinde tespit edilen, sıklıkla letal seyreden önemli prenatal anomalilerden biridir. Ultrasonografik olarak tanı alan bu olguların etiyolojisinde birçok farklı genetik hastalık yer almaktadır. Rutin klinik uygulamalarında kullanılan prenatal karyotipleme ve kromozomal mikrodizileme yöntemleri ile olguların ortalama %25'ine tanı koyulabilmekte fakat etiyolojide yer aldığı bilinen tek gen hastalıklarının tespiti mümkün olmamaktadır.

Bu çalışmada rutin takiplerinde fetal asit, plevral veya perikardiyal efüzyon, cilt ödemi, kistik higroma, artmış ense kalınlığı bulgularından bir veya daha fazlasına sahip açıklanamayan altı fetal örnek *trio* olarak tüm ekzom dizileme ile incelendi. Tespit edilen varyantlar birinci basamakta minör allel frekansları ve protein üzerindeki etkileri dikkate alınarak filtrelendi ve güncel ACMG kılavuzu kriterleri kullanılarak sınıflandırıldı. Tanısal varyant tespit edilemeyen olgulardaki varyantlar STRING, DAVID veri tabanları ve in-silico patojenisite skorları kullanılarak aday gen ve yolların tanımlanması için incelendi. Yapılan çalışma ile immün-olmayan hidrops fetalis olgularında tek gen hastalıklarının etiyolojide oynadığı rolün aydınlatılması ve aday genlerin tanımlanması amaçlandı.

Tüm ekzom dizileme sonucunda olgu başına ortalama 42.468 varyant analiz edildi. Birinci basamak filtreleme sonucunda iki olguda *RIT1*: c.297T>G ve *RIT1*: c.321G>C tanısal varyantları tespit edildi. Tanısal varyant tespit edilmeyen dört olguya yapılan *in-silico* fonksiyonel analizlerde toplam 66 aday varyant önerildi ek olarak iki olguda tanısal potansiyele sahip *COL2A1*: c.1300C>T ve *SMARCC2*: c.3128del genetik varyantları saptandı. Tanısal varyant tespit edilemeyen olgularda yapılan varyant yükü

analizlerinde ortak hücrel yolak gözlemlenmedi. Olgular tek başlarına incelendiğinde pantotenat ve koenzim A biyosentez, tiroid hormon sentez yollarında anlamlı artmış varyant yükü saptandı.

Yapılan çalışma ile kromozom analizleri normal tespit edilmiş immün-olmayan hidrops fetalis olgularında tüm ekzom dizilemenin klinik olarak fayda sağlayabileceği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda iki olguda tanısal varyant tespit edilmiş ve iki olguda ise kliniği açıklayabilecek potansiyel varyant saptanmıştır. Tanısal varyant tespit edilemeyen olgularda yapılan *in-silico* analizler ile immün-olmayan hidrops fetalis kliniği ile ilişkili aday genler ve varyantlar belirlenmiştir. Bu varyantların fizyopatolojik etkilerinin kesinleştirilebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İmmün olmayan hidrops fetalis etiyolojisi hakkındaki bilgilerin artması ile bu olgularda tanı, tedavi, izlem ve önlem için yeni algoritmaların geliştirilmesi mümkün hale gelecektir.

**Anahtar Kelimeler:** İmmün Olmayan Hidrops Fetalis, Prenatal tanı, Tüm ekzom dizileme, *RIT1*, *SMARCC2*, *COL2A1*

## SUMMARY

### CANDIDATE GENE INVESTIGATION OF NON-IMMUNE HYDROPS FETALIS WITH WHOLE EXOME SEQUENCING

Arda KEKİLLİ, MD

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Izmir

Non-immune hydrops fetalis is one of the important prenatal anomalies with lethal course detected during routine pregnancy follow-up. It is a shared presentation of many genetic disorders. Standard routine genetic testing with prenatal karyotyping or chromosomal microarray analysis can diagnose only 25% of cases and cannot detect single gene disorders known to be involved in the etiology. Although the role of single gene diseases in the etiology of non-immune hydrops fetalis cases is not clear, it is thought to be significant. An accurate diagnosis makes it possible for focused prenatal management, early directed neonatal care. It also enables to apply prenatal and preimplantation genetic diagnosis for the consecutive pregnancies of the index case and accurate risk calculation for the other family members.

In this study six unexplained non-immune hydrops fetalis cases that were defined by the presence of fetal ascites, pleural or pericardial effusions, skin edema, cystic hygroma, increased nuchal translucency, or a combination of these conditions were evaluated by trio whole exome sequencing. In the first step the detected variants were filtered according to their minor allele frequencies, their effects on the protein and classified based on the current ACMG guideline criteria. The cases that could not be diagnosed at the end the first step were examined using STRING, DAVID databases and in-silico pathogenicity scores to identify candidate genes and pathways. The aim of this study was to elucidate the role of single gene diseases in the etiology of non-immune hydrops fetalis cases and to define candidate genes by in-silico functional analysis.

The average of 42,468 variants detected per case as a result of whole exome sequencing. Diagnostic variants of *RIT1*: c.297T> G and *RIT1*: c.321G>C were detected

in two cases after the first step filtering. As a result of second step in-silico functional analysis performed on four cases whose diagnostic variant could not be detected at the end of first step filtering, a total of 66 candidate variants and *COL2A1*: c.1300C> T, *SMARCC2*: c.3128del potentially diagnostic variants were detected. No common cellular pathway was detected in the variant load analysis. When the cases were examined alone a significantly increased variant burden in pantothenate and coenzyme-A biosynthesis, and thyroid hormone synthesis pathways were found.

The study shows that whole exome sequencing can be clinically beneficial in non-immune hydrops fetalis cases whose chromosome analyzes are detected normal. At the end of study, two diagnostic variant and two clinically relevant variant was found. Candidate variants and candidate genes associated with the non-immune hydrops fetalis were also pointed by in-silico analysis in cases where a diagnostic variant could not be detected but additional studies are needed to confirm the pathophysiological effects of these variants. By increasing knowledge about the etiology of non-immune hydrops fetalis accurate and fast diagnosis, treatment, follow-up and prevention algorithms may be developed in the future.

**Keywords:** Non-Immune Hydrops Fetalis, Prenatal Diagnosis, Whole Exome Sequencing, *RIT1*, *SMARCC2*, *COL2A1*

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prenatal ultrason ile takip edilen gebeliklerin %3'ünde ultrasonografik anomali tespit edildiği bilinmektedir. Bu anomaliler izole minör anomalilerden birden çok sistemi ilgilendiren majör anomalilere uzanan geniş spektrum göstermektedir (1). Genetik incelemeler bu anomalilerin triyajında ve sınıflandırılmasında önemli bir yere sahiptir. İlk genetik incelemeler klasik karyotipleme ile başlamış ardından teknolojinin ilerlemesi ile kantitatif PCR, kromozomal mikrodizileme, FISH analizleri ile tanı konulabilen genetik etiyolojilerin sayısı artmış; klinik izlem ve karar yetisi de bu doğrultuda ilerlemiştir. Bu bağlamda son 30 yıldır klasik karyotipleme ve sonradan eklenen FISH, QF-PCR analizleri prenatal tanıda rutin olarak kullanılmaktadırlar. Bu yöntemlerden sadece kromozom analizi ile fetal anomalilere tanı koyma şansı %32'dir. Son 10 yılda kullanımı giderek artan kromozomal mikrodizileme analizi ile kopya sayısı varyantlarının da tespiti mümkün hale gelmiştir (2, 3). Kromozomal mikrodizileme ile prenatal anomalilerde tanı koyma şansı konvansiyonel sitogenetik testlere ek olarak ortalama %3-5 arasındadır (2, 3, 4). Fetal anomalilerin genetik etiyolojisinde sayısal ve yapısal kromozomal anomalileri ve kopya sayısı değişimleri haricinde farklı mutasyon çeşitlerinin de rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genetik değişimler arasında tek nükleotid mutasyonları, küçük veya büyük delesyonlar/duplikasyonlar da yer almaktadır (5).

Son yıllarda kullanımı giderek artan yeni nesil dizileme yöntemleri özellikle tek gen hastalıklarında klinik yaklaşımı giderek değiştirmektedir (6, 7). Tüm ekzon dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS) son yıllarda pediatrik ve yetişkin popülasyonlarda sıklıkla tanı amaçlı kullanılsa da bu yöntemlerin prenatal olgulardaki kullanımı kısmen sınırlı olmuştur (8). Yapılan çeşitli çalışmalarda fetal anomalilerde bu yöntemlerin tanı oranlarının %6,2 ile %80 arasında değiştiği gösterilmektedir (9). Tanı oranlarındaki geniş farklılık çalışmaya dahil edilen fetal yapısal anomalilerdeki çeşitlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Tanı oranlarının aralarında akrabalık bulunan eşlerde, birden çok konjenital anomalisi olan fetüslerde ve spesifik sendrom düşündüren bulgulara sahip fetüslerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (8, 9). Ayrıca bu çalışmaların hepsinde WES öncesi karyotip analizi veya kromozomal mikrodizileme

analizi yapılmaması da doğru hasta grubunda WES analizinin veriminin artabileceğini düşündürmektedir. Günümüzde özellikle spesifik prenatal fenotiplerde ekzom dizilemenin yararlılığına ilişkin sınırlı veri bulunmaktadır.

İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) prenatal dönemde karşılaşılan fetal ekstrasvasküler bölgede ve vücut boşluklarında sıvı toplanması sonucu gelişen prenatal fenotipi tanımlamaktadır. Sıklığı gebelik başına 1/1700-3000 olarak bildirilmektedir ve düşük, ölü doğum, preterm doğum, neonatal komplikasyonlar ve perinatal ölüm risklerinde artış ile ilişkilendirilmiştir (10-13). Fetal hidrops “Society for Maternal-Fetal Medicine” (SMFM) tarafından en az 2 ayrı bölge sıvı toplanması olarak tanımlanmaktadır fakat bu tanımlanma yeterince desteklenmemektedir. Fetal dönemde toplanan sıvının miktarı ve toplanma bölgesi zamanla değişebileceği gibi genetik hastalıklar kendilerini tek bir bölgede sıvı toplanması ile de gösterebilmektedirler (10, 11, 14-19).

İmmün olmayan hidrops fetalis birçok farklı genetik hastalığın ortak bulgusu olarak prenatal dönemde tespit edilebilmektedir. Rutin karyotipleme ve kromozomal mikrodizileme uygulamaları ile olguların yaklaşık %25’ine tanı konulabilmektedir. Rutin yapılan genetik analiz ile kromozomal yapısal ve sayısal anomaliler ile genomik kopya sayısı değişimleri tespit edilebilmekte fakat tek gen hastalıklarının tanısı mümkün olmamaktadır. Günümüzde İOHF olgularına tek gen hastalıklarının katkısı kesin bir şekilde bilinmemekte birlikte anlamlı bir katkısının olduğu düşünülmektedir. Bu olgularda yapılan çalışmalarda incelendiğinde hem farklı tek gen hastalıklarının İOHF’e neden olabileceği hem de bu hastalıkların prognostik açıdan farklılıklar taşıdığı dikkat çekmektedir. Hastalıklardan bazıları prenatal dönemde letal seyretmekte iken bazılarının ise uzun dönemde sadece hafif komplikasyonlara sebep olduğu görülmektedir (11, 14-16, 20-28). Bu sebeple olgulara tanı konulması prenatal dönemde doğru kararlar verilmesini ve perinatal dönemde hızlı ve efektif tedavi başlanmasını mümkün kılacaktır.

Bu bilgiler ışığında immün olmayan hidrops olguları, erken dönemde tespit edilebilmesi, genetik tetkikler için uygun zaman sahip olması ile tüm ekzom dizilemenin

prenatal dönemde uygulanması açısından ilgi çeken bir konjenital anomali olmaktadır. İmmün olmayan hidropsa neden olan genetik etiyolojilerin aydınlatılması ile genetik testlerin daha hızlı çalışması ve maliyet avantajları bulunan panellerin oluşturulması mümkün olabilecektir. Bu sebeplerle immün olmayan hidrops fenotipinde tüm ekzom dizileme ile genetik etiyolojinin aydınlatılması uygun bir araştırma konusu olarak görülmektedir.

Yapılan çalışma ile rutin yöntemler ile tanı konulamamış, açıklanamayan, kötü prognozlu İOHF olgularında etiyolojide rol oynayan tek gen hastalıklarına tüm ekzom dizileme ile tanı konulması, tanı konulamayan olgularında *in-silico* fonksiyonel analizler ile aday genlerin ve varyantların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç ile İOHF bir veya daha fazla patolojik sıvı toplanması olarak tanımlanmış ve çalışmaya ense kalınlığı artışı ( $>3.5$  mm), kistik higroma, plevral efüzyon, perikardiyal efüzyon, asit, cilt ödemi bulgularından en az birine sahip düşük veya ölü doğum ile sonuçlanmış olgular dahil edilmiştir. Tanısal olmayan karyotip analizi çalışma için gerekli tutulmuş ayrıca hidrops için başka bir tanısal patofizyolojinin varlığında (konjenital viral enfeksiyonlar, ikiz ikiz transfüzyon sendromu, alloimmünizasyon, vb.) olgular çalışmaya dahil edilmemiştir.

Yapılan araştırma ile immün olmayan hidrops fetalis olgularında genetik etiyolojinin açıklanması, aday genlerin bulunması, aday varyantların bulunması, postnatal dönemde fenotipi bilinen monogenik sendromların prenatal dönemdeki bulguları hakkında fikir edinilmesi ve İOHF olgularında tüm ekzom dizilemenin etkinliği hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenmiştir. Elde edilen bulgular ile olgularda doğru ve erken tanı konulması ile prenatal ve perinatal dönemin daha hızlı ve etkili bir şekilde yönetilebilmesi ayrıca ailelere gebelikle ilgili daha doğru genetik danışma verilebilmesi mümkün olabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Prenatal Tanı

Prenatal tanı ilk olarak 1966 yılında Steele ve Berg'in kültüre edilen amniyon sıvısı hücrelerinde fetal kromozomun saptanabileceğini göstermesiyle başlamıştır (29). Teknolojinin ve tıbbın gelişmesi ile fetal karyotipleme haricinde günümüzde prenatal materyalden kromozomal mikrodizileme analizi ile genomdaki yapısal değişikliklerin (CNV), dizileme çalışmaları ile nükleotid değişimlerinin, MLPA çalışmaları ile delesyon/duplikasyon değişimlerinin tespitleri mümkün hale gelmiştir.

Farklı genetik tetkikler kullanılarak yapılan prenatal tanı hastalıklı çocuk sahibi olma riski taşıyan çiftlere fetüsün durumu hakkında doğru bilgi vermek, ailenin kendi etik, sosyal, kişisel alanında karar vermesini kolaylaştırmak, bu olgularda endişeleri gidermek, psikolojik olarak hazırlamak ve doğru yönlendirmek, doğum sonrası bakım hazırlığına yardımcı olmak, fetüsün prenatal tedavisine olanak sağlamak, uygun durumlarda anne ve fetüs yararına olacak şekilde fetal terminasyon yapmak, prenatal tanı sayesinde sağlıklı çocuk sahibi olabilme imkânı vermek ayrıca sonraki gebelikler ve indeks vakanın akrabaları için genetik risk değerlendirilerek genetik danışma vermek amaçlarıyla kullanılmaktadır.

Belirtilen amaçlarla yapılan prenatal tanının invaziv işlemler gerektirmesi, anne ve fetüs için belirli riskler taşıması yapılan testler için tanı endikasyonları oluşmasını gerekli kılmıştır. Belirtilen amaçlar doğrultusunda, "American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee" tarafından önerilen prenatal tanı endikasyonları aşağıda belirtilmiştir (30):

1. İleri maternal yaş (>35 yaş)
2. Tarama testlerinde risk artışı
3. Fetal ultrasonografide anomali
4. Akraba evliliği
5. Ailede kalıtsal hastalık öyküsü

6. Ebeveynlerde yapısal kromozomal anomali
7. Önceki gebeliklerde anomali öyküsü
8. Anomalili çocuğa sahip olma
9. Gebelikte ilaç kullanımı
10. Gebelikte teratojen maruziyeti
11. İntrauterin enfeksiyon şüphesi
12. Non-invaziv yöntemlerde tespit edilmiş anormal sonucun doğrulanması
13. Önceki yapılan prenatal tanı testinde başarısızlık/anormal sonucun doğrulanması

Günümüzde yapılan rutin gebelik takiplerinin %2-5'inde beklenmeyen fetal anomaliler saptanabilmektedir. Fetal anomali tespit edildiğinde spesifik bir tanıya işaret eden bulgular veya aile öyküsü yokluğunda sıklıkla kromozom analizleri veya kromozomal mikrodizileme analizleri çalışılmaktadır. Bu yöntemler ile ultrasonografide fetal yapısal anomali tespit edilen fetüslerin %32'sinde kliniği açıklayabilen anormal karyotip, %6'sında ise patojenik CNV tespit edilebilmektedir (1, 31-33). Tanı konulamayan olguların büyük çoğunluğunda ise altta yatan genetik etiyojiden şüphelenilmektedir. Genetik hastalıkların çeşitliliği, tüm genomu taramanın zorlukları, mutasyon tiplerindeki farklılıklar, yol gösterici aile hikayesinin yokluğu fetal dönemde tanı konulmasını sıklıkla güçleştirmektedir. Altta yatan genetik sebebin tespit edilememesi bu olgularda gebeliğin yönetimini, perinatal yönetimi, aileye verilen genetik danışmayı zorlaştırmaktadır.

## **2.2 Doğum Öncesi Tanı Endikasyonları**

### **2.2.1 İleri Anne Yaşı**

Prenatal test için kabul edilen endikasyonlarından biri ileri anne yaşıdır. Down Sendromu başta olmak üzere trizomilerin anne yaşı ile artan insidansı, geçmişte ilerlemiş anne yaşını en sık kullanılan prenatal tanı endikasyonu yapmaktadır. Fakat günümüzde klinik kılavuzlar, non-invaziv testlerin klinik kullanımdaki başarısı sebebiyle ileri maternal yaşın anöploidilere yönelik yapılan prenatal invaziv testler için

tek başına endikasyon olarak kabul edilmesini önermemektedir (34). Bunun yerine günümüzde kabul edilen temel yaklaşım non-invaziv testlerden biriyle gebelikte mevcut riskin hesaplaması ardından uygun hastalara invaziv testin önerilmesidir.

### 2.2.2 Tarama Testlerinde Risk Artışı

İlk trimestır tarama testi, gebeliğin 10-13. haftaları arasında yapılan, anne yaşı ve kilosu, anöploidi tanısı konmuş gebelik öyküsü, maternal kanda tespit edilen  $\beta$ -hCG ve PAPP-A seviyeleri ile NT ve *Crown-Rump Length* (CRL) ölçümlerinin kombine edilmesiyle mevcut gebelikte Trizomi 21 (Down Sendromu), Trizomi 18, Trizomi 13 hastalıklarının riski hakkında bilgi veren tarama testidir (35). İlk trimestır tarama testi ile sadece anöploidi riski değil ayrıca ektopik gebelik, diyabetik gebelik, intra-uterin gelişme geriliği, preeklampsi, gebelik hipertansiyonu gibi gebeliğin genel prognozunu kötü etkileyen durumlar hakkında da bilgi sahibi olunabilmektedir (36).

İlk trimestır tarama testinde trizomi riski 1/300'ün üzerinde tespit edilen gebeliklerde fetal karyotipleme yapılması önerilmektedir (37). Fetal karyotipleme için önerilen invaziv girişimin tipi gebeliğin zamanı, plasentanın durumu, yapılması planlanan ek genetik testlerin varlığı ışığında KVÖ, amniyosentez ya da kordosentez olabilmektedir.

İlk trimestır tarama testlerinin çoğul gebeliklerde de kullanımı mümkün olmakla birlikte risk sınıflamasında invaziv girişim için alınacak *cut-off* değeri halen net değildir ve tartışılmaktadır. Bu değerin 1/300 olarak belirlenmesi durumunda testin anöploidi sensitivitesi %75-100, yanlış pozitiflik oranı ise %6,9-7 aralığında olmaktadır (38).

Birinci trimestır taramalarında anöploidik fetüslerin serum markırları incelendiğinde Down Sendromlu fetüslerde normal popülasyona göre artmış maternal serum  $\beta$ -hCG ( $>2$  MoM) ve azalmış PAPP-A ( $<0,6$  MoM) değerleri, Edwards ve Patau Sendromlarında ise azalmış  $\beta$ -hCG ( $<0,5$  MoM) ve azalmış PAPP-A ( $<0,6$  MoM) ölçümleri gözlemlenmektedir (39). Risk hesaplamasında kullanılan diğer parametreler olan anne yaşı ve NT ölçümlerinde, her iki parametredeki artış trizomik fetüs riskini logaritmik olarak arttırmaktadır (40).

İkinci trimestır tarama testleri ise üçlü ve dörtlü tarama testlerini içermektedir. Dörtlü tarama testinde maternal kandan ölçülen serum AFP, serbest estriol, beta HCG ve dimerik inhibin A seviyeleri, maternal yaş, kilo, ırk, diyabet ve gebelik pluritesi ile kombine edilmektedir (39, 40). Buna karşın üçlü tarama testinde serum AFP, serbest estriol, beta HCG ölçümleri kullanılmaktadır. Üçlü tarama testlerinin Down Sendromu için dörtlü tarama testlerinde daha düşük sensiviteye sahip olduğu bilinmektedir (41). Üçlü tarama testlerinin Down Sendromlu fetüslerin %69'unu tespit edebildiği gösterilmişken, inhibin-A'nın eklenmesi ile yapılan 4'lü tarama testinde bu oranın %81 olduğu tespit edilmiştir (39).

İkinci trimestır taramalarında sonucunda mevcut gebelik için Down Sendromu, açık nöral tüp defektleri ve Trizomi 18 riskleri hesaplanmaktadır. İkinci trimestır tarama testleri gebeliğin 15.-22. haftalarında yapılması mümkün olsa da ideal zamanın nöral tüp defektlerinin de tespiti için 16.-18. haftalar arasında olduğu belirtilmektedir. İkinci trimestır taramalarında ölçülen analitlerde açık nöral tüp defektlerinde izole maternal serum AFP düzeyi yüksekliği, Down Sendromlu fetüslerde maternal serum AFP ve serbest estriol düzeyi düşüklüğü ile beta HCG ve inhibin-A artışı, Edwards Sendromunda ise maternal serum AFP, serbest estriol, beta HCG değerlerinin düşüklüğü gözlemlenmektedir (39).

### **2.2.3 Fetal Yapısal Anomaliler**

Ultrasonografi fetal malformasyonların tespitinde kullanılan temel görüntüleme yöntemlerinde biridir. Fetal anomali taramasında kullanımı 1950'li yılların sonlarında başlamıştır (42). Güvenli bir inceleme yöntemi olan bu yöntem gebelik takiplerinde gebeliğin 11-14'üncü haftaları ile 18-22'nci haftalarında uygulanmaktadır. Ultrasonografik değerlendirme sırasında fetüsün iç ve dış anatomisi incelenir. Amaç sadece majör/minör malformasyonların saptanması değil aynı zamanda kromozom anomalisi veya genetik hastalıklara işaret eden hafif markır'ların da tespit edilmesidir.

Tüm popülasyonda yapılacak rutin ultasonografi taramalarının çoğu majör fetal malformasyonları tespit edebilecek potansiyele sahiptir. Bu sebeple "Royal College of

Obstetricians and Gynaecologists” tüm obstetrik departmanlarının fetal tarama yapabilecek ultrasonografi cihazlarına ve eğitimli personele sahip olmasını ayrıca tüm toplumda fetal ultrasonografi ile majör ve minör anomaliler için taramalar yapılmasını önermektedir (43). Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Ultrasonografi Derneği (ISUOG) ise fetal ultrasonografi taramalarının gebeliğin ikinci trimestrında yapılmasını önermektedir (44). Türkiye’de Sağlık Bakanlığı tarafından önerilen ideal zaman ise 18-24. gebelik arasındadır (45).

Ultrasonografi gebelik öncesi hem tarama hem de tanı amaçlı olarak kullanılabilir. Gebeliklerin USG ile yapılan takiplerinin perinatal mortaliteyi azalttığı bilinmektedir. Fetüsün gelişiminin takip edilmesi, muhtemel büyüklüğü hakkında bilgi sahibi olunması, plasenta ve amniyon sıvısı ile ilgili patolojilerin tespit edilebilmesi, doğum şekli ve tahmini doğum zamanı gibi bilgilerin elde edilmesi sayesinde USG incelemelerinin perinatal morbidite ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (46, 47). İdeal bir prenatal USG muayenesi; kardiyak muayene, fetüs sayısı, fetal hafta ve fetüs büyüklüğü, fetüsün anatomisi, plasenta görünüm ve yerleşimini içermektedir (48, 49).

Konjenital anomaliler, fetüsün yapı, şekil ve fonksiyonlarının bir parçası veya bir kısmında olan, standardın dışında sapmayı tarifleyen ve doğum esnasında tespit edilebilen gelişim kusurlarıdır (50). Fetal anomaliler gebeliklerin %2-5’inde tespit edilmekte ve perinatal ölümlerin %20’sinden sorumlu tutulmaktadır (51, 52). Gebelik prognozu tespit edilen anomaliye, izole/multipl olmasına ve altta yatan genetik etiyolojiye bağlı olarak değişmektedir.

Gebelik takiplerinde NT artışı bakısı gebeliğin ilk trimestrında, fetal yapısal anomali bakısı ise gebeliğin ikinci ve üçüncü trimestrılarında TV-ultrasonografi ile yapılmaktadır. İdeal taramalar ise fetüs 28-30 haftalıkken yapılabilen fakat fetal ultrasonografinin zamanı aynı zamanda obezite gibi fetüsün net olarak görülmediği durumlarda da değişmektedir. Fetal yapısal anomali ultrasonografisi sırasında önce fetal biyometri ölçümleri ardından majör anomali taraması ardından minör anomali taramaları yapılmaktadır (53). Fetal ultrasonografide tespit edilen normal dışı bulgular fetal

anöploidi saptama oranlarındaki farklılıklar sebebiyle majör ve minör anomaliler olarak ikiye ayrılır. Minor anomali ya da *soft marker* olarak tanımlanan bulgular beraberinde kromozomal defektin yokluğunda çoğunlukla fetüste sağlık problemi oluşturmamaktadır. Major fetal yapısal anomaliler ise trizomili fetüslerin %25'inde ikinci trimestırda yapılan ultrasonografik taramalarda tespit edilmektedir (54). Minor fetal yapısal anomalilerden biri olan ense saydamlığının artışı (3,5 mm'den fazla veya NT CRL'ye göre 99. persentilin üzerinde) izole tespit edildiğinde bile prenatal tanı için girişim endikasyonu oluşturmaması sebebiyle dikkat çekmektedir (35).

### **2.3. Doğum Öncesi Tanı Yöntemleri**

Genetik hastalıkların ve konjenital malformasyonların doğum öncesi tespiti invaziv ve non-invaziv yöntemler ile mümkün olabilmektedir.

Fetüsün ultrasonografik olarak görüntülenmesi ve anne karnında fetüs hakkında bilgi veren maternal serumda ölçülen AFP, beta HCG gibi analit seviyelerine bakılması non-invaziv yöntemler olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemler fetüs veya anne adayı için herhangi bir risk taşımaması sebebiyle gebeliklerin birçoğunda uygulanabilmektedir. Fetüse ait hücrelerin alınıp direk incelenmesi prenatal invaziv yöntemleri oluşturmaktadır. İnvaziv yöntemlere örnek olarak koryon villus örnekleme (KVÖ), amniyosentez, kordosentez, preimplantasyon genetik tanı ve fetal deri, karaciğer, kas, böbrek biyopsileri verilebilir. Bu yöntemler fetüs ve anne için, ayrı ayrı yönetime spesifik farklı riskler taşımaktadır ve bu sebeple genellikle riskli gebeliklerde uygulanmaktadır.

#### **2.3.1. Koryon Villüs Örnekleme (KVÖ)**

Koryon villüs örnekleme 10 ile 13'üncü haftalar arasında gerçekleştirilen transabdominal veya transservikal yol ile koryonik villuslardan örnek alınması işlemidir. Koryonik villuslar ekstra-embriyonik trofoblastlar tarafından meydana getirilir ve fetüs ile aynı genetik yapıya sahiptir. Koryon villüs örnekleme yöntemi ilk defa Jan Mohr tarafından 1968 yılında tarif edilmiş ve uygulanmıştır. Fakat rutin uygulanan bir

yönteme dönüşmesi 1983 yılında Simoni ve arkadaşlarının KVÖ hücrelerinde direk kromozom analizi yöntemini geliştirmesi ve hücre kültür koşullarının yeterli düzeye gelmesi ile dönüşmüştür (55).

Birinci trimestır KVÖ yönteminin amniyosenteze kıyasla temel avantajı, gebeliğin erken döneminde hızlı tanı sağlaması, bu sayede klinik yönetim ve terminasyon kararının çok daha erken verilebilmesidir. Bu sayede tanı öncesi geçen süre azalmakta ve terminasyon kararı eğer verilecekse ikinci trimestırın başında verilebilmektedir.

KVÖ yönteminin karyotipleme veya kromozomal mikrodizileme başarısının amniyosentez ile aynı (>%99) olduğu bilinmektedir. Fakat KVÖ örneklerinin %1'inde kromozomal mozaizm nedeniyle belirsiz sonuçlar elde edilebilir. Bu belirsiz sonuçlar plasentada görülen mozaizm veya kültür koşullarında oluşan psödo-mozaizm kaynaklı görülebilmektedir. Kromozomal mozaizm tespit edilen olguların %10-40'ında tespit edilen mozaizmin fetüste de olduğu tespit edilmiştir (56, 57). Bu sebeple KVÖ örnekleme sonrası mozaizm tespit edilen olgulardan gebelik haftasına uygun olarak yeniden fetal örnek alınması önerilmektedir.

KVÖ ile alınan materyaller sonrası görülen komplikasyonların başında abortus gelmektedir ve riski işlem başına 1/300-1/500 arasındadır. Bu oran amniyosentezde gözlemlenen gebelik kaybı ile yaklaşık benzerdir (58). İlk raporlarda uzuv redüksiyonu gibi doğumsal anomalilerde artış tespit edilmiş olsa da günümüzde 10 hafta sonrasında ultrasonografi eşliğinde yapılan KVÖ'lerin oluşturduğu büyük serilere sahip araştırmalarda bu risk gözlemlenmemiştir (59, 60).

### **2.3.2. Amniyosentez**

İnvaziv testlerden bir diğeri olan amniyosentez, transabdominal olarak amniyon kavitesine iğne ile girilerek amniyon sıvısından örnek alınması işlemidir. Obstetride ilk defa polihidramniosun dekompresyonu amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra, Rh uygunsuzluğu olan hastalarda tanı koymak ve prognozu belirlenmesi için kullanılan amniyon bilirubin değerlerinin tespiti amacıyla da amniyosentez uygulanmıştır (61).

Amniyosentez işlemi tipik olarak gebeliğin 16-20'nci haftalarında uygulanmaktadır. Gebeliğin bu haftalarında amniyon sıvı miktarı, viabl/nonviabl hücre oranı idealdir. Amniyon sıvısı kültüre edilebilen, bölünebilen fetal hücrelere sahip olduğundan amniyosentez ile alınan örnekten karyotipleme yapılabilmekte ayrıca elde edilen fetal DNA'dan dizileme analizleri ve MLPA gibi diğer genetik tetkikler de çalışılabilmektedir.

Amniyosentezin komplikasyonları incelendiğinde majör komplikasyonun düşük riski olduğu görülmektedir. Amniyosentez sonrası gebelik kaybı ihtimali işlem başına 1/300 ile 1/500 arasındadır. Daha nadir olarak amniyon sıvı kaçağı, enfeksiyon ve fetal yapıların iğne ile zarar görmesi gibi başka komplikasyonlar da görülebilmektedir. Günümüzde erken amniyosentez (10-14. gebelik haftalarında) önerilmemektedir. Bu haftalarda amniyosentez yapılması durumunda amniyon kaçağı, spontan düşük, talipes equinovarus risklerinin 16-20. gebelik haftalarında yapılan amniyosenteze göre daha yüksek olduğu görülmüştür (62). Bu sebeple erken dönemde amniyosentez yerine günümüzde koryon villus örnekleme önerilmektedir.

### **2.3.3. Perkutan Umbilikal Kord Kanı Örnekleme (Kordosentez)**

Fetal umbilikal vene ultrasonografi eşliğinde girilerek fetal kord kanı örneğinin alınmasına kordosentez ismi verilmektedir. Kordosentez işleminde alınan materyalden yapılan hücre kültüründe fetal lenfositler çoğalmaktadır. Özellikle ileri gebelik haftalarında fetal karyotipleme ve hızlı tanı amacıyla kullanılması dışında amniyosentez veya KVÖ sonrası tespit edilen mozaisizmin değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır. Prenatal genetik tanı haricinde ayrıca fetal anemi, trombositopeni, intrauterin enfeksiyonların tespitinde ve ikizden ikize transfüzyon gibi durumlarda da kullanımı mevcuttur.

İşlemin en sık komplikasyonu fetal kayıptır. Fetal kayıp genellikle iğne giriş bölgesindeki kanama, hematoma, ciddi bradikardi ve erken membran rüptürü nedeniyle görülebilmektedir. Kordosentez işlemi sonrası fetal kayıp oranları yapısal anomalilerin tespit edilmediği bir fetüs için yaklaşık %1 olarak hesaplanmaktadır (63). Bu oran

kordosentez endikasyonu ile değişebilmektedir. Yapısal anomali, ağır intrauterin gelişme geriliği veya hidrops tespit edilen fetüslerde daha yüksek fetal kayıp oranları (sırasıyla %4, %14, %25) bildirilmiştir (64). Bu durum fetal kayıp oranlarının uygulanan prosedürün endikasyonuna bağlı değişebileceğini göstermektedir.

## **2.4. Ense Kalınlığı Artışı ve Kistik Higroma**

### **2.4.1. Tanım ve Epidemiyoloji**

Fetal ultrasonografi rutin olarak gebelik takiplerinde kullanılan özellikle gebeliğin erken haftalarında fetüsün sağlığı hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Nukal translusensi ise birinci trimestırda transvajinal veya transabdominal ultrasonografi ile tespit edilebilen, ensenin arka tarafında biriken sıvı olarak tanımlanmaktadır. Sıvının septalı olup olmaması, vücudun bir tarafını veya tamamını zar gibi sarması durumunda terminoloji değişmemekte ve yine nukal translusensi olarak adlandırılmaktadır. İlk defa Nicolaides tarafından 1992 yılında Down Sendromu için prenatal tarama belirteci olarak önerilmiştir (65, 66). Fetal NT ölçümleri CRL ile korele olarak artmaktadır ve her ölçümde standart sapmaya bağlı olarak gebeliğin tespit edilen risk değeri değişmektedir (67-69). Nukal translusensi normal bir gebelikte sıklıkla ilk trimestırda görülüp, ikinci trimestırda kaybolmaktadır (70). Daha nadir olarak ise nukal translusensi persiste edebilir, normal ölçümlerine dışına çıkabilir, hidropslu/hidropssuz kistik higromaya veya hidrops fetalis kliniğine ilerleyebilir.

Artmış ense kalınlığı 10-14'üncü haftalarda "Fetal Medicine Foundation" tarafından belirtilen protokol ile ölçülen NT'nin 3,5 mm'nin üzerinde olması veya CRL ya da gestasyonel haftaya göre alınan popülasyon dağılımlarında 95'inci persentilin üstünde olması olarak tanımlanmaktadır (71, 72). Tüm fetüslerin %5'inde artmış ense kalınlığı tespit edilmektedir. Artmış ense kalınlığının yapılan çalışmalarda kromozomal anomaliler, fetal yapısal anomaliler ve 150'den fazla farklı genetik sendromla ilişkili olduğu gösterilmiştir (73). Bu durum önce kromozomal anomaliler ile NT artışının arasındaki korelasyon çalışmaları ile ortaya konmuş ardından devam eden çalışmalarda anne yaşı ve NT ölçümü hesaba katılarak gebeliğin kromozomal anomaliye sahip olma

riskleri hesaplanmıştır (66). Mevcut gebelikteki kromozomal anomalilerin tespit edilme riski NT kalınlığı arttıkça logaritmik olarak artmaktadır (74). Kromozomal anomalilerin haricinde ense kalınlığı artışının etiyolojisinde fetal kardiyovasküler ve pulmoner defektler, iskelet displazileri, diyafram hernisi, konjenital enfeksiyonlar, metabolik hastalıklar, hematolojik hastalıklar ve Jarcho–Levin Sendromu, Smith–Lemli–Opitz Sendromu, Stickler Sendromu gibi ender genetik sendromlar da bulunmaktadır (75-77).

Ense kalınlığı artışı varlığı ve kantitatif değeri fetüs için çeşitli riskler oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde anöploid fetüs ihtimalinin ölçülen NT ile ilişkisi 3,0-3,4 mm, 3,5-4,4 mm, 5,5-6,4 mm ve  $\geq 8,5$  mm değerleri için sırası ile %7, %20, %50 ve %75 olarak tespit edilmiştir (78). Diğer bir etiyolojik sebep olan fetal yapısal anomalilerin ise NT artışına sahip fetüslerin %4 ile %10'unun da görülebilmektedir (79, 80). Ayrıca karyotip analizinin normal tespit edildiği, ek fetal anomalilerin görülmediği durumlarda dahi NT artışına sahip fetüslerin kötü obstetrik prognoza sahip olduğu bilinmektedir. İlk trimestir NT mesafesi 3.5-4.4 mm olan fetüslerin %70'i iyi prognoza sahipken, NT ölçümleri 5.5-6.4 mm olan fetüslerin sadece %30'unda iyi prognoz tespit edilmiştir (81). Bu bilgiler ışığında yine de ense kalınlığı tespit edilmiş fetüslerin bir kısmının 14. hafta döneminde spontan olarak *resolve* olabileceğidir (82, 83). Bu durumun neden olduğu ve önemi halen netleştirilememiştir.

Bu bilgiler ışığında artmış ense kalınlığı heterojen bir hasta popülasyonunu oluşturmakta ve ilk tespit edilen ense kalınlığı artışının prognozunu belirlemek günümüzdeki kullanılan ultrasonografi ve prenatal non-invaziv yöntemler ile mümkün olmamaktadır (75, 76, 84).

#### **2.4.2. Genetik**

Artmış ense kalınlığının konjenital kalp hastalığı başta olmak üzere fetal yapısal hastalıklar, genetik bozukluklar, artmış anöploidi riski ve intrauterin ölüm ile ilişkisi bilinmektedir.

Ayrıca düşük, fetal ölüm ve fetal anomali prevalansının NT artışı ile ekspanansiyel olarak arttığı bilinmektedir (85). Konjenital anomaliler, kromozomal

anomaliler, metabolik hastalıklar gibi farklı hastalıkların ortak bir bulgusu olması ve bu hastalıkların çoğunlukla nöro-gelişimsel defektler ile ilerlemesi, saptanılan NT artışının etiyolojisinin belirlenmesini gerekli hale getirmektedir. Bu durumlar dışında NT artışı, spontan olarak 14. hafta civarında kaybolabildiği bilinmektedir fakat gerileyen NT artışının klinikteki önemi henüz aydınlatılamamıştır (82). Hastaların heterojen bir topluluk oluşturması, NT artışı ile takip edilen fetüslerin klinik triyajının ne sıklıkla takip edileceği, tedaviye ne zaman alınacağı veya ailelere yasal olarak ne zaman terminasyon hakkı tanınacağı kararlarını zorlaştırmaktadır.

Bu bilgiler ışığında olgulara tanı konulması amacıyla yapılan tüm ekzom dizileme çalışmaları fetal yapısal anomalilerde genetik hastalıkların tanı alma ihtimalini artırmaktadır.

Ense kalınlığı artışı tespit edilen fetüslerde daha önce yapılan çalışmalarda 100'den fazla gelişimsel ve genetik sendrom tespit edilmiştir (86, 87). Örneğin RASopatiler ve farklı iskelet displazi çeşitleri in utero olarak tanı alabilmektedir ve bu hastaların tüm ekzom dizileme ile tespiti mümkündür (88-91).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde NT artışına sebep olan genetik hastalıklar içerisinde sık tespit edilenlerin Konjenital Adrenal Hiperplazi, 22q11 Mikrodelesyon Sendromu, Noonan Sendromu, Smith Lemli Opitz Sendromu, Fetal Akinezi Deformasyon Sekansı (Pena-Shokeir), Multiple Pterygium Sendromu (Escobar Sendromu), Fanconi Pansitopeni Sendromu, Kamptomelik Displazi, VACTERL Asosiasyonunu olduğu gözlemlenmiştir (92-96). Bu genetik sebepler içerisinde Noonan Sendromunun en sık tespit edilen tek gen hastalığı olduğu görülmektedir. NT artışı tespit edilen olgularda yapılan sekans analizlerinde Noonan Sendromunun tanı oranı %10'a ulaşabilmektedir (96-98).

Artmış ense kalınlığına sahip fetüslerde tek gen hastalıklarının tespiti sağlayan tüm ekzom çalışmaları günümüz literatüründe kısıtlı yer tutmaktadır ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Lord ve ark. 2019 da yaptığı kapsamlı bir çalışmada ense kalınlığı ile ilişkili klinik olarak tanı koydurucu değişimler *KIAA0586*, *ROBO1*,

*KMT2D*, *NRAS*, *PTPN11*, *KMT2A*, *MID1*, *PTPN11*, *SLC9A6* genlerinde tespit edilmiştir (99). Petrovski ve arkadaşlarının yaptığı 59 fetüsün dahil edildiği bir diğer araştırmada *RERE* ve *FLVCR2* genlerinde çerçeve kaydıran mutasyon, *RIT1* geninde missense değişim tespit edilmiştir (100). Her iki çalışmada da ense kalınlığı artışı saptanan fetüslerde rasopati ile ilişkili genlerde patojen değişimler tespit edilmiştir. Bu araştırmaların kombine tanı oranı %2,6'dır.

Yang ve arkadaşlarının yaptığı 73 olgunun dahil edildiği başka bir çalışmada ise *SETD2* geninde nonsense bir varyant, *TMEM231* geninde bileşik heterozigot bir splice bozan diğeri nonsense iki varyant, *PTPN11* geninde nonsense bir varyant, *RAF1* geninde nonsense bir varyant tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada tanı oranı %5,5'tir (101).

Choy ve arkadaşlarının yaptığı 50 fetal olgunun ile yapılan çalışmada 7 vakada patojen/muhtemel patojen değişimler saptamıştır. Bu değişimler *ARMC4*, *ANKRD11*, *GATA4*, *NSD1*, *BRAF*, *COL2A1*, *KMT2D* genlerinde tespit edilmiş ve fetüsün kliniği ile ilişkilendirilmiştir (102).

Xue ve arkadaşlarının yaptığı kromozom mikrodizileme analizi normal saptanmış, 10-13. haftalarında, izole ense kalınlığı saptanmış 23 fetüs ise *SOS1*, *ECEL* ve *PIGN* genlerinde tanı koydurucu patojen genetik değişim tespit edilmiştir (103).

Fetüste tespit edilen ense kalınlığı artışı genetik hastalıklar içerisinde kalıtsal metabolik sendromlar ile de ilişkilendirilmiştir (104-106). Biasio ve ark. yaptığı çalışmada artmış ense kalınlığı konjenital adrenal hiperplazi tanılı 8 fetüste, Zellweger Sendromuna sahip 8 fetüste, Mukopolisakkaridoz tip 7'ye sahip 2 fetüste, Smith-Lemli-Opitz Sendromu tespit edilmiş 6 fetüste, GM1 Gangliosidozis'e sahip 1 fetüste, D Vitaminine Dirençli Rikets'li bir fetüste, Uzun Zincirli 3-hidroksiasil KoA Dehidrojenaz (LCHAD) eksikliğine sahip bir fetüste tespit edilmiştir (107).

### **2.4.3. Patogenez**

NT artışı ile ilişkili durumların çokluğu, altta yatan mekanizmanın tek bir etiyolojik nedenden kaynaklanmadığını ve birden fazla durumun ense kalınlığı artışı

bulgusuna sebep olduğunu düşündürmektedir. Alta yatan patogenez kardiyak malformasyon ve disfonksiyonlar, baş ve boyun bölgesindeki venöz konjesyon, hücre dışı matriks değişiklikleri, lenfatik damar hipoplazisi ve konjenital fetal enfeksiyon başlıkları altında incelemek incelenebilmektedir.

#### **2.4.3.1. Kardiyak Malformasyon ve Disfonksiyonlar:**

Gebeliğin 10 ile 14. haftasında ense kalınlığı artışı sebebiyle takip edilen ve cerrahi olarak sonlandırılan 112 kromozomal anomalili fetüs Hyett ve arkadaşları tarafından incelendiğinde, vakaların büyük kısmında kardiyak veya büyük arter anomalilerinin bulunduğu tespit edilmiştir (108). Yapılan çalışmada kromozomal hastalıklarda sık tespit edilen kardiyak ve büyük arter anomalileri Trizomi 21 için ASD ve VSD; Trizomi 18 için VSD ve polivalvüler anomalileri; Trizomi 13 için ASD, VSD, valvüler anomaliler ve isthmus/trunkus arteriosus darlığı; Turner Sendromu için tüm aortik arkın darlığıdır. Ayrıca Trizomi 21,18,13 ve Turner Sendromlu fetüslerde aortik isthmusun normal fetüslere göre anlamlı olarak daha dar olduğu tespit edilmiş ve NT ölçümü ne kadar yüksekse darlığın o kadar fazla olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler göz önünde bulundurularak Hyett ve ark. tarafından Trizomi 21, 18, 13 ve Turner Sendromlu fetüslerde tespit edilen ense kalınlığı artışının aortik isthmus darlığına bağlı olduğu öne sürülmüştür. Trizomi 21 ve Trizomi 18’li fetüslerde aortik isthmus darlığı asendan aortun genişlemesiyle birlikte gözlemlenmektedir. Asendan aortanın genişliğine bağlı olarak baş ve boyun bölgesine giden kan akışının damar çapına bağlı artmasının, bu bölgede oluşan ödemi açıklamasının muhtemel olabileceği belirtilmiştir. Gebeliğin ilerlemesiyle aortik isthmus çapının, aort kapağı ve distal duktus çaplarından daha hızlı artması hemodinamik instabilitenin düzelmesini sağlayabilir (109, 110). Vasküler direncin Hagen–Poiseuille denklemine ( $V = \pi p r^4 / 8 \eta l$ ) yarı çapın 4. kuvvetinin alınması temel alındığında damar yarıçapında olan ufak değişikliklerin bile direnç üzerine yaptığı büyük etki, 14. haftadan sonra azalan veya ölçülemez hale gelen NT kalınlığında rol oynuyor olabilir. Bu hipotez, Down Sendromlu fetüslerin takiplerinde gözlemlenen, 11. gestasyonel haftada fetüslerin %70’inde tespit edilen ense kalınlığı artışının 20. haftaya gelindiğinde vakaların sadece %30’unda tespit edilmesini açıklaması mümkündür. Fakat

Trizomi 13 ve Turner Sendromu kromozomal anomalilerine sahip fetüsler incelendiğinde isthmus darlığına asendan aort genişliğinin eşlik etmediği aksine fetüslerde asendan aortanın daraldığı görülmektedir. Bu fetüslerde tespit edilen ense kalınlığı artışı baş boyun bölgesi perfüzyon artışı ile ilişkilendirilmesi bu nedenle mümkün olmamaktadır (108). Bu iki sendromdan Turner Sendromlu fetüslerin internal juguler vene lenfatik akışın bozulması sebebiyle genişlemiş jugular lenfatik keselere sahip olması ense kalınlığı artışının altta yatan sebebi olarak önerilmektedir (108). Ayrıca bu olgularda tespit edilen aort koarktasyonu, kardiyak sol çıkım obstrüksiyonu benzeri kardiyak malformasyonların genişlemiş intratorasik lenfatik kanalların asendan aorta baskı yapması sonucu kalp üzerinde oluşturdıkları hemodinamik etkiler nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüştür (111). Bu sebeplerle 10-14 gebelik haftalarında tespit edilen artmış ense kalınlığı Hyett ve ark. tarafından majör kardiyak defekt için tarama endikasyonu olarak önerilmiştir (76, 84).

Ense kalınlığı artışı ve kardiyak malformasyon arasındaki ilişki incelendiğinde normal karyotipe sahip fetüslerde kardiyak malformasyon riskinin ölçülen ense kalınlığı ile doğru orantılı logaritmik arttığı görülmektedir. Yapılan birçok farklı çalışmadan kombine edilen veriler incelendiğinde majör kardiyak defekt prevalansının NT <3,5 mm olan fetüslerde %1-2, NT 3,5-4,4 mm olan fetüslerde %3, NT 4,5-5,4 mm olan fetüslerde %7, NT 5,5-6,4 mm olan fetüslerde %20, 6,5 mm ve üzerinde ölçülen fetüslerde ise %30 olduğu gözlemlenmiştir (84).

Bu bilgiler ışığında yine de büyük arter anomalileri ve yapısal kardiyak defektler ile artmış ense kalınlığı arasındaki ilişkiye ait kanıtlar yetersiz görünmektedir. Huggon ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada normal, NT artışı tespit edilmiş ve kromozomal anomali tespit edilmiş fetüslerde miyokardiyal performans indeksi, atrioventriküler E ve A dalgalarının zirvelerindeki akış hızları fetal ekokardiyografi ile incelenmiş ve kardiyak disfonksiyonun ense kalınlığı artışına sebep olabileceğine yönelik herhangi bir kanıt elde edilememiştir (112). Haak ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise ense kalınlığı artışı olan fetüsler ile normal fetüsler karşılaştırılmış ve intrakardiyak kan akış hızlarında herhangi bir fark gözlemlenmemiştir. Yapılan çalışma

sonucunda ortak patofizyolojik yolağın ense kalınlığı artışının yanında kardiyovasküler malformasyonlara da sebep olduğu öne sürülmüştür (113).

#### **2.4.3.2. Baş ve Boyun Bölgesinde Venöz Konjesyon:**

Ense kalınlığı artışına etiyolojisinde rol oynadığı düşünülen etmenlerden bir diğeri baş ve boyun bölgesindeki venöz konjesyon teorisidir. Mediastinal basınç artışına bağlı venöz dönüşün azalması nedeniyle NT artışının gerçekleştiği ileri sürülmektedir (114-116). Bu duruma sebep olabilecek durumlara örnek olarak diyafram hernisi, özofageal atrezi ve iskelet displazileri verilebilir. Konjenital diyafram hernisi sonucunda abdominal organların mediastene hernisi intratorasik basınç arttırmakta ve bu durum bozulan venöz dönüş sonucunda ense kalınlığı artışı ile sonuçlanmaktadır (116). Özofagus atrezisi hastalarında ise atrezik kısmın distansiyonu baş ve boyundaki büyük damarlara baskısı sonucu venöz konjesyona sebebiyet verdiği düşünülmektedir (115). Bir diğer örnek olan iskelet displazilerinde toraksın büyümesindeki problemlerin neden olduğu intratorasik basınç artışının ense kalınlığı artışına yol açtığı öne sürülmektedir (117).

Diyafram hernisi olan vakaların %40'ında obstetrik takipler sırasında 10 ile 14'üncü haftalar arasında NT kalınlığı artışı tespit edilmektedir (116). Gözlemlenen NT artışının in utero ex olan fetüslerin %80'nin görülmesi, doğuma ilerleyen fetüslerin ise %20'sinde gözlemlenmesi, ense kalınlığı artışının oluşan herniasyonun ağırlığı hakkında bilgi verici olabileceğini işaret etmektedir. Bu vakalarda uzun süre devam eden artmış intratorasik basınç pulmoner hipoplaziye de sebebiyet vermektedir. Bu durum özellikle in utero ex olan fetüslerde NT artışının daha sık tespit edilmesini açıklayabilir. İyi prognozlu diyafram hernilerinde ise viseral herniasyonun gebeliğin 20. haftası gibi daha ileri dönemlerde gözlenmesi, pulmoner fonksiyonun korunmasına ve NT artışı görülmemesini açıklayabilir (118). Alternatif bir diğer hipotez ise, tüm diyafram hernisi vakalarında, 11. hafta itibariyle intratorasik herniasyon olduğu, ancak artmış ense kalınlığının yalnızca pulmoner hipoplaziye neden olacak kadar şiddetli akciğer kompresyonu olanlarda gözlemlendiğidir.

Ense kalınlığı artışı iskelet displazilerinin tüm tiplerinde gözlemlenmemektedir. Bu fenotip torasik büyümenin etkilendiği ve buna bağlı intratorasik basıncın arttığı iskelet displazilerinde daha sık tespit edilmektedir. Ense kalınlığı artışının bu olgulardaki tespiti, iskelet displazilerindeki patofizyolojinin genellikle intratorasik basınç artışına bağlı gelişen baş ve boyun bölgesindeki venöz konjesyon ve/veya kardiyak disfonksiyona bağlı olabileceğini düşündürmektedir (117). Fakat dar toraks gözlemlenmeyen iskelet displazilerinde de ense kalınlığı artışı tespit edilmektedir. Örneğin osteogenezis imperfekta olgularında dar toraks görülmemekle birlikte ense kalınlığı artışının saptanması mümkündür. Bu olgularda ense kalınlığı artışına ekstrasellüler matriks kompozisyonundaki değişimlerin neden olduğu düşünülmektedir. Dar toraks gözlemlenmeyen iskelet displazilerinde de ense kalınlığı artışı bulgusunun saptanması altta yatan birden fazla patofizyolojik yolağa işaret etmektedir. Patofizyolojinin açıklanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **2.4.3.3. Hücre Dışı Matriks Değişiklikleri:**

Ekstrasellüler matriks hücrelerin arasında bulunan, dokuda bulunan hücrelere fiziksel destek sağlayan yapı olarak tanımlanmaktadır. Bu yapı hücrelerin farklılaşma, proliferasyon, göç, tutunma ve difüzyon fonksiyonlarının gerçekleşmesi için gereklidir. Ayrıca bu yapı büyüme faktörleri gibi hücre için hayati önem taşıyan maddeler için depo görevi de görmektedir. Ekstrasellüler matriks bulunan ana biyomoleküller proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve kolajenlerdir. Hücreler ise bu matrikse ve birbirlerine integrin grubu moleküller ile bağlanırlar (fibronectin, laminin vb.). Ekstrasellüler matriksi oluşturan yapılardan bazıları yüzey reseptörü olarak da görev yapmaktadır. Bu durum hücre matriks etkileşimini ve sinyal iletimini sağlamaktadır. Ekstrasellüler matriks bahsedilen tüm bu görevleri ile hücrelerin doğru yerleşimini, doku organizasyonunun korunumunu sağlayarak sağlıklı doku gelişiminde rol oynamaktadır. Bu nedenle dokuyu oluşturan maddelerin yapısında, fonksiyonunda veya organizasyonundaki değişimlerin NT kalınlığı artışında rol oynadığı düşünülmektedir.

Ekstrasellüler matriksin protein komponentleri temel olarak 21, 18 ve 13 numaralı kromozomlar tarafından kodlanmaktadır. Kromozomal olarak anomalilerde yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, bu olgularda kolajen I, III, IV, V, VI, laminin ve fibronektine ait spesifik farklılıklar göstermiştir. Bu değişimlerin bir bölümünün gen dozaj etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (119, 120). Trizomi 21 fetüslerin dermisinde kolajen VI zenginliği, Trizomi 13 fetüslerin dermisinde kolajen IV fazlalığı, Trizomi 18 fetüslerin dermisinde ise lamininin fazlalığı fazla bulunan kromozomun sebep olduğu gen-dozaj etkisi ile açıklanabilmektedir (119). Ekstrasellüler matriksdeki bu değişimlerin dokunun bütüncül yapısını bozması ve ense arkasında sıvı birikimini kolaylaştırması muhtemeldir.

Ekstrasellüler matriksin diğer bir ana biyomolekülü olan kolajen proteini  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ve  $\alpha 3$  polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Down Sendromlu fetüslerde kolajen VI zenginliğine ek olarak kolajen VI molekülünün dokularda mikrofibril yapıya sahip olduğu görülmektedir. Bu durumun kolajen VI proteinini kodlayan ve 21. kromozomda bulunan *COL6A1* ve *COL6A2* genlerinin Down Sendromunda üç kopya bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Down Sendromlu fetüslerin nokal derisi incelendiğinde 21. kromozomda bulunan *COL6A1* gen ekspresyonunun 2. kromozomda bulunan *COL6A3* gen ekspresyonuna oranının, normal fetüslerden 2 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (119). Kolajen VI'nın dokuda sıvı tutabilen hyaluronik asite bağlandığı bilinmektedir. Trizomi 21 fetüslerinin derisi incelendiğinde normal fetüslere göre artmış miktarda hyaluronan biyomolekülü olduğu tespit edilmiştir. Yapılan aynı çalışmada kan ve lenf damarlarında hiperplazi veya genişleme görülmemesi araştırmacılara ense kalınlığı artışını yüksek miktarda bulunan hyaluronan'a bağlı interstisyel ödem olduğunu düşündürmüştür (121, 122). Ayrıca postnatal dönemde hyaluronik asit artışına sebep olan romatolojik hastalıklarda da interstisyel ödem artışının bulunması, Down Sendromlu fetüslerde artan kolajen VI'nın NT artışının sebebi olabileceğini desteklemektedir (123).

Kolajen VI artışı ve NT kalınlığı artışı arasındaki diğer bir bağlam ise kardiyak fonksiyon anomalileri ve/veya kardiyak yapısal bozukluklardır. Kolajen VI tarafından

fazla miktarda bağlanan hyaluronik asit, diğer proteinler vasıtasıyla agrekan monomerlerine bağlanarak dokudaki miktarlarını arttırmaktadır. Dokuda yüksek miktarda agrekan molekülünün hücre migrasyonunu bozduğu daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (124). Bu durumun Down Sendromlu fetüslerde fibroblast yapışkanlığı artışı nedeniyle hücre göçünün azalmasına bağlı gelişen atrioventriküler septal defektler, endokardiyal yastık füzyon anomalileri ile ense kalınlığı artışına yol açması muhtemeldir (125, 126).

Ekstrasellüler matriksin yapısal değişiklikleri, kromozom anomalileri dışında ense kalınlığına sebep olan diğer genetik hastalıklarda görülmektedir. Bu hastalıklara örnek olarak Akondrogezezis tip II, Nance-Sweeney Sendromu, Osteogenezezis İmperfekta tip II hastalıklarında kolajen metabolizmasının bozukluğu, Akondroplazi ve Tanatoforik Displazide anormal fibroblast reseptör sinyali, Zellweger Sendromunda peroksizom biyogenezezindeki bozukluklar verilebilir (127). Ekstrasellüler matrikste görülen bu değişimlerin ense kalınlığı artışına olan etkisi halen net olmamakla birlikte gelecekte yapılacak çalışmalar ile açıklanabilecektir.

#### **2.4.3.4. Lenfatik Damar Hipoplazisi:**

Günümüzde yapılan ultrasonografi taramalarından önce spontan düşük ile sonuçlanmış gebeliklerde kistik higroma varlığı gözlemlenmiştir. Bu dönemde Monozomi X Sendromunda yapılan çalışmalar ile hem ana lenfatik trunk hem de periferik lenfatik sistemde çeşitli anomaliler tespit edilmiştir. Kistik higroma gelişimi bu anomaliler sonucunda gelişen lenfatik drenajın bozukluğu ve jugular lenfatik kese malformasyonlarından kaynaklandığı düşünülmüştür (128).

Chitayat *ve ark.* tarafından yapılan çalışmada Monozomi X, Trizomi 21, Trizomi 13 ve kromozom analizi normal olan fetüslerin nukal bölge dokuları lenfatik morfoloji açısından incelenmiştir. Yapılan çalışmada Monozomi X'li fetüslerdeki kistik higroma duvarlarının endotel hücreleri tarafından, diğer incelenen fetüslerde ise bağ doku tarafından oluşturulduğu görülmüştür. Bağ dokusu tarafından oluşturulan kistik higroma kavitesinin daha küçük olduğu da bu çalışmada dikkat çekmiştir. Ayrıca yapılan

çalışmada incelenen periferik lenfatik sistemin Monozomi X olgularında hipoplazik diğer fetüslerde ise dilate ve hiperplazik olduğu gözlemlenmiştir. Bu bilgiler Monozomi X olgularında oluşan kistik higromanın venöz sistem ile juguler lenfatik sistemin arasındaki bağlantının geç kurulmasından kaynaklandığı ve bu fetüslerde görülen jeneralize ödemin lenfatik damar hipoplazisi sebebiyle olduğu düşündürmüştür (129). Daha sonra von Kaisenberg tarafından yapılan immünohistokimyasal çalışmalar ile de Monozomi X olgularında lenfatik hipoplazi olduğu doğrulanmıştır (130). Bu fetüslerde ek olarak dermis-subkutis sınırında çok sayıda genişlemiş damar olduğu üst dermiste ise lenfatik damarın hipoplazik olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bu iki çalışmada ayrıca Trizomi 21, Trizomi 18, Trizomi 13 sendromlu fetüslerde nukal lenfatik damar dağılımının normal fetüslerle fark göstermediği ve Trizomi 21, Trizomi 18, Trizomi 13 sendromlu fetüslerde dermis ve subkutis bölgelerinde eşit dağılan PTN63-pozitif, laminin-pozitif ve FLT-4-pozitif damarların bulunduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak elde edilen bulguların ışığında Turner Sendromlu fetüslerde ense kalınlığı artışından lenfatik hipoplazinin sorumlu olduğu; diğer trizomik fetüslerde ise ense kalınlığı artışının lenfatik hipoplaziye bağlı olmadığı düşünülmüştür.

Turner Sendromlu fetüslerde tespit edilen lenfatik hipoplazinin nedenlerinden incelendiğinde X kromozomu üzerinde bulunan *BMX* geninin haplo yetmezliği dikkat çekmektedir. *BMX* geni *BMX* tirozin kinaz proteinini kodlamaktadır ve insanda birçok farklı dokudaki endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir. *BMX* haplo yetmezliğinin vasküler büyüme faktörlerinin endotel üzerindeki etkisini azaltması lenfatik hipoplazide rol oynaması lenfatik hipoplazinin altında yatan nedenlerden biri olması muhtemeldir (131).

Normal fetal lenfatik yapılar incelendiğinde jugular keseler erken juguler venlerden köken almakta ve ardından izole bir şekilde boynun anterolateral kısmına yerleşmektedir. Ardından gerçekleşen izolasyon döneminden sonra juguler keseler juguler lenf nodlarına dönüşmekte ve yeniden juguler ven ile bağlantı kurmaktadır (132). Bu gelişim normal embriyolarda 10. gebelik haftasında tamamlanmaktadır. Artmış ense kalınlığı ölçümlerinin altında yatan diğer bir etiyolojik nedenin jugular

lenfatik yapıların gelişimdeki bozukluklar veya gelişim süresindeki aksamalar olduğu düşünülmektedir. Bekker *ve ark.* tarafından yapılan çalışmada ense kalınlığı artışı bulunan fetüsler ile sağlıklı kontroller transvajinal ultrasonografi ile incelenmiş, ense kalınlığı artışı ve genişlemiş jugular kese arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Bu bulgu sonucunda araştırmacılar tarafından ense kalınlığı artışının sebebi olarak lenfanjiogenez sürecindeki bozukluklardan kaynaklandığı öne sürülmüştür (133).

Genişlemiş juguler lenfatik keseler insan dışında Down Sendromunun fare modeli olarak kullanılan trizomi 16 kromozomal anomaliye sahip farelerde de tespit edilmiştir (134). Trizomi 16'lı farelerde yapılan ileri morfolojik çalışmalarda juguler kese genişlemesi görülen fareler, juguler kese genişlemesi görülmeyen fareler ile karşılaştırıldığında kese duvarını oluşturan endotel differiasyonun kese genişlemesi görülen olgularda bozulduğunu tespit etmiştir (135). Ayrıca çalışmalarda endotel defekti gösteren farelerde ödemle ilişkili VEGF-A artışı ve lenfatik genişleme ile ilişkilendirilmiş podoplanin azalışı ve NCAM ekspresyon artışı da gözlemlenmiştir (136-138). Bu sebeple ense kalınlığı tespit edilen fetüslerde bulunan diğer anomalilerin de vaskülogenez ve nöroenez arasındaki ilişkinin bozulmasından kaynaklanabileceği düşünülse de konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **2.4.3.5. Konjenital Fetal Enfeksiyon:**

İlk trimestırda ense kalınlığı ile başvurmuş, karyotipi normal 426 fetüs ile yapılan çalışmada, annelerin sadece %1,5 inde yeni geçirilmiş enfeksiyon tespit edilmiş, fetüslerde ise TORCH enfeksiyonu tespit edilmemiştir (139). Bu durum ilk trimestırda ense kalınlığı ile başvuran olgularda TORCH enfeksiyonu ihtimalinin normal popülasyondan farklı olmadığını ortaya koymuştur. İkinci ve üçüncü trimestırda hidrops fetalis tespit edilen gebeliklerde ise artmış fetal enfeksiyonların tespit edildiği bilinmektedir (140). Abrams *ve ark.* yaptığı bir çalışmada 598 hidrops fetalis tanısı alan fetüs doğuma ulaştıklarında yenidoğan ünitesinde etiyolojik açıdan incelenmiştir. Hidropsa sebep olan vakaların parvovirüs enfeksiyonu sebebiyle geliştiği görülmüştür. Bu vakalarda 12. gebelik haftasında yapılan ultrasonografi bakılarında ense hidrops

bulgularının içerisinde ense kalınlığı artışı da gözlemlenmiştir. Takiplerinde olguların ense kalınlığı artışının ikinci trimestırda gerilediğı ve üç fetüsünde sağlıklı olarak doğduğı belirtilmiştir. Çalışmada bu fetüsler için ense kalınlığı artışının, myokardın parvovirus enfeksiyonuna bağı geçici akut kalp yetmezliğı nedeniyle geliştiğı öne sürülmüştür (141). Bu sebeple yazarlar tarafından kromozomal anomali tespit edilmemiş ilk trimestır ense kalınlığı artışı bulunan vakalara, durum ikinci veya üçüncü trimester de devam etmedikçe ya da fetal hidrops görülmedikçe maternal enfeksiyon taraması önerilmemiştir. Yapılan çalışmalar ense kalınlığının etiyolojisinde parvovirüsün rol oynayabildiğı fakat ense kalınlığı artışının izole vaka olması durumunda anlamlı bir etiyolojik sebep olarak görülemeyeceğini düşündürmektedir.

## **2.5. Hidrops Fetalis**

### **2.5.1 Tanım**

Hidrops fetalis fetal ekstrasvasküler alanda ve vücut boşluklarında sıvı birikimi olarak tanımlanmaktadır. Prenatal dönemde hidrops cilt kalınlığının >5 mm olması, perikardiyal efüzyon, plevral efüzyon ve batında asit görünümüleri ile karakterize olmaktadır. Ek olarak plasentanın 6 mm'den kalın olması ve/veya polihidramnios hidrops görünümüne eşlik edebilmektedir (21). Günümüzde fetal hidrops “Society for Maternal–Fetal Medicine” tarafından en az 2 ayrı bölgede patolojik sıvı toplanması olarak ifade edilse de bu tanımlama yeterince desteklenmemektedir. Bu durumun nedeni olgularda altta yatan genetik sebeplere bağı sadece tek bir bölgede anormal sıvı toplanması görülebildiğı gibi gestasyonel haftanın ilerlemesi ile birlikte görülen anormal sıvı toplanması tipinin değişebilmesidir (10, 11, 14-19).

Hidrops fetalis etiyolojik olarak immün ve immün olmayan olarak ikiye ayrılmaktadır. İmmün hidrops fetalise anne ile fetüsün Rh antijen uyumsuzluğu sebep olmaktadır. Bu durumda annenin Rh negatif fetüsün ise Rh pozitif olması gerektirmektedir. Rh negatif annelerin rutin immünizasyonu öncesinde hidrops vakalarının büyük çoğunluğu Rh alloimmünizasyonu sebebiyle görülmekteyken günümüzde immün olmayan hidrops fetalis vakaları daha sık görülen hidrops türü haline

gelmiştir. Tüm hidropslar incelendiğinde immün olmayan hidrops fetalis tüm hidrops vakalarının %76–87’sini oluşturduğu görülmektedir ve insidansı 1/1700 ile 1/3000 olarak tanımlanmaktadır (10-13, 20). İmmün olmayan hidrops fetalis olguları günümüzde takip ve tanı alanlarında olan gelişmelere rağmen yüksek mortalite oranlarına sahiptir (141). Bu olgularda ölü doğumun, düşük, preterm doğum, neonatal komplikasyonların ve ölüm riski yüksektir. Olgularda ayrıca Mirror Sendromuna bağlı preeklampsi nedeniyle de artmış obstetrik komplikasyon riski bulunmaktadır (10-13).

İmmün olmayan hidrops fetalis değerlendirmesinde “Society for Maternal & Fetal Medicine” tarafından yayınlanan kılavuzlar kullanılmaktadır. Bu kılavuzlarda fetal Doppler, fetal ekokardiyografi, fetal karyotip veya kromozomal mikrodizileme gibi incelemelerin yanında genetik etiolojinin açıklanması için metabolik depo hastalıkları, hemoglobinopatiler, iskelet displazileri ve eritrosit enzimopati hastalıklarına yönelik genetik testlerin kullanılması önerilmektedir (10, 142). Bu öneriler farklı etiyolojik antitelere yönelik olup İOHF olgularının altında yatan geniş etiyolojik yelpazeyi yansıtmaktadır. Yine de yapılan testler sonucu olguların yaklaşık yarısı tanı alamamaktadır. Olguların tanı alması gebeliklerin yönetiminin sağlanması, neonatal dönemdeki ihtiyaçların tespit edilmesi ve hızlı cevaplanması, ailelere genetik danışma verilmesi ve tekrar riskinin hesaplanması açısından önem arz etmektedir.

### 2.5.2 Genetik

İmmün olmayan hidrops fetalis olgularında genetik etiolojiler rol oynamaktadır. İmmün olmayan hidrops fetalis birçok genetik sendromun bulgusu olarak ortaya çıkan ağır bir prezentasyondur. Trizomi 13, Trizomi 18, Monozomi X, Trizomi 21, 69,XXX/69,XXY/69,XYY gibi kromozomal anomaliler, 22q11 Mikrodelesyon, CHARGE Sendromu, 9q Duplikasyonu gibi mikroddelesyon/mikroduplikasyon hastalıkları ve Noonan Sendromu, Niemann–Pick tip C gibi tek gen hastalıkları farklı genetik etiyojileri oluşturmaktadır. Rutin yapılan karyotipleme ve/veya kromozom mikrodizileme analizleri ile olguların ortalama %25’i tanı alabilmektedir (14-16, 20-23). Bu testlerin tespit edemediği tek gen hastalıklarının immün olmayan hidrops fetalis

etiyojijisindeki katkıısı net olarak bilinmemektedir. İmmün olmayan hidrops fetalise sebep olan genetik hastalıklar hastalık şiddet açısından da geniş bir spektrum göstermektedir. Tespit edilen genetik etiyojijilerden bazıları uzun dönemde hafif sonuçlara neden olurken diğlerleri tedaviye rağmen lethal seyretmektedir (14-15, 25-27). İmmün olmayan hidrops fetalis olgularında literatürde mutasyon tespit edildiğı bildirilmiş yaklaşık 164 gen bulunmaktadır. Bu genler Tablo-1’de özetlenmiştir (14).

Sparks ve ark. tarafından yapılan çalışmada immün olmayan hidrops fetalis olarak tanımlanan, ense kalınlığı artışı (>3.5 mm), kistik higroma, plevral efüzyon, perikardiyal efüzyon, asit, cilt ödemi bulgularından biri veya birkaçına sahip vakalara tüm ekzom dizileme çalışılmış olguların %29’unda tanı koydurucu genetik varyant, %9 ‘unda ise potansiyel klinik önemi olan değışim saptanmıştır (19). Tespit edilen varyantlar arasında RASopatiler olarak tanımlanan hastalıklara neden olan RAS–MAPK hücre sinyal yolağına ait değışimler en büyük grubu (%30) oluşturmaktadır. Metabolik hastalıklar ve muskuloskeletal hastalıklar %11’ni, lenfatik, nörogelişimsel, kardiyovasküler ve hematolojik bozuklukların her biri ise tespit edilen varyantların %8’sini oluşturmaktadır. Çalışmanın tanı oranı anomali seçilimi yapılmaksızın yapılan fetal ekzom çalışmalarındaki tanı oranından (%8,5-10) daha yüksek tespit edilmiştir. Bu durum tek gen hastalıklarının İOHF olgularının etiyojijisinde diğler fetal yapısal anomalilere göre görece daha büyük paya sahip olduğunu düşündürmektedir.

|                |                  |                 |                |               |                |
|----------------|------------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
| <i>ALG1</i>    | <i>ALG9</i>      | <i>ALPK3</i>    | <i>B9D1</i>    | <i>B9D2</i>   | <i>BSND</i>    |
| <i>CA2</i>     | <i>CBL</i>       | <i>CC2D2A</i>   | <i>CCBE1</i>   | <i>CDAN1</i>  | <i>CEP</i>     |
| <i>CEP120</i>  | <i>CEP290</i>    | <i>CHRNA1</i>   | <i>CHRND</i>   | <i>CHRNA1</i> | <i>CLCN7</i>   |
| <i>CLCNKA</i>  | <i>CLCNKB</i>    | <i>COL1A1</i>   | <i>COL1A2</i>  | <i>COL2A1</i> | <i>CRTAP</i>   |
| <i>CSPP1</i>   | <i>CTSA</i>      | <i>DHCR7</i>    | <i>DMPK</i>    | <i>DOK7</i>   | <i>DYNC2H1</i> |
| <i>ESCO2</i>   | <i>FAT4</i>      | <i>FIG4</i>     | <i>FGFR3</i>   | <i>FLVCR2</i> | <i>FOXC2</i>   |
| <i>FOXP3</i>   | <i>FRAS1</i>     | <i>FREM2</i>    | <i>G6PD</i>    | <i>GALNS</i>  | <i>GATA1</i>   |
| <i>GATA2</i>   | <i>GATA5</i>     | <i>GBA</i>      | <i>GLB1</i>    | <i>GNPTAB</i> | <i>GPI</i>     |
| <i>GRIP1</i>   | <i>GUSB</i>      | <i>HBA1</i>     | <i>HBA2</i>    | <i>HBB</i>    | <i>HDAC8</i>   |
| <i>HRAS</i>    | <i>IFT80</i>     | <i>IFT122</i>   | <i>IFT140</i>  | <i>IFT172</i> | <i>IKBKKG</i>  |
| <i>ITGA9</i>   | <i>ITGB3</i>     | <i>KCNH2</i>    | <i>KCNJ1</i>   | <i>KCNQ1</i>  | <i>KDM6A</i>   |
| <i>KMT2D</i>   | <i>LAMB2</i>     | <i>LBR</i>      | <i>LIPA</i>    | <i>MAP2K2</i> | <i>MID1</i>    |
| <i>MKKS</i>    | <i>MKS1</i>      | <i>MUSK</i>     | <i>MVK</i>     | <i>NEK1</i>   | <i>NEU1</i>    |
| <i>NIPBL</i>   | <i>NPC1</i>      | <i>NPC2</i>     | <i>NPHS1</i>   | <i>NPHS2</i>  | <i>OFD1</i>    |
| <i>OSTM1</i>   | <i>P3H1</i>      | <i>PEX1</i>     | <i>PEX2</i>    | <i>PEX3</i>   | <i>PEX5</i>    |
| <i>PEX6</i>    | <i>PEX10</i>     | <i>PEX11B</i>   | <i>PEX12</i>   | <i>PEX13</i>  | <i>PEX14</i>   |
| <i>PEX16</i>   | <i>PEX19</i>     | <i>PEX26</i>    | <i>PHGDH</i>   | <i>PIEZO1</i> | <i>PIK3CA</i>  |
| <i>PKHD1</i>   | <i>PKLR</i>      | <i>PLEKHM1</i>  | <i>PMM2</i>    | <i>PRKAG2</i> | <i>PSAT1</i>   |
| <i>PSPH</i>    | <i>PTPN11</i>    | <i>RAD21</i>    | <i>RAF1</i>    | <i>RAPSN</i>  | <i>RASA1</i>   |
| <i>RIT1</i>    | <i>RPGRIP1L</i>  | <i>RPL5</i>     | <i>RPL11</i>   | <i>RPL15</i>  | <i>RPL26</i>   |
| <i>RPL27</i>   | <i>RPL31</i>     | <i>RPL35A</i>   | <i>RPL36</i>   | <i>RPS7</i>   | <i>RPS10</i>   |
| <i>RPS15</i>   | <i>RPS17</i>     | <i>RPS19</i>    | <i>RPS24</i>   | <i>RPS26</i>  | <i>RPS27</i>   |
| <i>RPS28</i>   | <i>RPS29</i>     | <i>SCN5A</i>    | <i>SEC23B</i>  | <i>SGPL1</i>  | <i>SHOC2</i>   |
| <i>SLC12A1</i> | <i>SLC17A5</i>   | <i>SLC26A2</i>  | <i>SLC35D1</i> | <i>SMC1A</i>  | <i>SMC3</i>    |
| <i>SMPD1</i>   | <i>SOS1</i>      | <i>SOX18</i>    | <i>TAZ</i>     | <i>TCIRG1</i> | <i>TMEM216</i> |
| <i>TMEM67</i>  | <i>TNFRSF11A</i> | <i>TNFRSF11</i> | <i>TRIP11</i>  | <i>TSC1</i>   | <i>TSC2</i>    |
| <i>TSR2</i>    | <i>TTC21B</i>    | <i>UROS</i>     | <i>VEGFR3</i>  | <i>WDR19</i>  | <i>WDR34</i>   |
| <i>WDR35</i>   | <i>WDR60</i>     |                 |                |               |                |

**Tablo-1:** İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) olgularında mutasyon tespit edilen literatürde bildirilmiş genler (14).

### 2.5.3 Patogenez

İmmün olmayan hidrops fetalis etiyolojisi incelendiğinde farklı hastalıkların veya durumların fenotipin gelişiminde rol oynadığı görülmektedir. İmmün olmayan hidrops fetalis olgularının etiyolojileri fetal, plasental, maternal başlıkları altında incelenebilir. Olguların farklı etiyolojilere sahip olması altta yatan patogenezdeki çeşitliliği de yansıtarak tek bir patofizyolojik yolak ile tüm İOHF olgularının açıklanamamasına sebep olmaktadır.

Bellini ve ark. tarafından yapılan çalışmada İOHF ile ilgili yayınlar incelenmiş ve etiyolojik sebepler 14 başlık altında toplanmıştır. Bu başlıklar ve etiyolojik oranlarının sırasıyla: kardiyovasküler (%21,7), kromozomal (%13,4), hematolojik (%10,4), enfeksiyonlar (%6,7), torasik (%6), lenfatik displazi (%5,7), ikizden ikize transfüzyon sendromu-plasental (%5,6), üriner sistem malformasyonları (%2,3), metabolik (%1,1), toraks dışı tümörler (%0,7), gastrointestinal (%0,5), diğer (%3,7), idiopatik (%17,8) olduğu tespit edilmiştir (20).

İmmün olmayan hidrops en sık kardiyovasküler hastalıklara bağlı gelişmektedir. Hidropsa neden olan kardiyovasküler hastalıklar yapısal anomaliler ve/veya kardiyak fonksiyon bozukluklarından kaynaklanmaktadır (143). Yapısal kardiyak anomaliler sağ atriyal basıncın artışı veya volüm yüküyle sağ kalp konjesyonu oluşturarak santral venöz basıncı arttırarak veya venöz/arteriyel kan akımını bozarak hidrops fenotipini ortaya çıkarmaktadır. Kardiyak fonksiyon bozukluklarında ise ventriküler diyastol dolum defektlerine bağlı santral venöz basıncın artışı hidropsa sebebiyet vermektedir. Ek olarak kardiyovasküler hastalıklara sebep olan etiyolojilerin bir kısmında görülen hepatik konjesyon, hipoalbuminemi ile hidrops fenotipinin gelişiminde rol oynamaktadır.

İmmün olmayan hidropsa sebep olan bir başka etiyolojik neden hematolojik bozukluklardaki anemidir. Bu olgularda anemi sonucu gelişen kardiyak yetmezlik ve ekstramedüller hematopoez nedeniyle gelişen karaciğer fonksiyon bozukluğu hidrops fetalis fenotipini geliştirmektedir. Hidrops fenotipinin gelişmesinde altta yatan hematolojik hastalığın gelişim hızı da önem taşımaktadır. Hızlı gelişen anemi sonucunda fetal kayıp gözlemlenirken, yavaş gelişen fetal anemi hidrops fenotipini oluşturur (144).

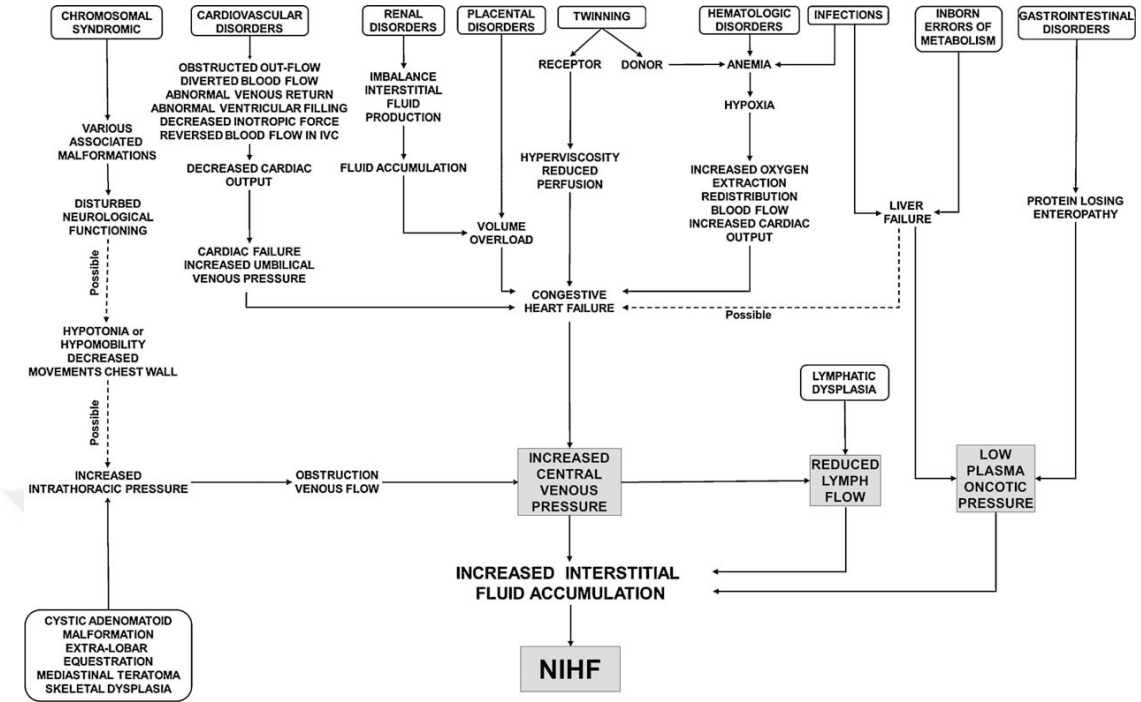
Doğumsal metabolizma hastalıklarında hematolojik hastalıklara benzer patofizyoloji görülmektedir. Olgulardaki anemi ve karaciğer yetmezliğinin hematolojik hastalıklarda görülen patofizyolojik yollara benzer sebepler ile hidrops fetalis fenotipine yol açması muhtemeldir. Lenfatik displazilere gelindiğinde ise bozulan lenfatik drenaja bağlı, doku içerisindeki aşırı sıvı birikimi, hidrops fetalis fenotipinden sorumlu tutulmaktadır.

İmmün olmayan hidrops fetalis akciğerin konjenital kistik malformasyonları, diyafragma hernisi, arteriovenöz malformasyonlar ve intratorasik kitleler ile de görülebilmektedir. Bu olgularda artmış intratorasik basınca bağlı venöz dönüş bozukluğu ve/veya kardiyak basıya bağlı gelişen kardiyak disfonksiyonun İOHF fenotipine yol açtığı düşünülmektedir.

Bu anomaliler ve hastalıklar haricinde birçok fetal enfeksiyon İOHF ile ilişkilendirilmiştir. Bu enfeksiyonların ortak özellikleri kemik iliği, miyokard ve endotel hücrelerini enfekte etmeleridir. Bu olgularda altta yatan patofizyolojinin, enfeksiyonun türü ile farklılık gösterse de kalp yetmezliği, anemi, fetal sepsise bağlı anoksi, endotelial hücre hasarı ve kapiller geçirgenliğin artışı durumlarının bir veya birkaçının birlikteliği ile olduğu düşünülmektedir (145).

İkizden ikize transfüzyon sendromu hidropsa sebep olan etiyolojilerden bir diğeridir ve patofizyolojik olarak alıcı ile verici arasında olan dengesiz kan akımından kaynaklanır. Yapılan çalışmalar ile patofizyolojisi tamamen aydınlatılamamış olsa da total volümün dengesiz dağılımı ile artan venöz basınç hidrops kliniğinden sorumlu tutulur (146-148).

Bütün bu bilgiler ışığında hidropsa sebep olan etiyolojik yollar Şekil-1’de özetlenmiştir. Fakat immün olmayan hidrops fetalise sebep olan altta yatan etiyolojik neden ile fenotipe neden olan patofizyolojik mekanizma her zaman örtüşmemektedir (149). Yine de tüm hidrops olguları incelendiğinde temel patofizyolojik durumun generalize ödem olduğu gözlemlenmektedir. Fetal dönemde kapiller yapıların yetişkin insandan daha geçirgen olması, interstisyel kompartmanın sıvı birikimine daha müsait oluşu ve lenfatik dönüşün santral venöz basınçtan daha kolay etkilenmesi nedenleriyle fetal dokular ödem oluşumuna daha müsaittir (150). Bu durum altta yatan etiyolojilerin büyük bölümünün belirtilen patofizyolojik durumlara bağlanabilmesini sağlamaktadır.



**Şekil-1:** İmmün olmayan hidrops fetaliste görülen genel patofizyolojik yollar.  
 [“Bellini C, Hennekam RCM. 2012. Non-immune hydrops fetalis: A short review of etiology and pathophysiology” makalesinden alıntıdır (20)]

## 2.6. Tüm Ekzom Dizileme

Haploit insan genomu 23 kromozom çiftinin üzerinde bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti uzunluğundadır. Bu uzunluğa rağmen bütün genomun sadece %1,5’lik kısmı protein kodlamaktadır. Protein kodlayan bu bölgelerin tamamı ekzom olarak tanımlanmakta ve toplam 20,000 gen içerisinde bulunan 180,000 ekzonun oluşturduğu 30Mb DNA uzunluğuna karşılık gelmektedir (151). Ekzom terimi, ifade olan bölge anlamına gelen “EXpressed RegiON” kelimeleri baz alınarak oluşturulan ekzon kelimesine, Yunancada tamamı/bütünü anlamına gelen *-ome* ekinin getirilmesi ile türetilmiştir.

Mendeliyen hastalıklar incelendiğinde, hastalığa sebep olan değişimlerin %85’inin genlerin ekzon veya ekzon-intron birleşim bölgelerinde olduğu görülmektedir (152, 153). Bu bölgelerin dizilenmesi maliyet ve zaman açısından avantaj sağlayarak

hastalıklara tanı şansını arttırmaktadır. Fakat gene ait ekzonların toplam büyüklükleri, hastalıkların genetik ve fenotipik heterojenitesi, Sanger dizilemenin rutin pratikte tanı amaçlı kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu problemleri çözmek amacıyla 2009 yılında Ng ve arkadaşları tarafından tüm ekzom dizileme tanımlanmıştır (151). Yapılan analizde insan genomunda bulunan tüm ekzonlar yeni nesil dizileme yöntemleri ile tek bir çalışmada incelenmektedir. Tüm genomun sekanslanması yerine sadece hedef bölgelerin dizilenmesi maliyetin düşmesini ve analiz sırasında verilerin daha kolay ve hızlı filtrelenmesini de sağlamaktadır.

Tüm ekzom dizileme bilinen tek gen hastalıklarının haricinde yeni genetik etiyolojilerin aydınlatılması için de kullanılmaktadır. Lokusların keşfinde, etkilenmiş birey sayısının azlığı, düşük penetrans ve lokus heterojenitesi gibi faktörler genetik hastalıkların etiyolojisinin kullanılan klasik gen keşfi yöntemlerinin kullanımını kısıtlamaktadır. Tespit edilen lokusların sekanslanmasında ise genlerin toplam büyüklükleri, genetik heterojenite ve fenotipik heterojenite nedeniyle tanı koymak için yapılan Sanger sekanslama maliyetli ve zaman alıcı olmaktadır (154). Tüm ekzom dizileme ile, özellikle nadir Mendelyen hastalıklara sebep olan genomik değişimlerin etkin bir şekilde tanımlanabileceği, yapılan çalışmalar ile kanıtlanmış ve günümüzde klinik araştırmalarda kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Ayrıca yeni gen tanımlama çalışmalarında, tüm ekzom dizileme yöntemi çözünürlüğün daha yüksek olması sebebiyle, GWAS ve linkaj çalışmalarının zayıf kaldığı noktalarda da etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Tüm ekzom dizileme ile tanımlanan genlere örnek olarak, Ng ve ark. (2010) tarafından tanımlanan Kabuki Sendromu geni *MLL2* ve Miller Sendromu geni *DHODH*, Walsh ve ark. (2010) tarafından tanımlanan sendromik olmayan işitme kaybı geni *GPSM2*, Sırmacı ve ark. (2010) tarafından tanımlanan 3MC Sendromu geni *MASPI*, Sırmacı ve ark. (2011) tarafından tanımlanan KBG Sendromu geni *ANKRD11*, Becker ve ark. (2011) tarafından tanımlanan Osteogenesis Imperfecta geni *SERPINF1*, Montenegro ve ark. tarafından tanımlanan (2011) *CMT* (Charcot Marie Tooth) geni *GJB1*, Osteogaard ve ark. (2011) tarafından tanımlanan “Primary Lymphoedema” geni

*GJC2*, Zuchner ve ark. (2011) tarafından tanımlanan Retinitis Pigmentosa geni *DHDDS* verilebilir (155-163).

Tüm ekzom dizileme işlemi prensip olarak hedef bölgelerin belirlenmesi (*Capture*) ve sekanslanması olarak 2 basamakta gerçekleştirilmektedir. “Capture” işleminde ilk olarak genomik DNA rastgele veya belirli bölgelerden kesilerek fragmente edilir. Kesim işleminin ultrason dalgalarının kullanıldığı sonikasyon gibi fiziksel yöntemlerle veya enzimatik olarak yapılması mümkündür.

Fragmantasyonun ardından fragman uçlarına, örneği “universal pool” içerisinde tanıyabilmek, “universal” PCR işlemini gerçekleştirebilmek ve “flow cell” üzerine bağlayabilmek için farklı adaptörler eklenmektedir. Ardından bu fragmanlar pürifikasyon aşamasından geçirilir ve birçok hastadan elde edilen ürün tek bir tüp içerisinde birleştirilerek kütüphane hazırlanır.

Kütüphane, daha sonra istenilen bölgelerin seçimi için uygun hedef bölge seçim ve zenginleştirme kitleri ile muamele edilir. Bu kitler dizilenmek istenilen genetik materyale ve sekanslanmak istenilen bölgelere göre farklılıklar gösterir. Seçim kitlerinden sık kullanılanlar “Nimble Seq Capture”, “Sure Select Target Enrichment System”, “Radiance PCR Enrichment” ve “Twist Target Enrichment” kitleridir. Hedef bölge seçim kitleri yöntem açısından farklılıklar gösterebilmektedir. Sık kullanılan kitlerde solüsyon bazlı hibridizasyon, array bazlı hibridizasyon, tek parçalı paralel PCR yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Hedef bölge seçimi sonrasında örnekler kütüphane dizileme için uygun cihaza yüklenmektedir.

Sekanslama aşaması için günümüzde yaygın kullanılan birkaç platform bulunmaktadır. İlk yüksek verimli dizileme teknolojisi Roche firması tarafından 2005 yılında çıkarılan “Roche 454 pyrosequencing” cihazıdır (164). Bu cihaz sentezleyerek sekanslama prensiplerinin kullanıldığı pirosekanslama tekniği ile çalışmaktadır. Sekans sırasında salınan fosfat ile nükleotid tespiti yapılmasının ardından, sentez her basamakta durdurulup okumalar sonrasında devam etmektedir.

Diğer bir sekanslama cihazı, Illumina® firmasının ürettiği HiSeq ve MiSeq cihazlarıdır. Bu cihazlar adaptöre bağlanmış DNA kütüphanelerine ihtiyaç duymaktadırlar. Sentez ile sekanslama işlemi “flow cell” adı verilen, üzerinde kütüphane haline getirilmiş DNA dizilerinin hibridize olabildiği oligonükleotidlerin bulunduğu özel aparatlarda gerçekleşmektedir (165).

Piyasada bulunan bu iki firma tarafından üretilen cihazlar, sekanslama kimyası ve amplifikasyon yaklaşımı bakımından farklılıklar taşımaktadırlar. Her iki teknolojinin ortak noktası dizilenecek bölgelerin adaptörler yardımı ile çoğaltılmasıdır. Bu teknolojilerde farklı olarak Roche platformu pirosekanslama ve emülsiyon PCR ile amplifikasyon kullanmakta, Illumina platformu ise polimeraz temelli sentezleyerek sekanslama ve köprü amplifikasyon yöntemi ile çalışmaktadır (166).

Bu tez çalışmasında hedef bölge dizilenmesinde (tüm ekzom) “Twist Bioscience™ Customized Kit for Exome” (Twist Bioscience, Amerika) kiti kullanılmıştır. Kullanılan kitte hedef bölgelerin seçimi prob hibridizasyonu sonrası streptavidin manyetik boncukların hibridize olan fragmanlara bağlanması ile gerçekleştirilmiştir. Hibridize olmayan fragmanlar yıkanmış, yapılan “capture” işlem sonrası elde edilen fragmanlar PCR ile çoğaltılmış ve purifiye edilmiştir. Ardından Illumina firmasının HiSeq cihazı kullanılarak yüksek çözünürlük ile dizilenmiştir.

### **2.6.1. Prenatal Olgularda Tüm Ekzom Dizileme ile Tanı**

Prenatal test stratejileri günümüzde QF-PCR ve FISH ile hızlı anöploidi taramalarını, G-bantlama ile karyotipleme ve kromozomal mikrodizileme analizlerini içermektedir. Bu testlerin major limitasyonu düşük rezolüsyona sahip olmalarıdır. Yapılan çalışmalarda dismorfik fetüslerin rutin prenatal tetkiklerden QF-PCR ile analiz edildiğinde olguların %30’unda kromozomal trizomilerin tespit edilebileceği görülmektedir. Bu olgularda trizomilere ek olarak yapılan karyotip analizlerinde fetüslerin %5’inde kromozomal dengesiz translokasyonlar tespit edilebilmektedir. Kromozomal mikrodizileme yöntemleri ise karyotip analizleri normal saptanmış dismorfik fetüslerin %3-6,5’inde patojen kopya sayısı değişiklikleri olduğunu

göstermektedir. Bu testlerin birlikte kullanımı ile fetal yapısal anomali tespit edilen fetüslerde %60'a varan tanı oranlarına ulaşılabilceğı düşünölmektedir (2, 167).

Tüm ekzom dizileme ile prenatal uygulanan rutin genetik analizlerde tespit edilemeyen tek baz çifti seviyesinde değışikler, küçük delesyon/duplikasyonlar, insersiyonlar tespit edilebilmektedir. Bu nedenle rutin prenatal testlerde belirlenemeyen DNA değışimlerinin WES analizleri tespit edilmesi mümkündür.

Tüm ekzom dizileme analizinin tanı gücü, ilk olarak çocuk olgular üzerinde yapılan çalışmalar ile gözlemlenmiştir. Karyotip ve kromozomal mikrodizileme analizi normal bulunan ve genetik etiyolojilerden şüphelenilen çocuklara yapılan WES analizlerinde %25-30 tanı oranları tespit edilmiştir (6, 168-170). Yapılan çalışmalarda olgu gruplarında konjenital anomalilerin de bulunması, WES'in yapısal anomalili fetüslerde de kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ardından Medeira *ve ark.* tarafından yapılan araştırmada ultrason anomalisi bulunan, sitogenetik analizleri normal fetüsler incelenmiş ve olguların önemli bir kısmında tüm ekzom dizileme ile tanı konulabilen monogenik hastalıklar bulunmuştur (171).

Günümüzde yapılan prenatal WES araştırmalarında tanı oranları %6,2 ile %80 arasında değışim göstermektedir (8, 9). Tespit edilen farklı tanı oranların altında yatan esas nedenin olguların seçimlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünölmektedir. Örnek olarak fetal ultrasonografide iskelet displazisinin muhtemel olduğu olgularda yapılan çalışmalar incelendiğinde tanı oranları %80'nin üzerinde tespit edilmiştir (172, 173). Benzer şekilde Walkiewicz *ve ark.* ile Byrne *ve ark.* tarafından parental akrabalık bulunan, kromozomal SNP mikrodizileme analizlerinde heterozigosite kaybı bulunan, multipl anomali saptanan, açıklanamayan abortus veya yenidoğan döneminde ex olmuş fetüslerde yapılan çalışmalarda, tanı oranları sırası ile %32,8 ve %50 olduğu görölmüştür (174, 175).

Fetal yapısal anomali seçiminin olmadığı daha büyük kohort çalışmaları, prenatal tüm ekzom dizilemenin tanı gücünü doğrulamakla birlikte, tanı oranlarının örnek seçimi yapılmayan serilerde %8,5-10 arasında olduğunu göstermektedir (99, 100). Herhangi bir

anomalinin seçilerek hasta popülasyonunun belirlenmediği Wapner *ve ark.* ile McMullan *ve ark.* tarafından yapılan araştırmalarda tanı oranının daha düşük olduğu doğrulanmaktadır. Fakat bu çalışmalarda da bulunan anomaliler açısından olgular incelendiğinde, çoklu anomaliye sahip fetal örneklerde tanı oranının daha yüksek olduğu görülmektedir (5, 176).

Prenatal olgularda yapılan WES analizlerinde tespit edilen fetal yapısal anomaliler organ veya sistem anomalileri baz alınarak gruplandırıldığında, belirli anomalilerin daha yüksek tanı oranına sahip olduğu görülmektedir. Örnek olarak Walkiewicz *ve arkadaşları* tarafından yapılan çalışmada beyin anomalilerine sahip fetüslerde tanı oranının %50, beyin anomalileri içermeyen diğer yapısal anomalilere sahip fetüslerde ise tanı oranının %29 olduğu tespit edilmiştir (174). Benzer şekilde yapılan PAGE çalışmasında en yüksek tanı oranının multisistemik anomalilere (%15), iskelet anomalilerine (%15) veya kardiyak anomalilere (%11) sahip fetüslerde olduğu gözlemlenmiştir (99). Petrovski *ve ark.* tarafından yapılan benzer bir çalışmada 234 yapısal anomaliye sahip fetüs incelenmiş ve ortalama tanı oranı %10,3 olduğu gözlemlenmiştir. Fakat fetal anomaliler sistemsal olarak gruplandırıldığında tanı oranlarının multi-sistem anomalilerde %18,9, lenfatik sistem anomalilerinde %24, iskelet sistem anomalilerinde %24, santral sinir sistemi anomalilerinde %22, renal anomalilerde ise %16 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırma ile WES analizinin tanı oranlarının etkilenen sistem ve organlar ile değişebileceği düşünülmüştür (100).

Farklı tanı oranlarının fetal yapısal anomali çeşitliliğinin tüm ekzom dizileme tanı oranları üzerindeki etkisine ek olarak, çalışmaların tamamında *trio* analiz yapılmaması ile de ilişkili olması muhtemeldir. *Trio* analizlerde *de novo* değişimlerin tanımlanabilmesi, aynı gen içerisinde tespit edilen değişimlerin cis/trans durumu hakkında bilgi sahibi olunması ek avantajlar sağlamakta ve bu sebeple *trio* analiz kullanılan WES çalışmalarında, tanı oranlarının daha yüksek saptanmasına neden olabilmektedir (177).

Prenatal olgularda yapılan WES çalışmaları bu olgulara tanı konulması ve klinik yönetimin sağlanmasının yanında postnatal fenotipik özellikleri bilinen hastalıkların

prenatal dönemdeki fenotipik özellikleri hakkında da bilgi verebilmektedir. Örneğin *NSDI* gen delesyonları aşırı büyüme sendromlarından Sotos Sendromuna neden olmaktadır. Zhang ve ark. tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada *NSDI* gen delesyonunun intrauterin gelişme geriliği yaptığı tespit edilmiştir (178). Ferretti ve ark. tarafından yayımlanan makalede ise aynı delesyon bölgesinin intrauterin gelişme geriliği saptanan bir fetüste tespit edildiği ve doğumdan sonra 1 yaşında vakada makrosefali ve Sotos Sendromunun klinik özelliklerinin geliştiği belirtilmiştir (179). Postnatal aşırı büyümeye neden olan bir hastalığın yapılan çalışmalar ile aydınlatıldığı prenatal dönemdeki fenotipi dikkat çekicidir. Petrovski ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada gebelik süreci devam ederken *RERE* geninde *de novo* çerçeve kaymasına yol açan bir mutasyon tespit edilmiş fakat izole ense kalınlığı artışı saptanan fetüste fenotip ile ilişkisi net bir şekilde belirtilmemiştir (100). Olguda doğumdan 6 ay sonra *RERE* Sendromunda görülen beyin, göz ve kalp anomalilerinin tespit edilmesi ile varyant patojen olarak sınıflandırılmış ve *RERE* gen mutasyonlarının prenatal izole ense kalınlığına neden olabileceği anlaşılmıştır. Bu örnekler, prenatal WES analizlerinin postnatal hastalıklar ile prenatal fenotipleri ilişkilendirilebileceği ve postnatal fenotipi bilinen genetik hastalıkların prenatal dönemdeki bulgu ve gelişimleri hakkında bilgi sahibi olunabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar ile tüm ekzom dizileme analizlerinin prenatal olgularda genomik etiyolojiler hakkında ek bilgiler sağlayabileceği gösterilmiştir. Fakat tüm ekzom dizileme analizleri kendi içerisinde sınırlılıklar da taşımaktadır. Ekzom *capture* işlemi sırasında CpG zengin bölgelerin kaplamı düşük olmaktadır. Bu nedenle yapısında zengin CpG bölgesi içeren genler ile oluşan fenotiplerin tanısı zorlaşmaktadır (180, 181).

Prenatal ekzom çalışmalarının bir diğer sınırlılığı prenatal fenotip bilgisinin yeterli olmamasıdır. Ultrasonografi ve fetal MRI ile tespit edilen anomaliler nedeniyle yapılan WES analizlerinde sınırlı fenotipik bilgiye sahip olunması, saptanılan genetik değişimlerin yorumlanmasını güçleştirmektedir. Filges ve Friedman tarafından yapılan bir çalışmada prenatal tüm ekzom dizileme sırasında tespit edilen değişimler doğum

sonrası postnatal fenotip bilgileri ile yeniden analiz edilmiş ve tanı almamış vakaların %20'sinde patojen varyantlar tespit edilmiştir (182).

Bulunan sınırlılıklara rağmen prenatal WES çalışması hasta yönetimindeki avantajları nedeni ile ACMG kılavuzlarında belirli durumlarda önerilmektedir. Prenatal dönemde lethal hastalıkların tanı alması, ailenin gebelik ile ilgili, yasal süre zarfında terminasyon veya doğum sonrası palyatif tedavi kararını vermesini kolaylaştırmaktadır. Tanı ile sadece mevcut gebelik değil sonraki gebeliklerde tekrar riskinin hesaplanması ve prenatal/preimplantasyon genetik testler için de hazırlıkların erken başlanması sağlanabilmektedir. Prenatal WES ile tanı konulması ayrıca yoğun bakımda beklenen tanı dönemi süresini de kısaltabilmektedir. Bu nedenlerle güncel ACMG kılavuzlarında genetik etiyoloji varlığı düşünülen multipl anomaliye sahip fetüslerde, spesifik gen testlerinin başarısız olduğu durumlarda WES analizinin yapılabileceği belirtilmektedir (183).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1 Hasta Seçimi**

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde 01.01.2019-01.06.2021 tarihleri arasında Tıbbi Genetik polikliniğine başvurmuş ense kalınlığı artışı ( $>3,5$  mm), kistik higroma, plevral efüzyon, perikardiyal efüzyon, asit, cilt ödemi bulgularından en az birine sahip olan intrauterin fetal ölüm, ölü doğum ile kaybedilmiş veya perinatal ex olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Tanısal olmayan karyotip analizleri ve normal alfa-talasemi MLPA testi çalışmaya dahil edilmek için zorunlu tutulmuştur. Hidrops için başka bir tanısal patofizyolojinin varlığı veya şüphesi (konjenital viral enfeksiyonlar, ikiz ikiz transfüzyon sendromu, alloimmünizasyon, vb.), tüm ekzom dizileme için yeterli prenatal materyalin bulunmaması, daha önce genetik testler kesinleşmiş prenatal tanı durumlarında hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

#### **3.2 Verilerin Toplanması**

Tez araştırması için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 23.06.2021 tarihli 2021/19-12 numaralı kararıyla etik kurul onayı alındı (Ek-1). Olguların klinik bilgilerine Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniklerindeki hasta dosyalarından ulaşıldı. Araştırma için hastaya ait bilgiler ve tüm ekzom dizileme sonucunda elde edilen varyantlar veri kayıt formlarına işlenerek değerlendirildi (Ek-4). Veri kayıt formları olgulara ait maternal yaş, ikili ve üçlü tarama testleri sonuçları, fetal ultrasonografi bulguları, aile ağacı bilgileri, medikal özgeçmiş, eşler arasında akrabalık durumu, gebelik döneminde kullanılan ilaçlar, daha önce tanı konulan hastalıklar, daha öncesinde yapılmış genetik testlerin sonuçları, obstetrik özgeçmiş bilgileri ve kromozom analizi, QF-PCR, alfa talasemi MLPA, dizileme (gerekli görülürse) bilgilerini içermektedir.

### 3.3 Genomik DNA İzolasyonu

#### 3.3.1 Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için toplam 4 ml periferik kan örneği EDTA'lı tüplere alınarak laboratuvara ulaştırıldı. Saflaştırılmış total genomik DNA elde edilmesi amacıyla her olgunun 200 µl periferik kanından “Qiacube® otomatize DNA izolasyon cihazı” (Qiagen, Almanya) ve “QIAamp® DNA Blood Mini kiti” (Qiagen, Almanya) kullanılarak spin kolon DNA izolasyon tekniği uygulandı. İzolasyon protokolünde üretici firmanın önerileri kullanıldı.

Kullanılan DNA izolasyon cihazı kan ile diğer kimyasalların eklenmesi sonrasında otomatize olarak çalışmaktadır. Reaksiyonlar basamakları sırası ile aşağıdaki aşamaları içermektedir;

1. 20 µl proteinaz K, 200 µl ligasyon buffer solüsyon, 200 µl periferik kan 5ml mikrosantrifüj tüpüne eklenmesi ve 56 °C’de 10 dakika inkübasyonda bırakılması.
2. 200 µl etanol (%96-100) örneğe eklenmesi ve ardından 15 sn vortekslenmesi.
3. Karışımın spin kolona nakledilmesi. Spin kolonun temiz 2 ml toplama tüpü konulması.
4. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmesi. Filtratın atılması.
5. 500 µl ‘Wash buffer 1’ eklenmesi. Spin kolonun yeni 2 ml toplama tüpüne konulması.
6. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmesi. Filtratın atılması.
7. 500 µl ‘Wash buffer 2’ eklenmesi. Spin kolonun yeni 2 ml toplama tüpüne konulması.
8. 20000xg’de 3 dk santrifüj edilmesi. Filtratın atılması.
9. Spin kolonun temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınması ve 100-200 µl ‘Elution buffer’ veya distile su eklenmesi. 1-5 dk oda sıcaklığında beklenilmesi.
10. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmesi. Spin kolonların atılması.
11. Elde edilen DNA’lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, parafilmle ağızları kapatılarak DNA saklama kutularına konulup -20°C’de saklanması.

### 3.3.2 Koryon Villüs Materyalinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için PBS içerisine alınan koryon villus örnekleri öncelikle petri lam üzerinde endometrial dokudan mikroskop altında ayrıştırıldı. Elde edilen materyal mikrosantrifüj tüplerine alındı. KVÖ materyalinden DNA elde etmek için aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı:

1. Mikrosantrifüj tüpüne toplanılan doku parçalarının 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi ve süpernatant kısmının atılması
2. Dokunun üzerine 200 µl ‘Tissue lysis buffer’ ve 50 µl Proteinaz K eklenmesi
3. 72°C de homojen hale gelene kadar (yaklaşık 3 saat) inkübasyon
4. 200 µl ‘Binding buffer’ eklenmesi
5. 70°C de 10 dakika inkübasyon
6. 100 µl izopropanol eklenmesi ve spin kolonlara aktarılması
7. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi
8. Toplama tüpünün değiştirilmesi, üzerine 500 µl ‘Removal buffer’ eklenmesi
9. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi
10. Toplama tüpünün değiştirilmesi, üzerine 500 µl ‘Wash buffer’ eklenmesi
11. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi
12. Toplama tüpünün değiştirilmesi, üzerine tekrar 500 µl ‘Wash buffer’ eklenmesi
13. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi
14. Toplama tüpünün değiştirilmesi ardından 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi
15. Spin kolonun 1,5’luk eppendorf tüpüne aktarılması ardından üzerine 80-200 µl ‘Elution buffer’ (70°C) eklenmesi
16. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi
17. Eppendorf tüpte toplanan DNA’nın saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, parafilmle ağızları kapatılarak DNA saklama kutularına konulup -20°C’de saklanması

### 3.3.3 Amniyosentez Materyalinden DNA İzolasyonu

Amniyon materyalinden DNA izolasyonu için laboratuvara ulaşan pistonsuz amniyon mayi içeren 10 ml’lik enjektörlerden her biri ayrı Eppendorf tüplerine 1’er ml olacak şekilde amniyon örnekleri alındı. Amniyon materyalinden DNA elde etmek için aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı:

1. Mikrosantrifüj tüpüne alınan amniyon örneğinin 8000 rpm’de 1 dakika santrifüje edilmesi ve süpernatant kısmının atılması.
2. Üzerine 200 µl ‘Tissue lysis buffer’ ve 50 µl Proteinaz K eklenmesi.
3. 72°C de 15 dakika inkübasyon.
4. 200 µl ‘Binding buffer’ eklenmesi.
5. 70°C de 10 dakika inkübasyon.
6. 100 µl izopropanol eklenmesi ve spin kolonlara aktarılması.
7. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi.
8. Toplama tüpünün değiştirilmesi, üzerine 500 µl ‘Removal buffer’ eklenmesi.
9. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi.
10. Toplama tüpünün değiştirilmesi, üzerine 500 µl ‘Wash buffer’ eklenmesi.
11. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi.
12. Toplama tüpünün değiştirilmesi, üzerine tekrar 500 µl ‘Wash buffer’ eklenmesi.
13. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi.
14. Toplama tüpünün değiştirilmesi ardından 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi.
15. Spin kolonun 1,5’luk mikrosantrifüj tüpüne aktarılması ardından üzerine 80-200 µl ‘Elution buffer’ (70°C) eklenmesi.
16. 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmesi.

### 3.3.4 Kordosentez Materyalinden DNA İzolasyonu

Kordosentez örneğinden izolasyon için toplam 4 ml kordosentez kanı EDTA’lı tüplere alınarak laboratuvara ulaştırıldı. Saflaştırılmış total genomik DNA elde edilmesi amacıyla her olgunun 200 µl örneğine “Qiacube® otomatize DNA izolasyon cihazı” (Qiagen, Almanya) ve “QIAamp® DNA Blood Mini kiti” (Qiagen, Almanya)

kullanılarak spin kolon DNA izolasyon tekniği uygulandı. İzolasyon protokolünde üretici firmanın önerileri kullanıldı.

Kullanılan DNA izolasyon cihazı kan ile diğer kimyasalların eklenmesi sonrasında otomatize olarak çalışmaktadır. Reaksiyonlar basamakları sırası ile aşağıdaki aşamaları içermektedir;

1. 20 µl proteinaz K, 200 µl ligasyon buffer solüsyon, 200 µl periferik kan 5ml mikrosantrifüj tüpüne eklenmesi ve 56 °C’de 10 dakika inkübasyonda bırakılması.
2. 200 µl etanol (%96-100) örneğe eklenmesi ve ardından 15 sn vortekslenmesi.
3. Karışımın spin kolona nakledilmesi. Spin kolonun temiz 2 ml toplama tüpü konulması.
4. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmesi. Filtratın atılması.
5. 500 µl ‘Wash buffer 1’ eklenmesi. Spin kolonun yeni 2 ml toplama tüpüne konulması.
6. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmesi. Filtratın atılması.
7. 500 µl ‘Wash buffer 2’ eklenmesi. Spin kolonun yeni 2 ml toplama tüpüne konulması.
8. 20000xg’de 3 dk santrifüj edilmesi. Filtratın atılması.
9. Spin kolonun temiz 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınması ve 100-200 µl ‘Elution buffer’ veya distile su eklenmesi. 1-5 dk oda sıcaklığında bekletilmesi.
10. 6000xg’de 1 dk santrifüj edilmesi. Spin kolonların atılması.
11. Elde edilen DNA’lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, parafilmle ağızları kapatılarak DNA saklama kutularına konulup -20°C’de saklanması.

### **3.4 Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi**

Konsantrasyon ve saflık ölçümünde “NanoDrop ND1000® Spektrofotometre” cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Spektrofotometrik ölçüm; DNA, RNA ve protein gibi maddelerin içinde bulundukları sıvı solüsyondan geçirilen belirli spektrumlardaki ışığı, kimyasal yapılarına ve konsantrasyonlarına paralel olarak absorbe (A) etmesi prensibine dayanmaktadır. DNA ve RNA gibi nükleik asitler 260 nm’de, proteinler ise 280 nm’de maksimum absorbans gösterirler. Bu oranın 1,8-2 aralığında bulunmasının analiz için uygun saflıkta olduğu kabul edilmektedir. Bu değer aralığından

daha az olan çözeltilerde protein kontaminasyonu olacağından şüphelenilirken, üzerindeki değerler ise RNA kontaminasyonu açısından anlamlıdır.

Yapılan çalışmada kullanılan DNA örneklerinin A260/A280 oranının 1,8-2,0 arasında olması ve konsantrasyonunun ise en az 20 ng/μl olması hedeflendi. İdeal saflık oranında olmayan veya DNA konsantrasyonu düşük olan örneklerden tekrar DNA izolasyonu yapıldı.

### **3.5 Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metotları**

#### **3.5.1 QF-PCR Analizi ile Hızlı Prenatal Test**

QF-PCR, kromozomlar üzerindeki kısa tekrar dizilerinin (STR; Short Tandem Repeats) PCR ile çoğaltılarak kantitatif olarak ölçülmesine dayanan bir tekniktir. STR' lar iki ile yedi nükleotidlik tekrarlardan oluşur ve yalnızca belirtilen kromozom dizisine özgüdür. Bu STR'lar kişiler arasında farklı uzunlukta olabildiği gibi aynı kişiye ait iki kromozomda farklı da olabilir. Bu sayede homolog kromozomların ayrımı yapılabilmekte ve olgudaki kromozom sayısı STR belirteçleri ile belirlenebilmektedir.

Yapılan testin analizi sırasında floresan primerler aracılığıyla çoğaltılmış DNA fragmanları, kapiller elektroforez cihazlarında pik alanları görselleştirilerek ölçüldü. Normal heterozigot bireyler, analiz edilen her kromozom için iki tepe alanı (tepe oranı 1:1) göstermektedir. Trizomik fetüslerde ilişkili kromozom markırlarında triallelik pattern (1:1:1) ya da diallelik trizomik pattern (2:1) tespit edilmektedir.

Prenatal materyalin QF-PCR analizi için içerisinde 13, 15, 16, 18, 21, 22 ve XY kromozom bölgeleri için 2 adet *master miks* bulunan “ChromoQuant SuperSTaR Optima QF-PCR Kit” (CyberGene AB, İsveç) kiti kullanıldı. Reaksiyon ve görüntüleme için üretici firmanın önerdiği protokoller uygulandı. Bu basamaklar sırasıyla aşağıda özetlenmiştir:

- Fetal materyalden izole edilen DNA -20 °C'den çıkarılması ve oda ısısına getirilmesi.
- Spektrofotometrede örneklerin konsantrasyon ve saflık ölçümleri.

- DNA konsantrasyonunun uygun değere getirilmesi (4 µl distile su içerisinde toplam DNA miktarı 5-12 ng olacak şekilde).
- 4,8 µl Reaction mix 1 ve 1,2 µl Activator mix'in 200 µl'lik PCR strip tüp de homojenize olacak şekilde karıştırılması.
- 4,8 µl Reaction mix 2 ve 1,2 µl Activator mix'in 200 µl'lik ayrı bir PCR strip tüpünde homojenize olacak şekilde karıştırılması.
- Her iki PCR tüpüne konsantrasyonu uygun hale getirilmiş 4 µl DNA eklenmesi.
- PCR tüpünde final volümün 10 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanması.
- Tüplerin "Thermal Cycler" cihazına alınarak PCR siklusunun başlatılması.
- PCR siklus programı:
- 95°C'de 15 dk denatürasyon
- 94°C'de 30sn
- 57°C'de 1 dk
- 71°C'de 2 dk
- 71°C'de 5 dk son uzama
- 60°C'de 60 dk
- Program bitiminde 10 µl Hi-Di formamid ve 0,5 µl "size standard"ın boş bir PCR tüpünde pipetaj yapılarak mastermix hazırlanması.
- Mastermix üzerine 1 µl PCR ürünün eklenmesi ve pipetaj ile homojenizasyonu.
- Örneklerin ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi.
- Yürütme bitiminde işlenmemiş verinin GeneMapper v4.0. yazılımı kullanılarak analizi.

### 3.5.2 Kimerizm Analizi

Kimerizm analizi insan genomlarında bulunan kısa tekrar bölgeleri gibi (STR) polimorfik DNA dizi belirteçleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yüksek polimorfik kısa dizi tekrarları / değişik sayıdaki dizi tekrarları (STR/VNTR) sisteminin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması kimerizm analizinde yöntem olarak kabul

edilmektedir. Analiz için ise ebeveynlerde ve fetüste yer alan STR lokuslarındaki allel farklılıkları kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmada kimerizm analizleri için “Mentype® Chimera® PCR Amplification” (Biotype GmbH, Almanya) kiti kullanıldı. Reaksiyon ve görüntüleme için üretici firmanın önerdiği protokoller uygulandı. Bu basamaklar sırası ile aşağıda belirtilmiştir;

- Fetal materyalden izole edilen ve ebeveyn DNA’larının -20 °C’den çıkarılması ve oda ısısına getirilmesi.
- Spektrofotometrede konsantrasyon ve saflık ölçümleri.
- DNA konsantrasyonunun uygun değere getirilmesi (2 ng/ µl).
- Örnek başına 5 µl Reaction mix A, 2,5 µl Primer mix’in, 0,4 µl Multi Taq2 DNA Polymerase ve 16,1 µl nükleaz-free su olacak şekilde master mix hazırlanması.
- Her bir örnek için 1 µl DNA ve 25 µl’lik Master mix’in karıştırılması.
- Tüplerin Thermal Cycler cihazına alınarak PCR siklusunun başlatılması.
- PCR siklus programı:
  - 95°C’de 4 dk
  - 94°C’de 30sn
  - 60°C’de 120 sn
  - 72°C’de 75 sn
  - 68°C’de 60 dk30 döngü
- Program bitiminde 10 µl Hi-Di formamid ve 0,5 µl “size standard”ın boş bir PCR tüpünde pipetaj yapılarak mastermix hazırlanması
- Mastermix üzerine 1 µl PCR ürünün eklenmesi ve pipetaj ile homojenizasyonu
- Örneklerin ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi
- Yürütme bitiminde işlenmemiş verinin GeneMapper v4.0. yazılımı kullanılarak analizi

### 3.5.3 Prenatal Örnek Karyotip Analizi

Fetal karyotipleme için alınan prenatal tanı örnekleri farklılıklar göstermektedir. Araştırmaya dahil edilen olgularda sitogenetik analiz için amniyon sıvısı, koryonik villus materyali, kord kanı kullanıldı. Kromozomların elde edilmesinde kord kanı için kısa süreli kültür, amniyon ve KVS materyali için uzun süreli hücre kültürü kuruldu.

Amniyosentez sonrası kromozom analizi için amniyon örnekleri laboratuvara her biri 10 ml olan 2 enjektör içerisinde ulaştırıldı. Örnekler öncelikle 10 ml santrifüj tüplerine aktarıldı. Ardından 1200 RPM’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısım ayrıldı. Örneklerin üzerine 3 ml “Amniomax” (Thermo Fisher Scientific, ABD) besiyeri eklendi ve örnekler hücre kültür flasklarına ekildi. Flasklar 37°C’de ayrı karbondioksit etüvlerinde inkübe edildi. Yirmi dördüncü saatte kültür kontaminasyonu açısından kontrol edildi. Yedinci gün hücre kültürlerinin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek tekrar 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Yeterli bölünen hücre sayısına ulaşan kültürlerle (6.-10. gün) kültür içi pasajlama (KİP) yapıldı. Kültür içi pasajlama işlemi için önce flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 3 ml fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS) ile flask yüzeyi yıkandı. Ardından 1 ml tripsin-EDTA eklenerek 30 saniye bekletildi. Fazla tripsin uzaklaştırıldı ve 3 ml besiyeri eklendi. Kültür içi pasajdan 16-18 saat sonra flaska 150 µL (3 damla) kolsemid eklendi. Kolsemid eklenen kültürler 3 saat 37°C’de karbondioksit etüvlerinde inkübasyona bırakıldı. Ardından harvest için flask içerisindeki besiyeri 10 ml santrifüj tüpüne alındı. Flask yüzeyi 3 ml PBS ile yıkandı. Eklenen PBS aynı santrifüj tüpüne alındı ve 1 ml tripsin-EDTA hücre kültürü flaskının içine eklendi. Hücreler yüzeyden ayrılana kadar (1-3 dk) beklenildi. Flask içerisindeki tripsin aynı santrifüj tüpüne alındı. Sonrasında 3 ml PBS ile flask tekrar yıkanıp aynı santrifüj tüpü içerisine alındı. Harvest ardından örnekler 1200 RPM’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından 0,075M KCL hipotonik solüsyon ile tüpler 10 ml’ye tamamlandı ve 30 dakika 37°C’de inkübe edildi. Inkübasyon bitiminde 1100 RPM’de 10 dk santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Fiksasyon işlemi için tüpler toplam 3 defa modifiye “Carnoy” solüsyonu eklenerek 10 ml’ye tamamlandı ve 1200 RPM’de 10 dk santrifüj sonrasında süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Son fiksasyon sonrası yayma

alındı. Yayma sonrası preparatlar 90°C üç saat yaşlandırıldı. Ardından rutin G-bantlama ile boyama sonrası ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

KVÖ kromozom analizi için laboratuvara gelen 10-20 mg koryon villus örnekleri öncelikle mikroskop altında maternal dokudan temizlendi. Temizlenen dokular her bir hücre kültürü flaskına 6 parça olacak şekilde iki ayrı flaska ekim yapıldı. Flasklara 3 ml “Amniomax” besiyeri eklendi ve 37°C’de ayrı karbondioksit etüvlerinde inkübe edildi. Flasklar 3. gün kontaminasyon için kontrol edildi. Yedinci gün hücre kültürlerinin üzerine 2 ml besiyeri eklenerek tekrar 37°C inkübasyona bırakıldı. Örnekler 10-14’üncü günlerde harvest için kontrol edildi ve uygun olan flasklar harvest edildi. Harvest için 1 ml tripsin hücre kültürü flaskının içine eklendi. Hücreler yüzeyden ayrılana kadar (30 sn-1 dk) beklenildi. Harvest edilen hücreler 10ml’lik santrifüj tüplerine alındı. Harvest edilen hücrelere amniyosentez harvesti sonrası uygulanan basamaklar uygulandı. Elde edilen preparatlar ışık mikroskobu altında analiz edildi.

Kordosentez örneğinde kromozom analizi için 20. haftadan sonra alınan kord kanı örneği laboratuvara, içerisinde ikişer mililitre bulunan 2 adet sodyum heparinli tüpte ile ulaştırıldı. Alınan fetal kan örneği fitohemaglutinin, L-glutamine, penisilin/streptomisin, %15 “fetal calf serum” eklenen “RPMI 1640” içeren 10ml’lik 2 santrifüj tüpüne 8’er damla ekildi ve 37°C’de karbondioksit etüvlerinde kültüre edildi. Kültürün ikinci gününde yüksek rezolüsyonlu karyotip bantlama için besiyerlerinden birine 1 damla timidin eklendi. Yirmi dört saat sonra timidin eklenmiş besiyeri 1200 RPM’de 10 dk santrifüje edildikten sonra süpernatant atıldı. Örnek 10ml PBS eklendi. Ardından tekrar 1200 RPM’de 10 dk santrifüje edildikten sonra süpernatant atıldı ve tekrar 10 ml besiyeri eklendi. Her iki tüp 3.günde amniyosentez harvesti sonrası uygulanan basamakların aynısı uygulanarak preparatlar hazırlandı. Elde edilen preparatlar ışık mikroskobu altında analiz edildi.

### **3.6 Alfa Talasemi Çoklu Ligasyonla Prob Amplifikasyon (MLPA) Tekniği**

Genomik DNA kullanılarak insan “alfa globin cluster” bölgesinin kopya sayısı varyantlarını tespit edebilmek amacıyla, 16p13.3 bölgesinde yer alan *HBA* geni

promotor bölgesinin delesyon/duplikasyon analizi için “SALSA® MLPA® probemix P140-C1 HBA kiti “(MRC-Holland, Amsterdam, Hollanda) kullanıldı. Kullanılan bu kit ile delesyon/duplikasyonlar haricinde, *HBA2* geninde nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkan Hb Constant Spring değişiminin de tespit edilmesi mümkün olmaktadır. Alfa talasemi için yapılan MLPA çalışmasının tüm reaksiyonları ve analiz basamakları üreticinin talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar basamakları sırası ile aşağıdaki aşamaları içermektedir;

- DNA Denatürasyonu ve Prob Miks ile Hibridizasyonu:
  - Olgu DNA’larının -20 °C’den çıkarılması ve oda ısısına getirilmesi.
  - Spektrofometrede konsantrasyon ve saflık ölçümleri.
  - Konsantrasyon değerinin uygun hale getirilmesi (toplam DNA miktarı 60-200 ng DNA olacak şekilde) ve DNA’dan 5 µl örneğin 200 µl’lik PCR strip tüplere aktarılması.
  - Tüpün “Thermal Cyclers” cihazında 98°C’da 15 dakika bekletilerek denatürasyonu.
  - Denatürasyon sonrası cihaz içi sıcaklığın 25°C’ye indirilmesi.
  - Örneğin üzerine 1,5 µl “SALSA Probe Mix” ve 1,5 µl MLPA buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edilmesi.
  - “Thermal Cyclers” cihazında 95°C de 1 dakika inkübasyon, ardından 60°C’de 16 saat hibridizasyon.
- Ligasyon:
  - Hibridizasyon bitiminde cihaz sıcaklığının 54 °C’ye indirilmesi.
  - Ligaz-65 miks oluşturulması: 3 µl “Ligase Buffer-A”, 3 µl “Ligase Buffer-B”, 25 µl su ve 1 µl “Ligase-65” enzimlerinin boş PCR tüpünde pipetaj ile homojenize edilmesi.
  - Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edilmesi.
  - İlave sonrası 54°C de 15 dakika inkübasyon.
  - “Thermal Cyclers” cihazında 98 °C’de 5 dakika ligaz enzim denatürasyonu.

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu:
  - Ligasyon ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüpüne aktarılması.
  - Bu aşamadan sonraki tüm basamaklar buz üzerinde yapılmıştır.
  - Alınan ligasyon ürününün üzerine sırasıyla 7,5 µl distile su, 2 µl Salsa primer FAM, 0,5 µl Salsa polimeraz eklenmesi.
  - Tüplerin “Thermal Cycler” cihazına alınarak PCR siklusunun başlatılması.
- PCR siklus programı:
  - Denatürasyon 95°C’de 30sn
  - Bağlanma 60°C’de 30sn
  - Uzama 72°C’de 1 dk
  - Final uzama 72°C’de 20dk } 35 döngü
- Program bitiminde örnekler kapiller elektroforez cihazına yüklenir.
- Kapiller Elektroforez Cihazına Yükleme:
  - Örneklerin analizi ve yürütmesi “ABI Prism 3130 Genetic Analyser” (Applied Biosystem, Foster City, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir.
  - 10 µl formamid ve 0,5 µl “size standard” ile boş bir PCR tüpünde pipetaj yapılarak mastermix hazırlanması.
  - 10,5 µl mastermix üzerine 2 µl PCR ürünün eklenmesi ve pipetaj ile homojenizasyonu.
  - PCR tüpünün “Thermo Cycler” cihazına yüklenmesi ve 95°C’de 5 dakika denatürasyonu.
  - Renatürasyonu engellemek için -20°C’de 2 dakika bekletme.
  - İki kontrol örneğinin yükleme plağında ayrı kuyucuklara yüklenmesi.
  - Örnek yükleme plağının “ABI Prism 3130 Genetic Analyser” cihazına yüklenip kapiller elektroforezin başlatılması.
- Yürütme bitiminde işlenmemiş veri “Coffalyser.Net” (MRC-Holland, Amsterdam, Hollanda) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (184).

### 3.7 Tüm Ekzom Dizileme (WES)

Tüm ekzom dizilemesi ile insan genomunun kodlayan bölgeleri içindeki ekzonların zenginleştirilmesi ve tekrarlayan sekanslanması ile genomdaki değişimler tespit edilmektedir. Yapılan çalışma ile toplam 22.000 gen üzerinde bulunan 180.000'den fazla ekzon taranmaktadır. Toplumda sık görülen ve herhangi bir hastalığa yol açmayan varyasyonlar görülebileceği gibi, son derece nadir ve kişiye özgü varyantlar da saptanabilmektedir. Tespit edilen varyantların tek gen hastalıkları veya multifaktöriyel hastalıkların etiyolojisinde rol alıp almadığı varyantın frekansı, kodladığı protein üzerindeki fonksiyonel etkisi, hastalığın ve değişim aile içindeki segregasyonu, sebep olduğu hastalığın kalıtım şekli, in silico prediksyon programlarında edinilen bilgiler, splicing ve mRNA maturasyonu üzerindeki etkileri incelenerek belirlenmektedir. Yapılan analizde bakılan tüm ekzonlar genomun yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Fakat tek gen hastalıklarında hastalık yapıcı mutasyonların %85'inin bu bölgelerde bulunduğu bilinmektedir (185, 186). Ekzonlarda tespit edilen mutasyonların çeşitleri incelendiğinde %56'sının missense/nonsense, %24'ünün küçük insersiyon ve delesyonlar, %10'unun splicing (kırılma) mutasyonları, %1,8'inin ise düzenleyici mutasyonlar olduğu görülmektedir (185). Bu sebeple ekzom dizilemeye öncelik vermek iş gücü ve maliyetlerini genetik poliklinikleri gibi rutin hasta bakılan yerlerde azaltabilmektedir.

Tüm ekzom analizi verileri değerlendirilirken temel olarak iki kalite parametresi kullanılmaktadır. Kaplam; hedef bölgenin yüzde kaçının okunduğunu ifade ederken, derinlik; belirli bir bölgenin toplamda kaç defa okunduğunu ifade eder.

Yapılan çalışmada 'Twist Bioscience™ Customized Kit for Exome' kiti üretici firmasının önerileri doğrultusunda kullanıldı. Kullanılan kit yeni nesil sekanslama teknolojileri içerisinde hedef yakalama ve zenginleştirme ('target capture and enrichment') prensibi ile çalışmaktadır. Bu yöntemde özetle biotinile edilmiş problemlerin hedef bölgeyle hibridize olmasının ardından streptavidin boncukları kullanılarak yakalanması, manyetik alan ile hedef dışı bölgelerden ayrıştırılarak çoğaltılması prensibi

kullanılmaktadır. Reaksiyon basamakları sırasında kütüphane hazırlanması için kullanılan materyaller (Tablo-2) ve ekipmanlar (Tablo-3) aşağıda belirtilmiştir.

| Malzeme                                   | Marka                                               |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Target Capture NGS kit                    | Twist Bioscience™ Customized Kit for Exome          |
| DNA Pürifikasyonu için Manyetik Boncuklar | Beckman Coulter™ AMPure XP for PCR Purification     |
| Kütüphane Amplifikasyon Kiti              | Roche™ KAPA HiFi HotStart Library Amplification Kit |
| NGS Reaksiyon Kartuşu                     | Illumina™ HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5              |
| Etanol                                    | MERCK™ Ethanol                                      |
| Nükleaz İçermeyen Su                      | MERCK™ Nuclease free water                          |

**Tablo-2:** WES için kullanılan materyaller

| Ekipman                          | Marka                                                        |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| PCR Cihazı                       | Bio-Rad™ T100 Thermal Cycler                                 |
| Spektrofotometre                 | Thermo Fisher Scientific™ NanoDrop ND1000® Spectrophotometer |
| Santrifüj                        | Eppendorf™ 5425/5424R                                        |
| Vorteks                          | IKA™ Vortex                                                  |
| Termal Çalkalayıcı               | BIOSAN™ TS-100 Thermo-Shaker                                 |
| Mikropipet Setleri               | Eppendorf™                                                   |
| Manyetik Stand                   | DynaMag™ -2 Magnet                                           |
| 0.2 ml, 1.5 ml, 2 ml PCR tüpleri | Eppendorf™                                                   |

**Tablo-3:** WES için kullanılan ekipman

### 3.7.1 WES Laboratuvar Aşamaları

Olguların tüm ekzom dizileme çalışması için A260/A280 oranı 1,8-2,0 saflığında ve en az 20 ng/μl konsantrasyona sahip DNA örneği kullanıldı. Kütüphane hazırlığı, biyoinformatik aşamaları ve klinik analizler DEÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalında uygulandı.

Tüm ekzom dizilemenin laboratuvar aşamaları özetle 5 teknik aşama içermektedir. Bunlar sırasıyla; hibridizasyon için kütüphanelerin hazırlanması, (fragmentasyon, Açık uç onarımı, A ucu takılması, adaptör ligasyonu, indeks ile işaretleme), “Capture” problemleri ile kütüphanenin hibridizasyonu, hibridize olan “target”

bölgelerin streptavidin boncuk ile izolasyonu, post-capture PCR amplifikasyonu ve pürifikasyonu, Illumina platformunda sekanslanması basamaklarından oluşmaktadır.

Tüm ekzom dizileme sırasından uygulanan reaksiyon basamakları uygulanan sıra ile aşağıda belirtilmiştir:

DNA Fragmentasyonu: DNA, fragmentaz enzimi ile 37°C’de inkübe edilmesi. Bu yöntem ile 150-250 bp uzunluğunda DNA fragmanları elde edildi.

Pürifikasyon\*: Pürifikasyon işlemi manyetik boncuklar (Magnetik bead) ile yapıldı. Manyetik boncuk çözeltisi önce 30 dakika oda sıcaklığına bekletildi. İki mililitrelik konik dipli tüplere her örnek için eklenen DNA volümünün 1,8 katı manyetik boncuk dağıtıldı. Üzerine fragmentasyon basamağı sonrası elde edilen DNA ürünleri eklendi. Vorteks ve spin yöntemleri ile homojenizasyon sağlandı. Manyetik boncukların DNA’ya bağlanmasını sağlamak amacıyla 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından tüpler manyetik standı yerleştirilip, sıvı şeffaf olduğunda süpernatant kısım pipetle atıldı. Tüpler manyetik standı üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) ilave edildi. Otuz saniye bekleme sonrası alkol pipetaj ile uzaklaştırıldı. Bu işlem toplam 2 kez daha tekrarlandı. Kalan alkolü temizlemek için örnekler spin yapıldı ve 10 µL pipetle kalan alkol temizlendi. Alkol tamamen evapore oluncaya kadar beklendi. Tüpler standı üzerindeyken nükleaz içermeyen su eklendi ve standtan alındı. Vorteks ve spin sonrası 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar standı yerleştirilip, çözeltinin şeffaflaşması sonrası süpernatant yeni tüplere alındı ve sonraki aşamalar için kullanıldı. DNA üzerine uygulanan tüm işlemlerin arasında pürifikasyon tekrarlandı. \*

DNA ucu onarımı (End repair): Test kitinde bulunan ‘End Repair Mix’ üzerine bir önceki basamakta elde edilen DNA ürünü eklenerek 20°C’de 30 dk inkübe edildi.

\*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

A ucu takılması (A-tailing): Bu adımda DNA fragmentlerinin ucuna adenilasyon amacıyla test kitinde bulunan A-tailing tüplerinin üzerine bir önceki pürifikasyon basamağından elde edilen DNA ürünü eklendi. Örnekler 30°C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı.

\*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

Adaptör Ligasyonu: Bir önceki pürifikasyondan elde edilen süpernatant ligasyon tüplerine eklendi. Üzerine kitin içerisinde bulunan adaptör eklendi. 15 dk 20°C’de inkübasyon yapıldı. Ardından USER enzimi eklenip ve 37°C’de 15 dk inkübe edildi.

\*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

İndeks ile İşaretleme: Dual indeks (ikili indeks) seti kullanıldı. İndeksler aynı anda birden fazla örneğin tek bir tüpte birleştirilmesi ve eş zamanlı sekanslanmasını mümkün kılan primer dizileridir. Çalışmada i5 ve i7 olarak adlandırılan evrensel dual indeks sistemi kullanılmıştır. Bir önceki adımdan elde edilen DNA ürünü, ‘KAPA Library Amplification Mix’ ve indeks primerleri ile reaksiyon karışımı oluşturulup PCR cihazına kondu ve kit kullanım kılavuzunda önerilen PCR protokol basamakları uygulandı.

\*Pürifikasyon adımı tekrarlandı.

Prob Hibridizasyonu: Kitin içerisinde bulunan Blok miks, Hibridizasyon miks ve Target Capture’ problemleri ile hibridizasyon reaksiyon çözeltisi hazırlandı. Örnekler 16 saat 65°C’de inkübe edildi.

Streptavidin boncuk ile hedef kütüphanenin seçilmesi: Hibridizasyondan basamağından sonra elde edilen örnekler streptavidin boncuklar ve kitin içerisinde bulunan yıkama çözeltileri ile seri yıkama işleminden geçirildi. Elde edilen DNA ürünü hedef kütüphaneyi oluşturmaktadır.

Hedef kütüphanenin amplifikasyonu: Elde edilen hedef kütüphane universal PCR primerleri ile amplifiye edildi. Son kez pürifikasyon adımı tekrarlandı. Yürütme öncesi hedef bölgeleri seçilmiş, indekslenmiş kütüphanenin konsantrasyon kontrolü yapıldı.

Illumina Cihazı ile Yeni Nesil Dizileme: Kütüphane hazırlama kiti ile elde edilen indekslenmiş örnekler tek bir tüpte birleştirildikten sonra Illumina™ HiSeq cihazı kartuşuna yüklendi. Reaksiyon kartuşu ve akış hücresi (‘flow cell’) cihaza yerleştirildi. Cihazdan elde edilen veri, “FASTQ” formatında alındı.

### 3.7.2 WES Biyoinformatik Analizi

Tüm ekzom dizileme sonucunda elde edilmiş 'FASTQ' formatındaki ham veriler SEQ (Genomize, Türkiye) programı kullanılarak UCSC veri tabanının Şubat 2009 (GRch37/hg19) yılında güncellenen insan genom dizileme dizisi genomu referans alınarak hizalama, sıralama, varyant çağırma ('variant calling'), güvenilirlik skorlaması ve varyant anotasyonu işlemlerinden geçirildi (187). Hizalama ve sıralama için *Burrows-Wheeler-Aligner* programı, varyant çağırma ('variant calling') için optimize edilmiş haplotip temelli *FreeBayes* programı kullanıldı. Varyantların güvenilirlik değerlendirmeleri primer ve sekonder kaplam eşiği, alternatif/allel oranı eşiği, iplikçik bias değeri eşiği ve heterozigot varyantlar için her iki iplikçikteki alternatif/allel oranı parametreleri baz alındı. Güvenirlik değerlendirmesi sonucunda varyantlar tüm parametrelerde geçtiğinde yüksek güvenilirlik, bir veya daha fazla parametreden geçtiğinde düşük güvenilirlik, primer kaplam eşiğini geçemediğinde ise yetersiz güvenilirlik etiketi ile sınıflandırıldı. Yetersiz etiketi alan varyantlar değerlendirilmeye alınmadı. Elde edilen veriler ileri filtrelendirmeler ile patojenisite açısından değerlendirildi. Tün analiz işlemleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapıldı.

### 3.7.3 WES Verilerinin Klinik Analizi

Saptanan varyantların patojenisite sınıflandırmasında 2015 yılında yayınlanan Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Derneğinin güncel kılavuzu esas alınmıştır (188). Buna göre varyantlar sırasıyla benign, muhtemel benign, klinik önemi belirsiz, muhtemel patojenik ve patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Patojenisite açısından elde edilebilecek ek bilgilerin (*de novo* olup olmamaları, cis-trans durumunda bulunan varyantların ayırt edilmesi vb.) analize dahil edilebilmesi için; ebeveynlerin verileri de olgular ile beraber analiz edilmiştir. Analiz sırasında kullanılan veriler aşağıda belirtilmiştir;

- Varyantın tipi (nonsense, missense, stop vb.),
- Varsa daha önce bildirilmiş aynı aminoasit değişiminin patojenisitesi,
- *de novo* olup olmaması,
- Bilinen fonksiyonel çalışmasının olup olmaması,
- Toplumda minör allel frekansı ve merkez içi frekansı,
- Varsa eski vaka-kontrol çalışmalarındaki frekansları,
- Protein üzerinde mutasyonel 'hotspot' bir noktada yer alıp almaması,
- Biallelik olup olmaması,
- Protein uzunluğu üzerindeki etkisi,
- *In silico* analiz verileri (SIFT, PolyPhen, CADD, MetaLR ve REVEL prediksyon araçları)
- Uluslararası veri tabanlarındaki verileri
- Varyantın sebep olduğu hastalığın kalıtım modeli göz önüne alınarak heterozigot/homozigot tespiti
- Human Phenotype Ontology (HPO) terimi ile tespit edilen varyant geninin ilişkisi

Varyantların patojenik sınıflandırmasında SEQ platformu, Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ait ClinVar veri tabanı, Varsome (Saphetor, İsviçre) analiz platformu ve Franklin (Genoox, ABD) analiz platformlarından yararlanıldı. Yapılan birinci basamak incelemeler sonucunda ACMG kriterlerince tanı alamayan olgular ikinci basamak incelemede DAVID, STRING veri tabanları ve literatür taramaları kullanılarak incelendi.

İkinci basamak incelemede filtrelenen hedef varyantlar hücrel yolaklardaki varyant yüklerinin araştırılması amacıyla DAVID ('Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery') veri tabanında işlevsel zenginleştirmeye tabii tutuldu (189). Bu sayede immün olmayan hidrops fetalis patofizyolojisinde rol alan hücrel yollarda anlamlı artmış varyant yükünün varlığı değerlendirildi. Değerlendirme sırasında *Benjamini-Hochberg* metodunda  $p < 0,05$  olan hücrel yollar anlamlı kabul edildi (210).

Varyant tespit edilen genler literatürde immün olmayan hidrops fetalis etiyolojisinde rol oynayan veya fenotipik serilerde hidrops bildirilen genler ile fonksiyonel olarak ilişki içinde olup olmadığı STRING ('Search Tool for Recurring Instances of Neighboring Genes') programında değerlendirildi. Değerlendirme için İOHF olgularında bildirilmiş veya fenotipik serilerde hidrops ile ilişkisi belirtilen gen listesi oluşturuldu (Tablo-4).

Listede yer alan genlerde tespit edilen varyantlar ve STRING programında minimum etkileşim skoru 0.7 ve üzeri olan yüksek güvenilirlikli fonksiyonel etkileşimler esas alındı (190).

STRING programında araştırılacak sinonim olmayan tek nükleotid değişimi varyantlar REVEL ("Rare Exome Variant Ensemble Learner") ve MetaLR algoritma skorları değerlendirilerek seçildi (190-192). REVEL MutPred, FATHMM v2.3, VEST 3.0, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP, and phastCons in-silico analiz programlarının skorlarının entegrasyonu ile çalışan bir analiz programıdır. REVEL skorlamasında tespit edilen 0-1 arası değerler tespit edilen değişimin patojenisitesini yansıtmaktadır. REVEL skorlaması tanımlayıcı bir tahmin yapmamakla birlikte 0,5 değerinin üzerindeki değerler muhtemel hastalık yapıcı, altındakiler muhtemel benign olarak tahmin edilmektedir. REVEL skoru için Ioannidis ve arkadaşları 0,75 ve üstü skorların sınır olarak kabul edilebileceğini önermiştir (191). Yine aynı çalışmada daha sensitif bir analiz amaçlandığında bu sınırın 0,5 olarak da kabul edilebileceği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada varyant seçiminin spesifitesinin artırılması amacıyla REVEL skoru 0,5-0,75 arasındaki değerler VUS yönünde; 0,75 üzerindeki değerler ise patojenisite lehine değerlendirildi.

MetaLR "dbNSFP" projesi kullanılarak 37 algorithmada elde edilen skorların birleştirildiği ve sinonim olmayan tek nükleotid değişimlerinin puanlandığı bir algoritmadır. Skorlama sırasında varyantların protein üzerindeki etkisi ve allel frekans bilgileri dahil edilerek lojistik regresyon modeli kullanılmaktadır. İşlem sonucunda 0-1 arasında kantitatif sonuç elde edilmektedir ve varyantlar '*tolerated*' ve '*damaging*' olarak sınıflandırılmaktadır (192, 193).

|          |           |          |           |         |          |
|----------|-----------|----------|-----------|---------|----------|
| AARS2    | ABCC6     | ACAD9    | ACTA1     | ACTB    | ADAMTS3  |
| AHCY     | ALG1      | ALG8     | ALG9      | ALPK3   | ANKRD11  |
| ASAH1    | ASCC1     | ATP11C   | B9D1      | B9D2    | BICD2    |
| BRAF     | BSND      | CA2      | CACNA1C   | CALCRL  | CANT1    |
| CBL      | CC2D2A    | CCBE1    | CDAN1     | CDC42   | CEP      |
| CEP120   | CEP290    | CEP55    | CHD7      | CHRNA1  | CHRNA1   |
| CHRNA1   | CLCN7     | CLCNKA   | CLCNKB    | COG6    | COL1A1   |
| COL1A2   | COL2A1    | CRTAP    | CSPP1     | CTSA    | CYBB     |
| CYP11A1  | CYP21A2   | DHCR24   | DHCR7     | DMPK    | DNAH9    |
| DOK7     | DYNC1H1   | DYNC2H1  | EBP       | ENPP1   | EP300    |
| EPHB4    | ERCC5     | ESCO2    | FAT4      | FBXW11  | FGFR2    |
| FGFR3    | FIG4      | FKTN     | FLNA      | FLT4    | FLVCR2   |
| FOXC2    | FOXP3     | FRAS1    | FREM2     | FZD6    | G6PD     |
| GAA      | GALNS     | GATA1    | GATA2     | GATA5   | GBA      |
| GBE1     | GLB1      | GLE1     | GLMN      | GNPTAB  | GPI      |
| GRIN2B   | GRIP1     | GUSB     | HADHA     | HADHB   | HBA1     |
| HBA2     | HBB       | HDAC8    | HK1       | HRAS    | HSPD1    |
| IDUA     | IFT122    | IFT140   | IFT172    | IFT80   | IKBKKG   |
| IKZF1    | INPPL1    | INVS     | ITGA9     | ITGB3   | ITPR1    |
| KCNH2    | KCNJ1     | KCNQ1    | KCTD1     | KDM6A   | KIAA0586 |
| KIAA1109 | KLF1      | KLHL40   | KMT2D     | KRAS    | KRIT1    |
| LAMB2    | LARS2     | LBR      | LIPA      | LMOD3   | LRP6     |
| LZTR1    | MAP2K1    | MAP2K2   | MED12     | MED13L  | MGAT2    |
| MID1     | MKKS      | MKS1     | MMACHC    | MRPS16  | MRPS22   |
| MUSK     | MVK       | MYBPC3   | MYH3      | MYH7    | MYRF     |
| MYSM1    | NDUFB10   | NEB      | NEK1      | NEK9    | NEU1     |
| NEXN     | NIPBL     | NPC1     | NPC2      | NPHS1   | NPHS2    |
| NPL      | NRAS      | OFD1     | OSTM1     | P3H1    | PEX1     |
| PEX10    | PEX11B    | PEX12    | PEX13     | PEX14   | PEX16    |
| PEX19    | PEX2      | PEX26    | PEX3      | PEX5    | PEX6     |
| PHGDH    | PIEZO1    | PIGN     | PIK3CA    | PKHD1   | PKLR     |
| PKP2     | PLEKHM1   | PMM2     | POU3F3    | PPP3CA  | PRF1     |
| PRKAG2   | PSPH      | PTCH1    | PTH1R     | PTPN11  | RAD21    |
| RAF1     | RAPSN     | RARS2    | RASA      | RASA1   | RIPK4    |
| RIT1     | RNASEH2B  | RPGRIP1L | RPL11     | RPL15   | RPL26    |
| RPL27    | RPL31     | RPL35A   | RPL36     | RPL5    | RPS10    |
| RPS15    | RPS17     | RPS19    | RPS24     | RPS26   | RPS27    |
| RPS28    | RPS29     | RPS7     | RYR1      | SCN2A   | SCN5A    |
| SEC23B   | SERPINA11 | SF3B4    | SGPL1     | SHOC2   | SLC12A1  |
| SLC17A5  | SLC22A5   | SLC25A26 | SLC26A2   | SLC35D1 | SLC4A1   |
| SLC6A9   | SMC1A     | SMC3     | SMN1      | SMN2    | SMPD1    |
| SOS1     | SOX18     | SPTA1    | SPTB      | STAT3   | STT3B    |
| SUMF1    | SUZ12     | TALDO1   | TAPT1     | TAZ     | TCIRG1   |
| THSD1    | TMEM216   | TMEM67   | TNFRSF11A | TNFSF11 | TPM2     |
| TRIP11   | TRNT1     | TSC1     | TSC2      | TSR2    | TTC21B   |
| TTN      | UNC13D    | UROS     | VEGFR3    | WAC     | WDFY3    |
| WDR19    | WDR34     | WDR35    | WDR60     | WDR81   | WT1      |
| ZEB2     |           |          |           |         |          |

**Tablo-4:** İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) olgularında bildirilen veya fenotipik serilerde hidrops ile ilişkilendirilmiş genler (14, 19, 201, 215).

## 4. BULGULAR

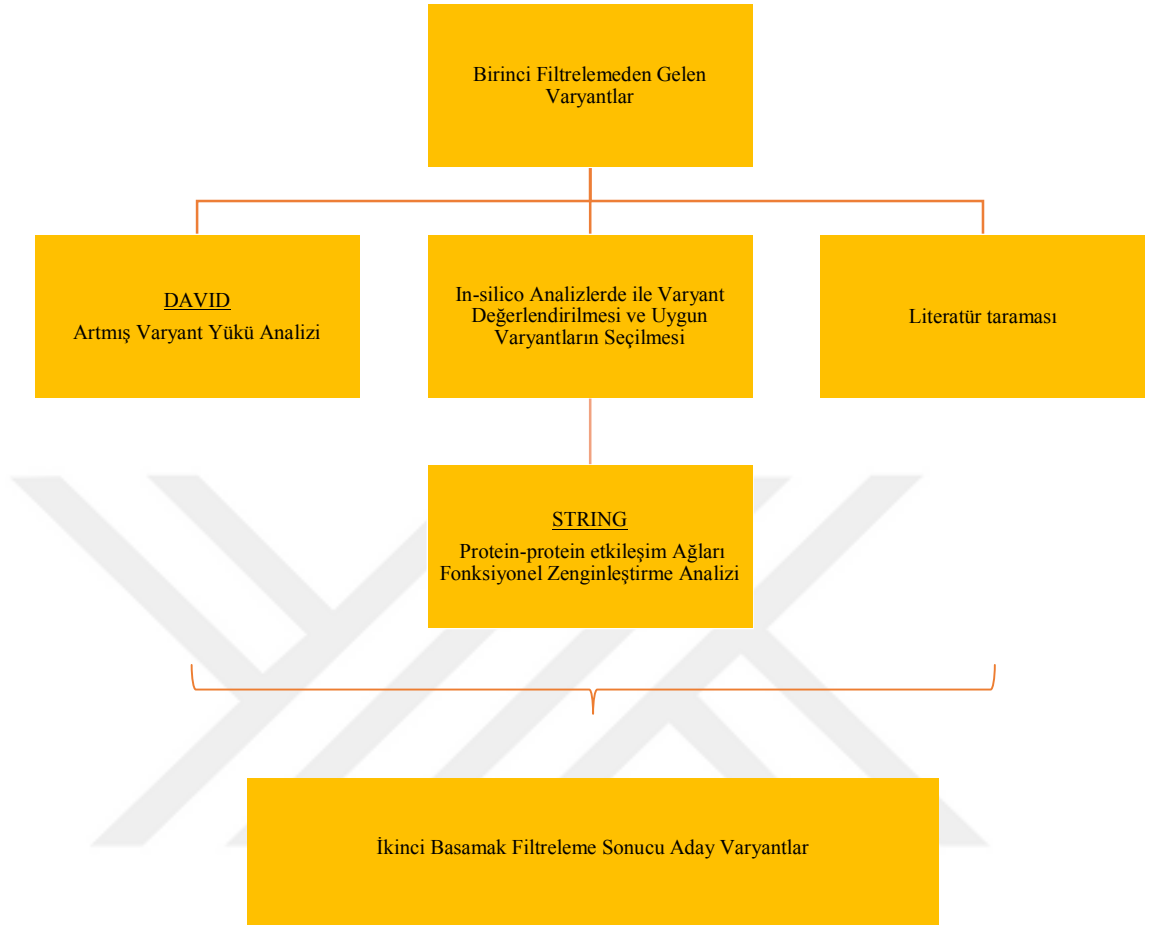
### 4.1 Tüm Ekzom Dizileme Bulguları

Çalışmada altı fetal örneğe anne-baba dahil edilerek *trio analiz* yapıldı. Elde edilen veriler VCF formatında değerlendirilerek kalite kontrol denetiminden geçirildi. Olgu V hariç tüm olgularda 20x okuma derinliğinde en az %93 kaplam verisine ulaşıldı. Tüm ekzom dizileme analizinde ortalama okuma sayısı 35,6 milyon olarak tespit edildi (Tablo-5).

| Olgular         | Okuma Sayısı (milyon) | Ortalama Derinlik | Het/Hom Oranı | Ti/Tv Oranı | En az 20 kere (20x) okunan baz yüzdesi | En az 50 kere (50x) okunan baz yüzdesi |
|-----------------|-----------------------|-------------------|---------------|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Aile I</b>   |                       |                   |               |             |                                        |                                        |
| I.1 (fetüs)     | 27,1                  | 54,43             | 1,46          | 2,2         | %96,72                                 | %53,31                                 |
| I.2 (anne)      | 25,0                  | 48,74             | 1,44          | 2,17        | %96,23                                 | %42,35                                 |
| I.3 (baba)      | 31,2                  | 61,11             | 1,51          | 2,16        | %97,90                                 | %67,71                                 |
| <b>Aile II</b>  |                       |                   |               |             |                                        |                                        |
| II.1 (fetüs)    | 34,6                  | 68,78             | 1,58          | 2,18        | %98,20                                 | %77,39                                 |
| II.2 (anne)     | 34,7                  | 69,04             | 1,54          | 2,16        | %98,25                                 | %77,85                                 |
| II.3 (baba)     | 40,3                  | 81,05             | 1,57          | 2,18        | %98,72                                 | %87,98                                 |
| <b>Aile III</b> |                       |                   |               |             |                                        |                                        |
| III.1 (fetüs)   | 37,6                  | 75,73             | 1,44          | 2,19        | %98,59                                 | %84,62                                 |
| III.2 (anne)    | 37,2                  | 74,69             | 1,55          | 2,18        | %98,38                                 | %84,46                                 |
| III.3 (baba)    | 39,0                  | 78,55             | 1,44          | 2,17        | %98,64                                 | %86,50                                 |
| <b>Aile IV</b>  |                       |                   |               |             |                                        |                                        |
| IV.1 (fetüs)    | 34,8                  | 60,72             | 1,47          | 2,16        | %96,77                                 | %62,78                                 |
| IV.2 (anne)     | 33,2                  | 53,34             | 1,31          | 2,14        | %93,24                                 | %46,63                                 |
| IV.3 (baba)     | 32,4                  | 52,67             | 1,39          | 2,14        | %93,39                                 | %45,34                                 |
| <b>Aile V</b>   |                       |                   |               |             |                                        |                                        |
| V.1 (fetüs)     | 27,2                  | 41,72             | 1,26          | 2,16        | %87,99                                 | %24,89                                 |
| V.2 (anne)      | 42,5                  | 67,84             | 1,38          | 2,12        | %95,82                                 | %68,47                                 |
| V.3 (baba)      | 32,8                  | 53,26             | 1,25          | 2,16        | %93,53                                 | %46,49                                 |
| <b>Aile VI</b>  |                       |                   |               |             |                                        |                                        |
| VI.1 (fetüs)    | 36,0                  | 65,89             | 1,47          | 2,17        | %97,76                                 | %74,01                                 |
| VI.2 (anne)     | 41,7                  | 76,27             | 1,36          | 2,11        | %98,28                                 | %83,86                                 |
| VI.3 (baba)     | 53,6                  | 99,26             | 2,61          | 2,12        | %98,83                                 | %93,72                                 |

**Tablo-5:** Tüm ekzom dizileme kalite parametreleri (Ti/Tv: Transisyon/Transversiyon oranı)

Yapılan tüm ekzom dizileme analizlerine indeks olgularda ortalama 42.468 varyant saptandı. Her bir olguda varyantlar GnomAD, ESP6500, ExAC, 1000Genome veri tabanları incelenerek  $MAF > 0.001$  olan varyantlar elendi. Ardından RefSeq veri tabanında var olan transkriptler temel alınarak ekzonlarda ve kırılma bölgelerinde (ekzon-intron sınırı, +10, -10 bp) yer almayan varyantlar elendi. Kalan varyantlar SEQ veri tabanında Türkiye geneli  $MAF > 0.001$  varyantlar elendi. Tespit edilen varyantlar ACMG kriterleri kullanılarak sınıflandırıldı. Sınıflandırılma sırasında “VarSome” ve “Franklin Genoox” ve SEQ Genomize varyant sınıflandırma programları kullanıldı. LP/P tespit edilen varyantlar kliniği açıkladığı ve literatürde bildirimleri olduğu takdirde etiyolojik kabul edildi. Birinci basamak sonunda etiyolojik tanısız genin bulunmadığı olgular ikinci basamak filtrelemeler ile incelendi. İkinci basamak incelemelerinde olgular DAVID, STRING programları kullanılarak ve REVEL, MetaLR in-silico prediksyon puanlaması baz alınarak incelendi. Ayrıca tespit edilen varyantlar literatür taraması ile immün olmayan hidrops ilişkisi açısından değerlendirildi.



**Şekil-2:** Tüm Ekzom Dizileme İkinci Basamak Veri Analizinde İzlenilen Strateji.

DAVID veri tabanında artmış varyant yükü bulunan yolakların tespit edilmesi için hedef varyantların ait olduğu gen listeleri ‘Official Gene-Symbol’ isimleri ile girildi. Referans genom ve background olarak *homo sapiens* kullanıldı. *Benjamini* protokolünde  $p < 0,05$  değerine sahip yolaklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Yapılan incelemede;

Olgu II’de Pantotenat ve Koenzim A biyosentez yolağında ( $p=0,014$ ),

Olgu III’de oosit mayoz ( $p=0,0059$ ), ve tiroid hormon sentez ( $p=0,037$ ) yolaklarında artmış varyant yükü tespit edildi.

#### 4.2. Olguların Klinik Özellikleri ve Ekzom Dizileme Sonuçları

Olgularda saptanılan ultrasonografik bulgular (Tablo-6), klinik bulgular ve tüm ekzom dizileme sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

| Olgu No  | Fetal Ultrasonografide Tespit Edilen Bulgular                                                                                                                                                                            |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Olgu I   | Kistik Higroma, Ventriküler Septal Defekt, Sekundum Atrial Septal Defekt, Hafif Mitral Yetmezlik, Hafif Triküspid Yetmezlik                                                                                              |
| Olgu II  | Cilt-ense ödemi, Bilateral Hidrotoraks, Genişlemiş Lateral Ventrikül (13,6 mm), Üçüncü Ventrikülde Dilatasyon, Korpus Kallozum Agenezisi, Blake Pouch Kisti, Müsküler Ventriküler Septal Defekt, Uzun Kemiklerde Kısalık |
| Olgu III | Perikardiyal Efüzyon, Batında Yaygın Asit, Cilt Altı Ödem                                                                                                                                                                |
| Olgu IV  | Plevral Efüzyon, Batında Yaygın Asit, Cilt Altı Ödem                                                                                                                                                                     |
| Olgu V   | Perikardiyal Efüzyon, Plevral Efüzyon, Batında Yaygın Asit                                                                                                                                                               |
| Olgu VI  | Skalp Ödemi, Plevral Efüzyon, Batında Yaygın Asit, Unilateral Renal Agenezi                                                                                                                                              |

**Tablo-6:** İmmün olmayan hidrops fetalis (İOHF) olgularında tespit edilen ultrasonografi bulguları

##### 4.2.1. Olgu I'e Ait Klinik Bulgular:

G3P2 11 haftalık gebeliği mevcut olgunun takibinde yapılan fetal USG incelemesinde boynun arka kısmında kistik higroma ile uyumlu görünüm tespit edilmesi sebebiyle tıbbi genetik polikliniğine başvurdu. Yapılan fetal ekokardiyografi incelemesinde orta şiddette ventriküler septal defekt, sekundum tipte atrial septal defekt, hafif mitral ve triküspit yetmezliği gözlemlendi. Obstetrik özgeçmiş harici özellik taşımamaktadır. Alınan soygeçmiş öyküsünde durumu açıklayıcı belirgin özellik gözlemlenmedi (Şekil-3, olgu I). Fetüs 19. gebelik haftasında kistik higromanın ilerlemesi sebebiyle perinatoloji konseyi kararı ile termine edildi. Yapılan fetal otopside ensede yele şeklinde kese yapısı, yaygın ödem ve ventriküler septal defekt dışında ek bulgu tespit edilmedi. Olguya ilişkin filtrelemelerde tespit edilen varyant sayıları (Şekil-4, olgu I), birinci basamak filtreleme sonucunda tespit edilen varyant (Tablo-7) ilgili şekil ve tablolarda belirtilmiştir.

#### **4.2.2. Olgu II'ye Ait Klinik Bulgular:**

G1P0 20 haftalık gebelik takiplerinde TV-USG'de fetüste belirgin cilt-ense ödemi, genişlemiş lateral ventrikül (13,6 mm), üçüncü ventrikülde dilatasyon, korpus kallozum agenezisi, blake pouch kisti, bilateral hidrotoraks, müsküler ventriküler septal defekt, uzun kemiklerde kısalık olması sebebiyle tıbbi genetik polikliniğine yönlendirildi. Alınan medikal ve obstetrik özgeçmişte belirgin özellik görülmedi. Benzer şekilde soygeçmiş belirgin bir özellik taşımamaktadır (Şekil-3, olgu II). Kordosentez örneğinden çalışılan fetal kromozom analizi normal tespit edildi. Gebelik sonrasında perinatoloji konseyi kararı ile gebelik 23. haftada termine edildi. Olguya ilişkin filtrelemelerde tespit edilen varyant sayıları (Şekil-4, olgu II), filtreleme sonucunda tespit edilen aday varyantlar (Tablo-8) ilgili şekil ve tablolarda belirtilmiştir.

#### **4.2.3. Olgu III'e Ait Klinik Bulgular:**

G1P0 23 hafta gebeliği mevcut olguya yapılan ultrasonografi sırasında cilt ödemi, perikardiyal efüzyon ve batında yaygın asit tespit edilmesi nedeni ile tıbbi genetik polikliniğine yönlendirildi. Yapılan fetal ekokardiyografi incelemesi normaldi. Özgeçmiş sorgulamasında durumu açıklayabilecek belirgin özellik görülmedi. Soygeçmişte eşler arasında akrabalık olduğu gözlemlendi (Şekil-3, olgu III). Olguya ilişkin filtrelemelerde tespit edilen varyant sayıları (Şekil-4, olgu III), filtreleme sonucunda tespit edilen aday varyantlar (Tablo-9) ilgili şekil ve tablolarda belirtilmiştir.

#### **4.2.4. Olgu IV'e Ait Klinik Bulgular:**

Olgu G1P0 19 haftalık gebe iken takibi sırasında tespit edilen hidrops fetalis nedeni ile tıbbi genetik polikliniğine başvurdu. Yapılan fetal ultrasonografi incelemesinde plevral efüzyon, cilt altı ödem ve batında asit tespit edildi. 24 haftalık iken perinatoloji konseyi kararı ile fetüs termine edildi. Yapılan özgeçmiş sorgulamasında durumu açıklayıcı belirgin özellik görülmedi. Soygeçmişte dikkat çekici bulgu gözlemlenmedi (Şekil-3, olgu IV). Olguya ilişkin filtrelemelerde tespit edilen

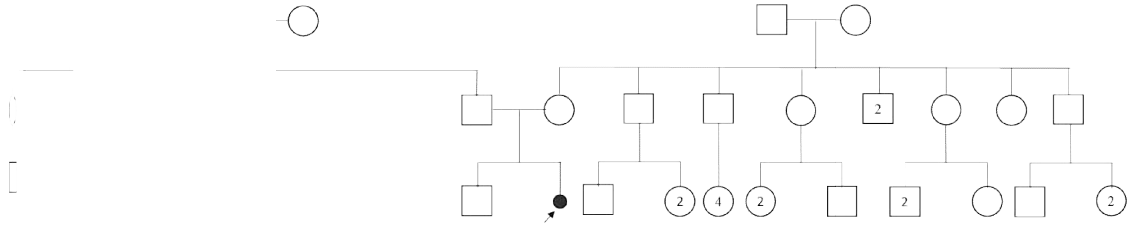
varyant sayıları (Şekil-4, olgu IV), filtreleme sonucunda tespit edilen aday varyantlar (Tablo-10) ilgili şekil ve tablolarda belirtilmiştir.

#### **4.2.5. Olgu V'e Ait Klinik Bulgular:**

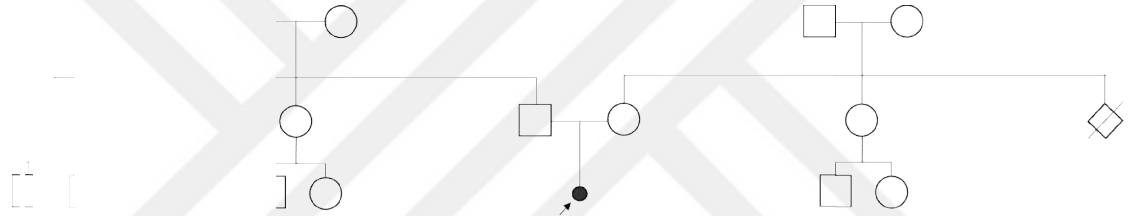
G1P0 olgu 22 haftalık gebelik sırasında yapılan fetal ultrasonografide perikardiyal efüzyon, plevral efüzyon ve batında yaygın asit görünümü saptanması sebebiyle tıbbi genetik polikliniğine yönlendirildi. Çiftin medikal özgeçmişinde durumu açıklayıcı dikkat çekici bulgu tespit edilmedi. Soygeçmiş, eşlerin birinci derece kuzen olması haricinde kliniği açıklayıcı özellik taşımamaktadır (Şekil-3, olgu V). İmmün olmayan hidrops fetalis tanısı ile amniyon örneğinden yapılan karyotip analizi sonucu normal tespit edildi. Gebelik daha sonra abortus ile sonuçlandı. Olguya ilişkin filtrelemelerde tespit edilen varyant sayıları (Şekil-4, olgu V), filtreleme sonucunda tespit edilen aday varyantlar (Tablo-11) ilgili şekil ve tablolarda belirtilmiştir.

#### **4.2.6. Olgu VI'ya Ait Klinik Bulgular:**

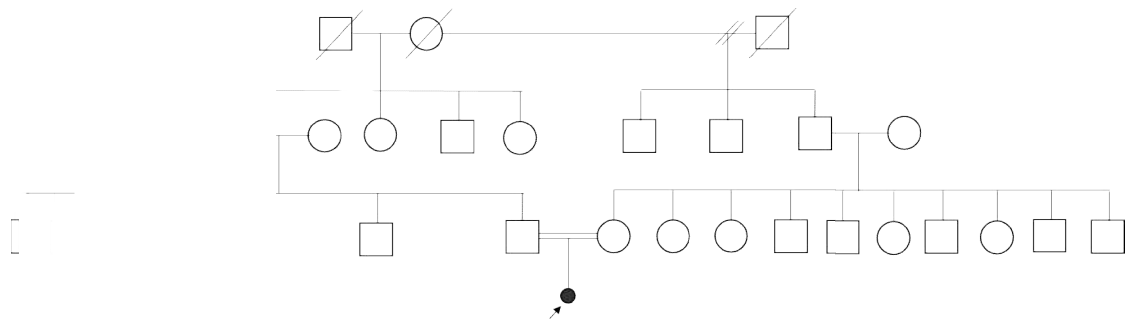
G1P0 olgu 25 haftalık gebelik sırasında yapılan fetal ultrasonografide skalp ödemi, plevral efüzyon, batında yaygın asit, jeneralize ödem ve unilateral renal agenezi sebebi ile tıbbi genetik polikliniğine yönlendirildi. Alınan medikal özgeçmişinde mevcut gebelikte 16. haftada kistik higroma tespit edildiği; soygeçmiş sorgulamasında annenin kız kardeşinin 10 yaşında böbrek yetmezliği ile takip edildiği ve ex olduğu ayrıca babanın annesinin iki düşüğü olduğu öğrenildi (Şekil-3, olgu VI). İmmün olmayan hidrops fetalis tanısı ile kordosentez örneğinden yapılan karyotip analizi sonucunun normal olduğu tespit edildi. Gebelik 26. haftada missed abortus ile kaybedildi. Olguya ilişkin filtrelemelerde tespit edilen varyant sayıları (Şekil-4, olgu VI), birinci basamak filtreleme sonucunda tespit edilen varyant (Tablo-12) ilgili şekil ve tablolarda belirtilmiştir.



**Olgu I**

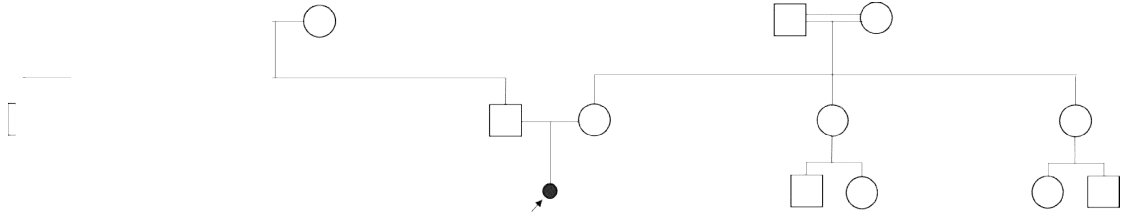


**Olgu II**

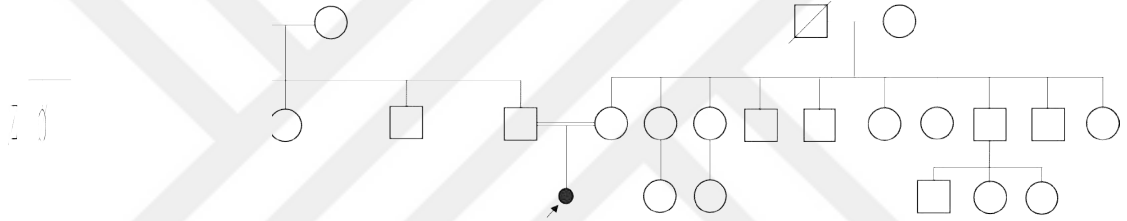


**Olgu III**

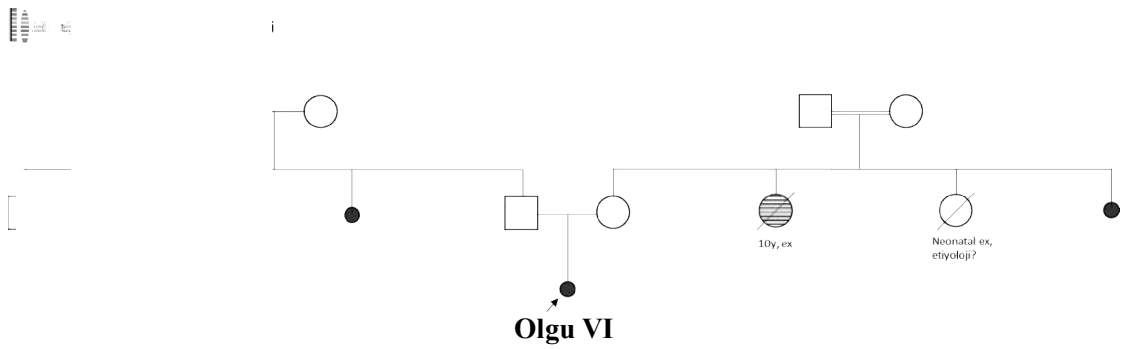
**Şekil-3:** Çalışmaya katılan indeks vakaları ve akrabalarını gösteren pedigriler



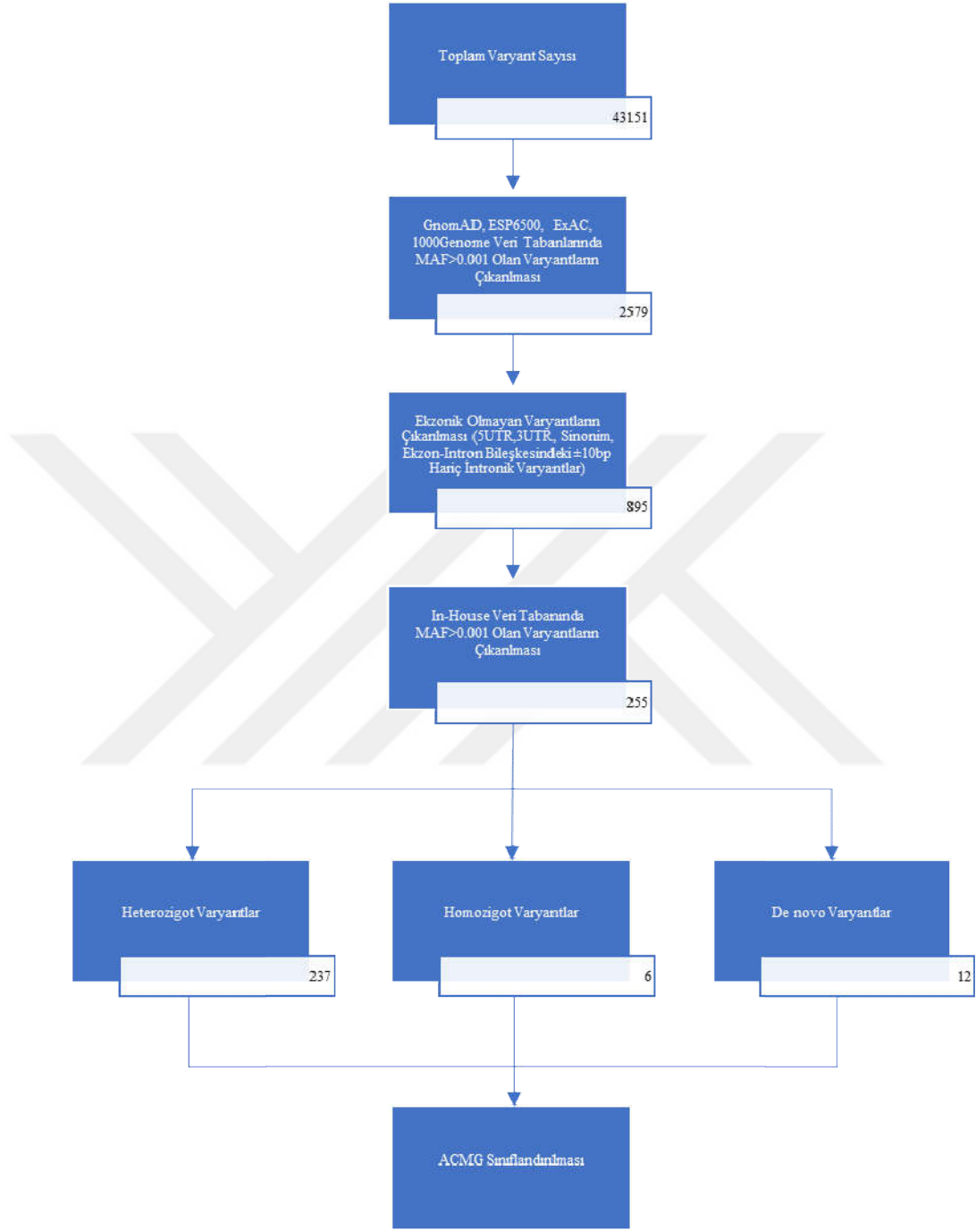
**Olgu IV**



**Olgu V**

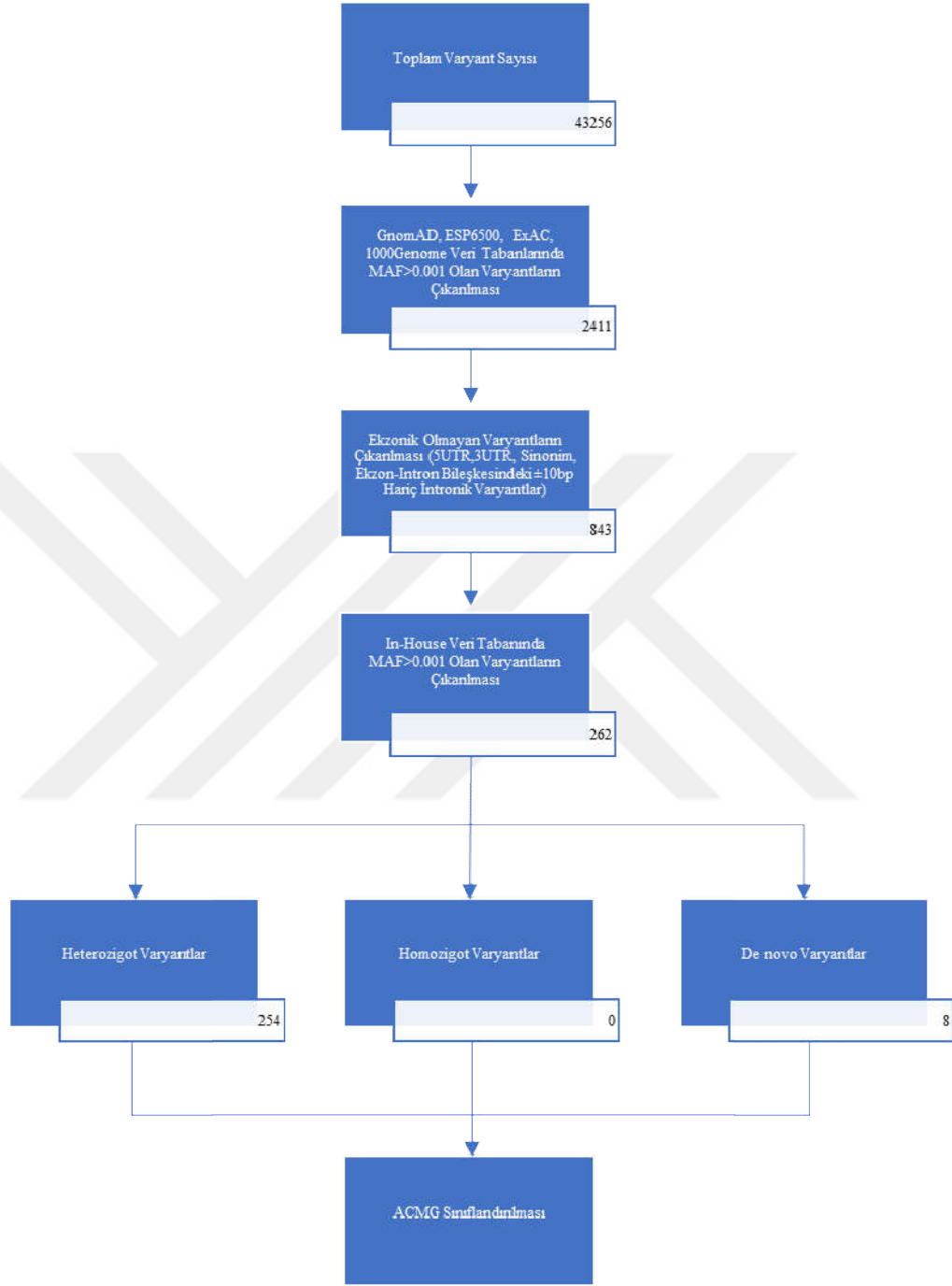


**Şekil-3(devamı):** Çalışmaya katılan indeks vakaları ve akrabalarını gösteren pedigriler



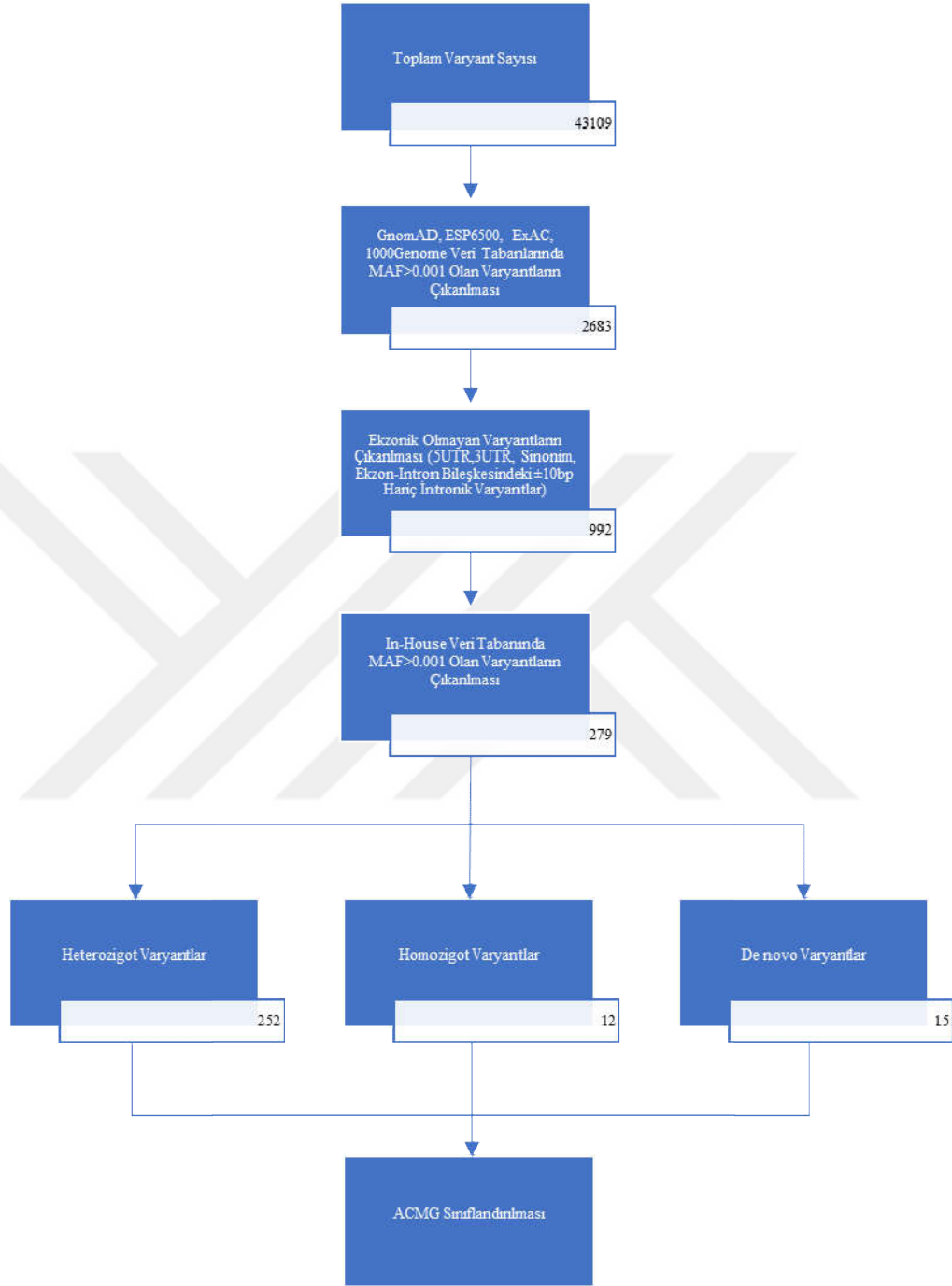
**Olgu I**

**Şekil-4:** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji. Sağ alt kutucuklarda belirtilen olguda filtreleme sonrasında saptanan varyant sayıları belirtilmektedir.



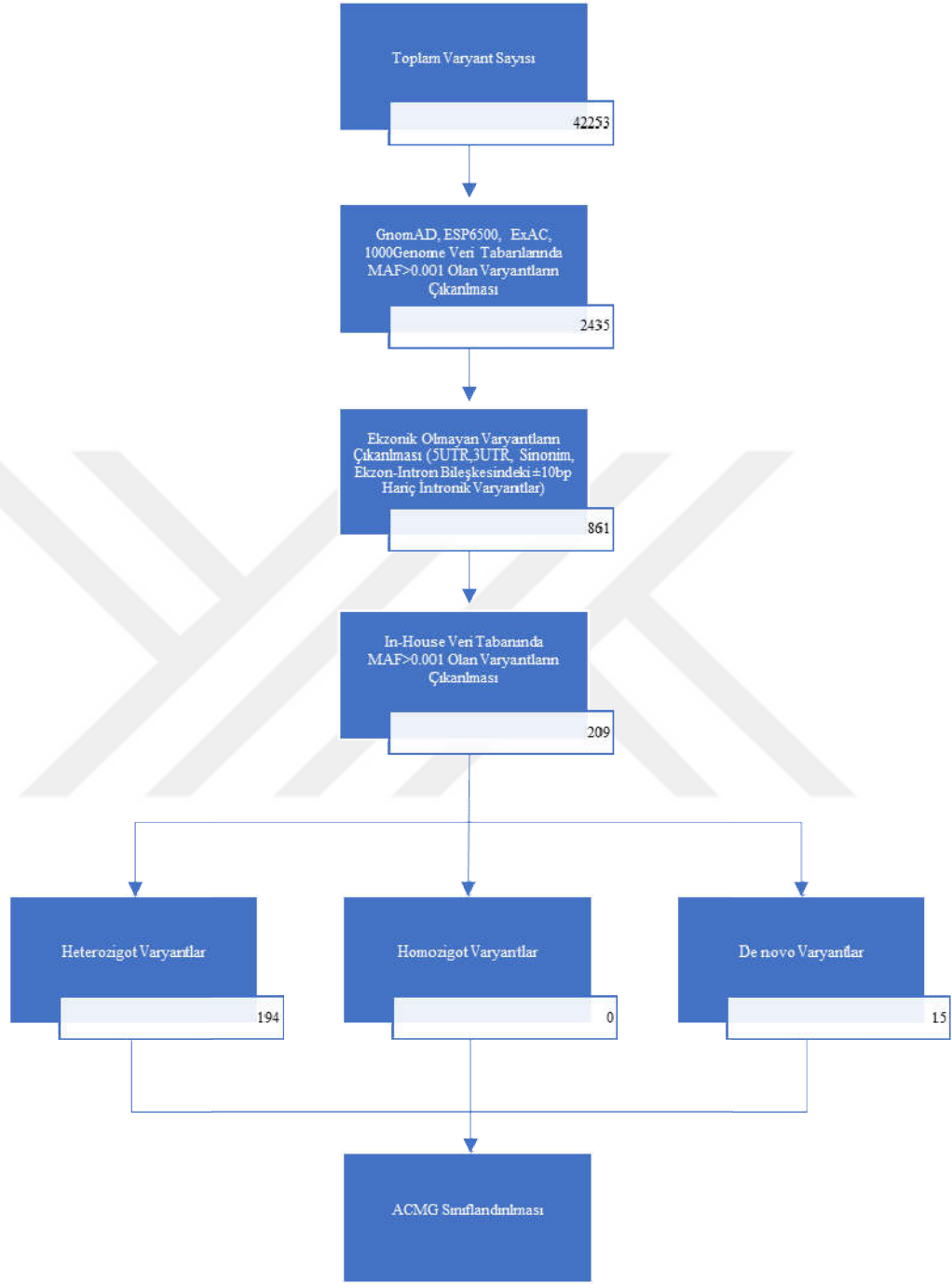
**Olgu II**

**Şekil-4(devamı):** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji. Sağ alt kutucuklarda belirtilen olguda filtreleme sonrasında saptanan varyant sayıları belirtilmektedir.



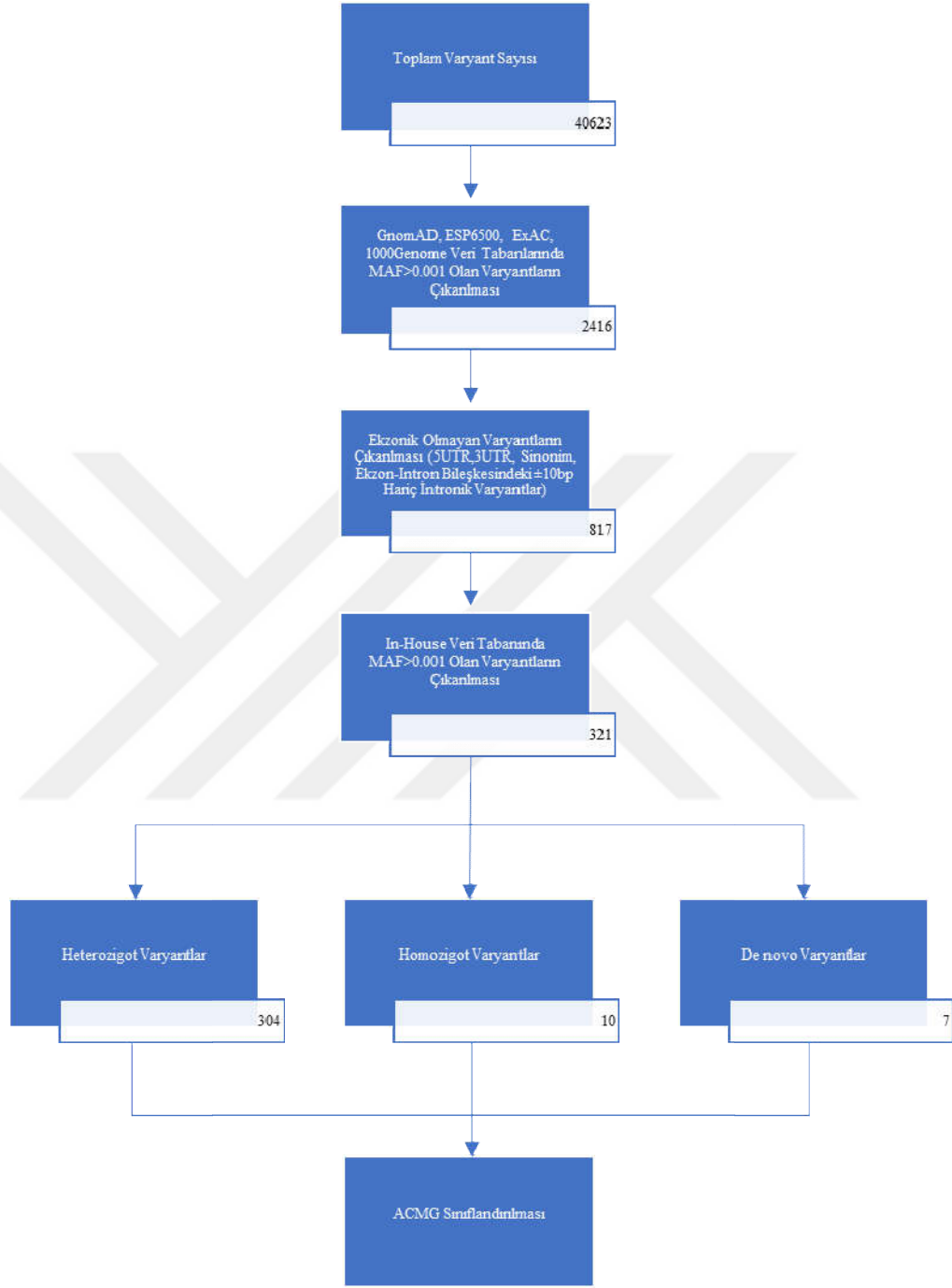
**Olgu III**

**Şekil-4(devamı):** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji. Sağ alt kutucuklarda belirtilen olguda filtreleme sonrasında saptanan varyant sayıları belirtilmektedir.



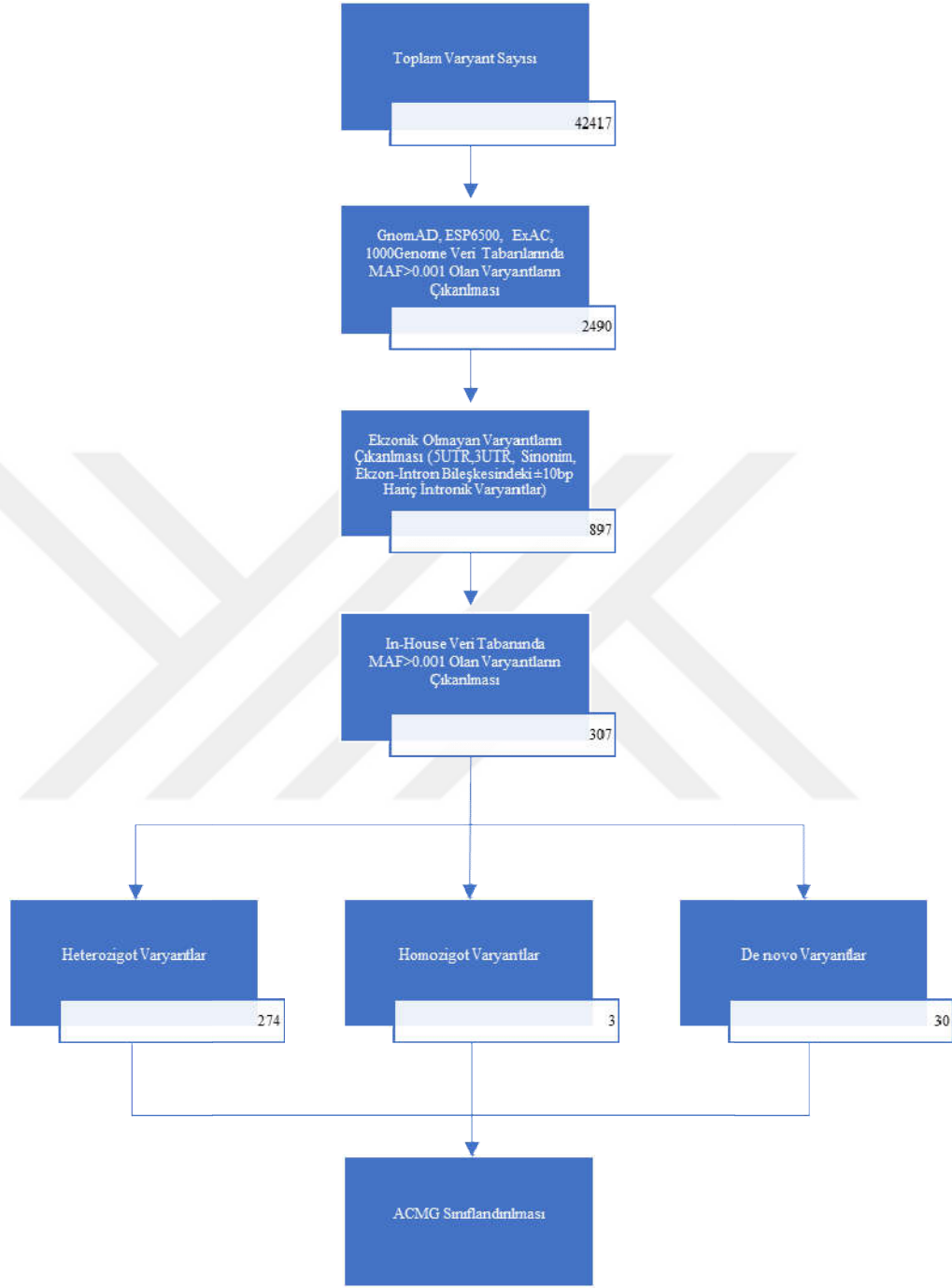
**Olgu IV**

**Şekil-4(devamı):** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji. Sağ alt kutucuklarda belirtilen olguda filtreleme sonrasında saptanan varyant sayıları belirtilmektedir.



**Olgu V**

**Şekil-4(devamı):** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji. Sağ alt kutucuklarda belirtilen olguda filtreleme sonrasında saptanan varyant sayıları belirtilmektedir.



**Olgu VI**

**Şekil-4(devamı):** Tüm ekzom dizileme verilerinde birinci basamak filtreleme sırasında izlenen strateji. Sağ alt kutucuklarda belirtilen olguda filtreleme sonrasında saptanan varyant sayıları belirtilmektedir.

| Gen  | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi        | Protein<br>Düzeyindeki<br>Değişim | Ekzon/<br>İntron | Zigosite | Parental<br>Kahtım | In Silico<br>Tahmin<br>Skoru<br>(REVEL) | In Silico<br>Tahmin<br>Skoru<br>(MetaLR) | rsID<br>Numarası | Minör Allel<br>Frekansı<br>(SEQ<br>Platformu) | Patojenik<br>Sınıflandırma* | Patojenisite<br>Kriterleri*          | Patojenik Prediksiyon /<br>Literatür Taraması |
|------|----------|-----------|----------------------------|-----------------------------------|------------------|----------|--------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| RTT1 | 1        | 155874285 | ENST00000368322.3:c.297T>G | F99L                              | Ekzon 5          | HET      | de novo            | 0.76                                    | 0.56                                     | rs730881014      | 0.0                                           | P                           | PS1, PM1, PM2,<br>PM5, PP2, PP3, PP5 | PMID: 27101134                                |

**Tablo-7:** Olgu 1'e ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: 'not applicable', PMID: 'PubMed Unique Identifier', HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen      | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi         | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/İntron | Zigosite | Parental Kalıtım | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri* | Patojenik Prediksyon / Literatür Taraması                                   |
|----------|----------|-----------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|----------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ADCY7    | 16       | 50342304  | ENST00000394697.2:c.1917C>G | C639W                       | Ekzon 16     | HET      | Maternal         | 0.64                           | 0.65                            | rs764479195   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | CALCRL, PTH1R ile etkileşim (STRING)                                        |
| ANKRD11  | 16       | 89335043  | ENST00000301030.4:c.7835A>C | E2612A                      | Ekzon 13     | HET      | de novo          | 0.45                           | 0.39                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | Literatür Taraması (PMID: 30712880)                                         |
| CANT1    | 17       | 76989864  | ENST00000302345.2:c.974C>G  | P325R                       | Ekzon 4      | HET      | Paternal         | 0.22                           | 0.48                            | rs766908791   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 21654728                                       |
| CDAN1    | 15       | 43016748  | ENST00000356231.3:c.3625C>A | Q1209K                      | Ekzon 28     | HET      | Maternal         | 0.23                           | 0.38                            | rs1595847078  | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 29668551, 31087399                             |
| COL2A1   | 12       | 48380926  | ENST00000380518.3:c.1300C>T | P434S                       | Ekzon 21     | HET      | Paternal         | 0.78                           | 0.93                            | rs140985224   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 17994563, 25823796, 26626311                   |
| COL19A1  | 6        | 70866089  | ENST00000322773.4:c.2150G>A | G717D                       | Ekzon 32     | HET      | Paternal         | 0.82                           | 0.96                            | rs201628097   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | COL1A1, COL1A2, COL2A1, CRTAP, LEPRE1 ile etkileşim (STRING)                |
| DAG1     | 3        | 49548179  | ENST00000545947.1:c.212C>A  | T71K                        | Ekzon 5      | HET      | Paternal         | 0.43                           | 0.79                            | rs142572135   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP1                 | ACTA1, CDC42, CHRNA1, FKTN, LAMB2, RAPSN, ile etkileşim (STRING)            |
| DNAI2    | 17       | 72295914  | ENST00000446837.2:c.782G>C  | S261T                       | Ekzon 6      | HET      | Maternal         | 0.72                           | 0.72                            | N/A           | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | DNAH9, DYNC1H1, DYNC2H1, WDR34, WDR60 ile etkileşim (STRING)                |
| FKTN     | 9        | 108337335 | ENST00000223528.2:c.22G>A   | V8M                         | Ekzon 2      | HET      | Paternal         | 0.57                           | 0.85                            | rs368981218   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 28749478                                       |
| GBP5     | 1        | 89734539  | ENST00000343435.5:c.191G>T  | G64V                        | Ekzon 4      | HET      | Maternal         | 0.78                           | 0.65                            | rs146345393   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | MID1 ile etkileşim (STRING)                                                 |
| IPP      | 1        | 46165667  | ENST00000396478.3:c.1726C>T | R576C                       | Ekzon 9      | HET      | Maternal         | 0.81                           | 0.67                            | rs779166797   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | MVK, TTN ile etkileşim (STRING)                                             |
| NBN      | 8        | 90993732  | ENST00000265433.3:c.191C>G  | P64R                        | Ekzon 3      | HET      | Maternal         | 0.75                           | 0.68                            | rs1563581492  | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | SMC1A, SMC3 ile etkileşim (STRING)                                          |
| POLR1B   | 2        | 113333172 | ENST00000541869.1:c.3388C>T | R1130C                      | Ekzon 16     | HET      | Paternal         | 0.69                           | 0.60                            | rs200995508   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | ACTB, EP300, MRPS16, PKLR, RARS2, RPL11, RPS15, TSR2 ile etkileşim (STRING) |
| SCN5A    | 3        | 38622726  | ENST00000413689.1:c.2924G>A | R975Q                       | Ekzon 17     | HET      | Maternal         | 0.51                           | 0.43                            | rs753149586   | 0.001                                | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 22064211, 15184283                             |
| SLC25A38 | 3        | 39433103  | ENST00000273158.4:c.448C>T  | R150C                       | Ekzon 4      | HET      | Paternal         | 0.79                           | 0.87                            | rs374902804   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | UROS ile etkileşim (STRING)                                                 |
| SYNGRI   | 22       | 39746049  | ENST00000328933.5:c.34G>A   | G12R                        | Ekzon 1      | HET      | Paternal         | 0.73                           | 0.68                            | rs548672289   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | GAA ile etkileşim (STRING)                                                  |

**Tablo-8:** Olgu II'ye ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: 'not applicable', PMID: 'PubMed Unique Identifier', HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen  | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi          | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/ İntron | Zigosite | Parental Kalıtım | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri* | Patojenik Prediksiyon / Literatür Taraması |
|------|----------|-----------|------------------------------|-----------------------------|---------------|----------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|
| TTN  | 2        | 179466031 | ENST00000589042.1:c.55693G>C | V18565L                     | Ekzon 287     | HET      | Maternal         | 0.11                           | 0.09                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | IOHF ile ilişkili gen: PMID: 29575618      |
| TTN  | 2        | 179428120 | ENST00000589042.1:c.82739C>T | T27580M                     | Ekzon 326     | HET      | Paternal         | 0.31                           | 0.32                            | rs748535477   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | IOHF ile ilişkili gen: PMID: 29575618      |
| VNNI | 6        | 133013396 | ENST00000367928.4:c.1154G>A  | G385E                       | Ekzon 5       | HET      | Paternal         | 0.88                           | 0.88                            | rs750072897   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | GAA ile etkileşim (STRING)                 |

**Tablo-8(devamı):** Olgu II'ye ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: ‘not applicable’, PMID: ‘PubMed Unique Identifier’, HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen      | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi         | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/ İntron | Zigosite | Parental Kahtım    | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri* | Patojenik Prediksiyon / Literatür Taraması                |
|----------|----------|-----------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|----------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------|
| CCR1     | 3        | 46245150  | ENST00000296140.3:c.655T>C  | Y219H                       | Ekzon 2       | HET      | Paternal           | 0.72                           | 0.54                            | rs200395804   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | STAT3 ile etkileşim (STRING)                              |
| DYNC2H1  | 11       | 102991693 | ENST00000398093.3:c.1288C>T | R430C                       | Ekzon 9       | HET      | Paternal/ Maternal | 0.53                           | 0.46                            | rs374073337   | 0.001                                | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF sebep olduğu bilinen gen<br>PMID: 31730820, 27925158 |
| LRP2     | 2        | 170137020 | ENST00000263816.3:c.1181C>G | A394G                       | Ekzon 11      | HET      | Paternal           | 0.41                           | 0.81                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | CBL, PTCH1 ile etkileşim (STRING)                         |
| MYH1     | 17       | 10415193  | ENST00000226207.5:c.1379T>C | I460T                       | Ekzon 14      | HET      | Paternal           | 0.88                           | 0.73                            | rs201061123   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | ACTA1, MYBPC3, MYH3, MYH7, TTN ile etkileşim (STRING)     |
| MYH3     | 17       | 10543314  | ENST00000583535.1:c.2681C>G | A894G                       | Ekzon 22      | HET      | Paternal           | 0.35                           | 0.49                            | rs976568229   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF ile ilişkili gen:<br>PMID: 33027564                  |
| PC       | 11       | 66618539  | ENST00000393960.1:c.2195G>A | R732Q                       | Ekzon 17      | HET      | Maternal           | 0.40                           | 0.79                            | rs773872994   | 0.0                                  | LB                       | PM1, PM2, PP2, BP4, BP6  | G6PD, GPI, PKLR ile etkileşim (STRING)                    |
| SH3RF1   | 4        | 170076723 | ENST00000284637.9:c.673G>A  | D225N                       | Ekzon 4       | HET      | Paternal           | 0.59                           | 0.53                            | rs13145975    | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | FBXW11, GLMN ile etkileşim (STRING)                       |
| SLC25A38 | 3        | 39437938  | ENST00000273158.4:c.842G>A  | R281H                       | Ekzon 7       | HET      | Maternal           | 0.84                           | 0.77                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | UROS ile etkileşim (STRING)                               |
| SMC5     | 9        | 72962911  | ENST00000361138.5:c.2846C>G | S949C                       | Ekzon 22      | HET      | Maternal           | 0.66                           | 0.69                            | rs780124157   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | NIPBL, RAD21, SMC1A, SMC3 ile etkileşim (STRING)          |
| SMARCC2  | 12       | 56559112  | ENST00000267064.4:c.3128del | P1043Lfs*18                 | Ekzon 26      | HET      | de novo            | N/A                            | N/A                             | rs752001894   | 0.001                                | LP                       | PVS1, PM2                | ACTB ile etkileşim (STRING)                               |
| UTP18    | 17       | 49354528  | ENST00000225298.7:c.875A>G  | Y292C                       | Ekzon 7       | HET      | Maternal           | 0.55                           | 0.86                            | rs779505055   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | MYBBP1A, RPS19 ile etkileşim (STRING)                     |
| VCAN     | 5        | 82834625  | ENST00000265077.3:c.5803A>G | S1935G                      | Ekzon 8       | HET      | Maternal           | 0.24                           | 0.68                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3, BP1            | LAMB2 ile etkileşim (STRING)                              |

**Tablo-9:** Olgu III’e ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: ‘not applicable’, PMID: ‘PubMed Unique Identifier’, HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen      | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi              | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/İntron | Zigosite | Parental Kahtım | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri* | Patojenik Prediksyon / Literatür Taraması                                        |
|----------|----------|-----------|----------------------------------|-----------------------------|--------------|----------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| CACNA2D2 | 3        | 50404876  | ENST00000479441.1:c.2371C>T      | R791C                       | Ekzon 28     | HET      | Paternal        | 0.75                           | 0.57                            | rs746371451   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3, BP1            | CACNA1C ile etkileşim (STRING)                                                   |
| CAPN3    | 15       | 42676712  | ENST00000397163.3:c.341A>C       | D114A                       | Ekzon 2      | HET      | Paternal        | 0.57                           | 0.90                            | rs376421197   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | TTN ile etkileşim (STRING)                                                       |
| CD36     | 7        | 80301354  | ENST00000435819.1:c.1123C>A      | P375T                       | Ekzon 14     | HET      | Paternal        | 0.90                           | 0.71                            | rs564971571   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | CYBB, EP300, MED12, MED13L ile etkileşim (STRING)                                |
| COL5A2   | 2        | 189912958 | ENST00000374866.3:c.3178C>T      | R1060W                      | Ekzon 45     | HET      | Paternal        | 0.69                           | 0.84                            | rs374549843   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | ADAMTS3, COL1A1, COL1A2, COL2A1, CRTAP, ITGB3, LEPRE1 ile etkileşim (STRING)     |
| CP       | 3        | 148896378 | ENST00000264613.6:c.2702G>A      | R901Q                       | Ekzon 16     | HET      | Maternal        | 0.57                           | 0.91                            | rs199923182   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | LAMB2 ile etkileşim (STRING)                                                     |
| DYNC2H1  | 11       | 102991266 | ENST00000398093.3:c.1090C>T      | P364S                       | Ekzon 7      | HET      | Maternal        | 0.29                           | 0.32                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF sebep olduğu bilinen gen<br>PMID: 31730820, 27925158                        |
| GLMN     | 1        | 92763018  | ENST00000370360.3:c.108C>A       | C36*                        | Ekzon 3      | HET      | Paternal        | N/A                            | N/A                             | rs770780171   | 0.0                                  | P                        | PVS1, PM2, PP5           | İOHF sebep olduğu bilinen gen<br>PMID: 21133993, 23801931                        |
| H6PD     | 1        | 9305309   | ENST00000377403.2:c.316A>G       | S106G                       | Ekzon 2      | HET      | Paternal        | 0.69                           | 0.92                            | rs148725451   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | G6PD, GBE1, GPI, HK1, PKLR, TALDO1 ile etkileşim (STRING)                        |
| IFT140   | 16       | 1575998   | ENST00000426508.2:c.2658G>T      | Q886H                       | Ekzon 21     | HET      | Paternal        | 0.22                           | 0.24                            | rs948364759   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | Fenotipik serilerde hidrops ile ilişki veya hidrops klinik tanısı bildirilen gen |
| KLF15    | 3        | 126062575 | ENST00000296233.3:c.1237_1245dup | R413_V415dup                | Ekzon 3      | HET      | de novo         | N/A                            | N/A                             | rs771956110   | 0.0                                  | LP                       | PM2, PM4, PM6            | CLCNKA, CLCNKB ile etkileşim (STRING)                                            |
| MYO9B    | 19       | 17308635  | ENST00000595618.1:c.4081T>C      | S1361P                      | Ekzon 23     | HET      | Paternal        | 0.30                           | 0.56                            | rs372830105   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | CDC42 ile etkileşim (STRING)                                                     |
| NEK8     | 17       | 27065207  | ENST00000268766.6:c.1166C>T      | S389L                       | Ekzon 8      | HET      | Paternal        | 0.57                           | 0.56                            | rs199853008   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | CEP290, INVS ile etkileşim (STRING)                                              |
| PIGN     | 18       | 59752455  | ENST00000357637.5:c.2413G>A      | A805T                       | Ekzon 26     | HET      | Paternal        | 0.50                           | 0.53                            | rs771022458   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | İOHF sebep olduğu bilinen gen<br>PMID: 30293990                                  |

**Tablo-10:** Olgu IV’e ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: ‘not applicable’, PMID: ‘PubMed Unique Identifier’, HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen    | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi          | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/ İntron | Zigosite | Parental Kalıtım | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri* | Patojenik Prediksiyon / Literatür Taraması                                                                                                   |
|--------|----------|-----------|------------------------------|-----------------------------|---------------|----------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TP53   | 17       | 7577070   | ENST00000269305.4:c.868C>T   | R290C                       | Ekzon 8       | HET      | Maternal         | 0.70                           | 0.98                            | rs770374782   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | ACTB, DHCR24, EP300, G6PD, HRAS, KDM6A, KRAS, NRAS, PIK3CA, PRKAG2, RPL11, RPL26, RPL5, STAT3, SUZ12, TSC2, WT1, ZEB2 ile etkileşim (STRING) |
| RASAL3 | 19       | 15565594  | ENST00000343625.7:c.1832G>A  | R611Q                       | Ekzon 12      | HET      | Maternal         | 0.89                           | 0.86                            | rs375317705   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | KRAS, NRAS, HRAS, RASA1 ile etkileşim (STRING)                                                                                               |
| SCP2   | 1        | 53444040  | ENST00000371514.3:c.825+1G>T | N/A                         | Intron 9      | HET      | Maternal         | N/A                            | N/A                             | rs144132787   | 0.0                                  | LP                       | PVS1, PM2                | PEX2, PEX5, PEX10, PEX12, PEX13, PEX14 ile etkileşim (STRING)                                                                                |
| SETD1B | 12       | 122248296 | ENST00000267197.5:c.1445C>T  | T482M                       | Ekzon 5       | HET      | Paternal         | 0.42                           | 0.86                            | rs902853054   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | EP300, GATA1, KDM6A, KMT2D ile etkileşim (STRING)                                                                                            |
| SOX7   | 8        | 10584093  | ENST00000304501.1:c.322G>T   | D108Y                       | Ekzon 2       | HET      | Paternal         | 0.86                           | 0.96                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | GATA4 ile etkileşim (STRING)                                                                                                                 |
| STAT3  | 17       | 40490806  | ENST00000264657.5:c.493G>A   | V165I                       | Ekzon 6       | HET      | Maternal         | 0.08                           | 0.08                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP2, BP4            | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 33027564                                                                                                        |
| TYROBP | 19       | 36398437  | ENST00000262629.4:c.140T>C   | V47A                        | Ekzon 3       | HET      | Paternal         | 0.54                           | 0.72                            | rs372140827   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | PIK3CA, SOS1 ile etkileşim (STRING)                                                                                                          |

**Tablo-10(devamı):** Olgu IV’e ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: ‘not applicable’, PMID: ‘PubMed Unique Identifier’, HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen      | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi              | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/İntron | Zigosite | Parental Kalıtım | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri* | Patojenik Prediksiyon / Literatür Taraması                                          |
|----------|----------|-----------|----------------------------------|-----------------------------|--------------|----------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| ABCA13   | 7        | 48391986  | ENST00000435803.1:c.10590G>A     | M3530I                      | Ekzon 31     | HET      | Paternal         | 0.62                           | 0.88                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | GAA ile etkileşim (STRING)                                                          |
| ADAMTS14 | 10       | 72498692  | ENST00000373208.1:c.1703C>T      | S568L                       | Ekzon 11     | HET      | Maternal         | 0.77                           | 0.67                            | rs1203416117  | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | ADAMTS3, COL1A1, COL1A2, COL2A1, SGPL1, THSD1 ile etkileşim (STRING)                |
| ALDH6A1  | 14       | 74538616  | ENST00000553458.1:c.410A>C       | D137A                       | Ekzon 5      | HET      | Maternal         | 0.95                           | 0.89                            | rs761301246   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | HADHB ile etkileşim (STRING)                                                        |
| ALPK3    | 15       | 85401553  | ENST00000258888.5:c.4190G>A      | G1397E                      | Ekzon 6      | HET      | Maternal         | 0.27                           | 0.17                            | rs754782459   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, BP4                 | İOHF sebep olduğu bilinen gen<br>PMID: 26846950, 32480058                           |
| BBS9     | 7        | 33423343  | ENST00000242067.6:c.1855C>T      | R619C                       | Ekzon 18     | HET      | Paternal         | 0.45                           | 0.52                            | rs543113169   | 0.0                                  | VUS                      | PM2                      | MKKS, WDR19, IFT80 ile etkileşim (STRING)                                           |
| BCS1L    | 2        | 219526006 | ENST00000431802.1:c.296C>T       | P99L                        | Ekzon 2      | HET      | Maternal         | 0.96                           | 0.99                            | rs121908572   | 0.0                                  | P                        | PP5, PM2, PP2, PP3       | HSPD1, TAZ ile etkileşim (STRING), ClinVar P(2*), Literatür Taraması: PMID:24655110 |
| BLK      | 8        | 11420518  | ENST00000259089.4:c.1211C>G      | P404R                       | Ekzon 12     | HET      | Maternal         | 0.66                           | 0.53                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | CBL, IKZF1, RASA1, STAT3 ile etkileşim (STRING)                                     |
| CHD8     | 14       | 21862345  | ENST00000399982.2:c.5609A>C      | D1870A                      | Ekzon 31     | HET      | de novo          | 0.70                           | 0.76                            | rs1594331542  | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | EP300, GRIN2B ile etkileşim (STRING)                                                |
| COL4A2   | 13       | 111158800 | ENST00000360467.5:c.4441A>G      | M1481V                      | Ekzon 46     | HET      | Maternal         | 0.61                           | 0.74                            | rs763183089   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | COL1A1, COL1A2, COL2A1, CRTAP, ENPP1, LEPRE1, ITGB3 ile etkileşim (STRING)          |
| LPA      | 6        | 161007630 | ENST00000447678.1:c.3980A>T      | D1327V                      | Ekzon 26     | HET      | Maternal         | 0.57                           | 0.59                            | rs367705059   | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | PEX3 ile etkileşim (STRING)                                                         |
| NDUFS1   | 2        | 207017154 | ENST00000455934.2:c.184A>C       | T62P                        | Ekzon 3      | HET      | de novo          | 0.92                           | 0.88                            | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PP3                 | ACAD9, NDUFB10 ile etkileşim (STRING)                                               |
| OFD1     | X        | 13779294  | ENST00000340096.6:c.2358_2372del | V787_P791del                | Ekzon 17     | HEMI     | Maternal         | N/A                            | N/A                             | N/A           | 0.0                                  | VUS                      | PM2, PM4                 | İOHF ile ilişkili gen: PMID: 25238977                                               |
| OPRM1    | 6        | 154411173 | ENST00000434900.2:c.782A>G       | Y261C                       | Ekzon 4      | HET      | Paternal         | 0.95                           | 0.80                            | rs199749405   | 0.001                                | VUS                      | PM2, PP3                 | STAT3 ile etkileşim (STRING)                                                        |
| RET      | 10       | 43615578  | ENST00000355710.3:c.2657G>A      | R886Q                       | Ekzon 15     | HET      | Paternal         | 0.67                           | 0.72                            | rs373594744   | 0.001                                | LP                       | PM1, PM2, PP2, PP3       | HRAS, KRAS, NRAS, PIK3CA, PTCH1, PTPN11, RASA1, SOS1, STAT3 ile etkileşim (STRING)  |

**Tablo-11:** Olgu V'e ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: 'not applicable', PMID: 'PubMed Unique Identifier', HET: Heterozigot, HEMI: Hemizigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

|               |    |           |                                    |            |          |     |                |      |      |              |       |     |                  |                                                             |
|---------------|----|-----------|------------------------------------|------------|----------|-----|----------------|------|------|--------------|-------|-----|------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>SOCS1</b>  | 16 | 11349196  | ENST00000332029.2:<br>c.134_139dup | V45_P46dup | Ekzon 15 | HET | <i>de novo</i> | N/A  | N/A  | rs587778690  | 0.001 | LP  | PM2, PM4,<br>PM6 | CBL, FBXW11, GLMN,<br>HRAS, STAT3 ile<br>etkileşim (STRING) |
| <b>TCF7L2</b> | 10 | 114799860 | ENST00000543371.1: c.527G>A        | R176Q      | Ekzon 5  | HET | Maternal       | 0.71 | 0.96 | rs1023635345 | 0.0   | VUS | PM2, PP3         | EP300, KCNQ1,<br>KMT2D ile etkileşim<br>(STRING)            |
| <b>TCOF1</b>  | 5  | 149758940 | ENST00000504761.2:c.2627A>G        | D876G      | Ekzon 16 | HET | Paternal       | 0.50 | 0.56 | N/A          | 0.001 | VUS | PM2, PP3         | OFD1 ile etkileşim<br>(STRING)                              |

**Tablo-11(devamı):** Olgu V’e ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: ‘not applicable’, PMID: ‘PubMed Unique Identifier’, HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: ‘likely’ patojenik, VUS: ‘variant of uncertain significance’. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

| Gen  | Kromozom | Pozisyon  | HGVS İsimlendirmesi        | Protein Düzeyindeki Değişim | Ekzon/ İntron | Zigosite | Parental Kalıtım | In Silico Tahmin Skoru (REVEL) | In Silico Tahmin Skoru (MetaLR) | rsID Numarası | Minör Allel Frekansı (SEQ Platformu) | Patojenik Sınıflandırma* | Patojenisite Kriterleri*          | Patojenik Prediksiyon / Literatür Taraması |
|------|----------|-----------|----------------------------|-----------------------------|---------------|----------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| RIT1 | 1        | 155874261 | ENST00000368322.3:c.321G>C | M107I                       | Ekzon 5       | HET      | de novo          | 0.83                           | 0.32                            | rs483352822   | 0.0                                  | P                        | PS1, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5 | PMID:25959749                              |

**Tablo-12:** Olgu VI'ya ait İOHF ilişkili varyantlar. N/A: 'not applicable', PMID: 'PubMed Unique Identifier', HET: Heterozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'. \* Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (188).

## 5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında gebelik takiplerinde sık karşılaşılan ve önemli bir yer tutan, immün olmayan hidrops fetalis etiyolojisinde yer alan tek gen hastalıklarını açıklamak için *trio* ekzom dizileme yöntemi çalışılmıştır. Bu amaçla Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine başvuran kötü prognozlu altı fetal olgu, maternal ve paternal örneklerin dahil edilmesiyle elde edilen toplam 18 tüm ekzom dizileme verisi incelenmiştir.

Araştırmada yapılan *trio* tüm ekzom dizileme sonucunda iki olguda tanısal genetik varyant saptanmış, iki olguda ise klinik ile ilişkili potansiyel tanısal genetik varyant tespit edilmiştir. Olgularda gözlemlenen tanısal varyantların tamamı *de novo* olup, otozomal dominant genetik hastalıklara sebep olmaktadır. Bu durum, İOHF olgularında yapılan diğer araştırmalar ile uyum göstermektedir (19, 201). Olgularda tespit edilen varyantların *de novo* olması ve otozomal dominant kalıtım göstermesi tüm ekzom dizilemenin *trio* olarak planlanmasının önemini göstermektedir.

Kısıtlı örnek sayısı ile yapılan bu çalışmada, prenatal yapısal anomali seçimi yapılmaksızın yapılan tüm ekzom çalışmalarında saptanan %8,5-10 tanı oranı aralığından daha yüksek bir tanı oranı tespit edilmiştir (99, 100). Bu durumun, tek gen hastalıklarının immün olmayan hidrops fetalis etiyolojisindeki yükünü yansıtması muhtemeldir. Sparks *ve ark.* tarafından 2020 yılında yayınlanan “Exome Sequencing for Prenatal Diagnosis in Nonimmune Hydrops Fetalis” isimli çalışmada, 127 fetal örnek çalışmaya dahil edilmiş ve fetüslerin %29’unda etiyolojiyi açıklayabilecek bir genetik varyant tespit edilmiştir. Ayrıca bu tanısal orana ek olarak olguların %9’unda klinik olarak anlamlı olabilecek varyantlar saptanmıştır (19). Daha fazla örnek ile yapılan bu çalışmadaki tanı oranları çalışmamız ile uyumlu görünmektedir ve tanısal oran farklılıklarının İOHF hastalığında tek gen hastalıklarının yükü nedeniyle ortaya çıktığı fikrini desteklemektedir.

Araştırmamızda sadece kötü prognozlu fetal olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Bu durum olgularda tespit edilen klinik olarak anlamlı varyantların ve önerilen aday

varyantların kötü prognoz ile ilişkili olma ihtimalini arttırmaktadır. Yapılan literatür taramasında, kötü prognozlu fetal örneklerde yapılan benzer bir araştırmanın olmadığı gözlemlenmiştir. Özellikle erken gebelik haftalarında İOHF olgularında kötü prognozlu varyantların tespit edilebilmesi, gebelik takiplerinde klinik kararı değiştirebilme olanağına sahip olabilmektedir. Bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. İmmün olmayan hidrops fetalis etiyolojisi hakkındaki bilgilerin artması ile bu olgularda tanı, tedavi, izlem ve önlem için yeni algoritmaların geliştirilmesi muhtemeldir.

Yapılan çalışma sonucunda tanısız patojen ve etiyolojiyi açıklayabilecek varyantlar dışında, 66 aday varyant tespit edilmiştir. Bu varyantlar ilişkili tablolarda belirtilmiştir. Olgularda saptanan tanısız varyantlar ve önceliklendirilen varyantlar aşağıda tartışılmıştır.

Olgu I'de *RIT1* geninin 5. ekzonunda c.297T>G değişimi, olgu VI'da *RIT1* geninin 5. ekzonunda c.321G>C değişimi tespit edilmiştir. Bu gen OMIM veri bankasında “Noonan Syndrome 8” fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Noonan Sendromu otozomal dominant kalıtım gösteren, kısa boy, dismorfik yüz özellikleri ve konjenital kalp hastalıkları ile karakterize genetik bir hastalıktır (195, 196). Prenatal dönemde yapılan çalışmalarda, Noonan Sendromunun immün olmayan hidrops fetalis fenotipik bulgularına sebep olabileceği ve bu sendromun saptandığı gebeliklerin kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir. *RIT1* geni GTPaz ailesinin RAS alt ailesinden GTP bağlayan Rit1 proteinini kodlamaktadır. RAS protein ailesi klasik RAS proteinleri (HRAS, KRAS ve NRAS), RRAS, RRAS2 (TC21), RRAS3 (MRAS), RAP proteinleri, RAEB, RAL proteinleri, RIT1 ve RIT2 (RIN) proteinlerinden oluşmaktadır (197). RAS protein ailesi fonksiyonları arasında RAS/MAPK sinyal yolağının aktivasyonu bulunmaktadır. RAS/MAPK aktivasyonu, hücre çoğalması ve diferansiasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yapısal açıdan incelendiğinde, *RIT1* geni 6 ekzondan oluşmaktadır ve 1q22 kromozom bölgesinde bulunmaktadır. Genin kendisi *RAS* geni ile %50 sekans homolojisi göstermektedir. Rit1 proteini Ras proteininden farklı olarak, N-terminal uzantısı ve post-translasyonel modifikasyon için spesifik bir motif olan C-terminal CAXX motifi içermektedir (198, 199).

*RIT1* geninin kodladığı protein; NGF'nin aktifleştirdiği EPHB2 ve MAPK14 sinyal yollarında rol oynamaktadır (199, 200). Doku ekspresyonları incelendiğinde *RIT1* geninin embriyonik ve erişkin insan dokularında yüksek derecede eksprese olduğu görülmektedir. Bu sebeple, *RIT1* geninin gelişimdeki rolü henüz net olmamakla birlikte, Noonan Sendromu ile ilişkili diğer RASopati genlerinde de gözlemlendiği gibi, *RIT1* genindeki fonksiyon kazanımına neden olan değişimlerin, sinyal yollarında aktivite artışına neden olarak patofizyolojide rol oynadığı düşünülmektedir.

Olgu I ve olgu VI'da tespit edilen varyantlar RIT1 proteininin 17 aminoasit uzunluğundaki "hot-spot" bölgesinde yer almaktadır. Bu bölge, proteinde evrimsel olarak korunan "switch II" bölgesini kodlamaktadır (211). Her iki varyant da literatürde daha önce patojenik olarak bildirilmiş ve ACMG kriterlerince de patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Bu sebeple olgu I ve olgu VI'da gözlemlenen fenotipik özelliklerin ilgili genomik değişim ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Tespit edilen iki varyantın kötü prognostik fetüslerde saptanması, değişimlerin diğer varyantlara göre daha kötü prognostik özelliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir. Durumun açıklanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

İkinci olgu incelendiğinde klinik ile ilişkili olabileceği düşünülen *COL2A1* geninde missense mutasyon tespit edilmiştir. *COL2A1* geni tip 2 kolajen alfa 1 zincirini kodlayan 54 ekzonlu bir gendir. Kodladığı protein kıkırdak dokuya spesifiklik göstermekte ve özellikle uzun kemiklerin gelişiminde rol oynamaktadır (202). Bu gen OMİM veri tabanında otozomal dominant Kniest Displazisi, Spondiloepimetafizyel Displazi, tip 2 Akondrojenesis, platispondilitik letal iskelet displazi hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca *COL2A1* geninin fetal hidrops fenotipine neden olduğuna dair literatürde yayınlar da bulunmaktadır ve genin kendisi hidrops fetalise sebep olan genler arasında kabul edilmektedir. Barat-Houari ve ark. tarafından yapılan araştırmada iskelet displazisi fenotipine sahip bireylerde *COL2A1* gen varyant spektrumunun genişletilmesi amaçlanmış ve toplam 136 hastada *COL2A1* geni dizilenmiştir (194). Bu çalışmada, Kniest İskelet Displazisi fenotipi gösteren bir olguda c.1300C>T missense varyantı tespit edilmiştir. İlgili varyant, konservatif bölgede yer alan prolin amino asitini serin

amino asitine çevirmektedir. Kolajen proteininde heliks termostabilitesi Gly-X-Y düzenindeki Y pozisyonunda bulunan proline amino asiti ile sağlanmaktadır. Non-polar bir amino asit olan prolinin yapısal olarak farklı ve polar bir aminoasit olan serine dönüşümü ile protein yapısında değişime neden olarak patojenik etki göstermesi muhtemeldir. Bu sebeple değişim ile ilgili tespit edilen REVEL ve MetaLR skorlarının da patojen yönünde olduğu görülmektedir. Fenotipik açıdan değerlendirildiğinde olgu II'de tespit edilen uzun kemiklerde kısalık bulgusunun da hastalık ile uyumlu olduğu gözlemlenmektedir. Fakat Barat-Houari *ve ark.* yaptığı çalışmada, değişimin sağlıklı babadan kalıtıldığını ve patojenisitesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir. Yaptığımız çalışmada da tespit ettiğimiz aynı değişim benzer şekilde paternal kalıtılmıştır ve baba adayı sağlıklıdır.

Prenatal çalışmalar *COL2A1* mutasyonları açısından incelendiğinde, mutasyona sahip fetüslerin akondrogezis kliniği gösterdiği bildirilmiştir. Bu olgularda prenatal ultrasonografide uzun kemiklerde kısalık, uzun kemiklerde *bowing*, polihidramnios ve plasental anomaliler tespit edilmektedir. Olgu II'de bulunan diğer yapısal anomalilerin (korpus kallosum agenezisi, dilate lateral ventrikül), prenatal tespit edilen *COL2A1* patojen varyantlarına yönelik yapılan literatür taramasında olmadığı görülmüştür. Bu sebeple olgudaki bu değişim, klinik ile ilişkili potansiyel tanısal genetik varyant olarak kabul edilmiştir.

Olgu II'de ayrıca *COL19A1* geninin 32. ekzonunda saptanan missense değişimin MetaLR ve REVEL skorları, bulunan değişimler içerisinde en yüksek olduğu için dikkat çekmektedir. Genin kodladığı Kolajen XIX proteininin, kolajen fibrillerine bağlanmayıp spesifik dokularda ekstrasellüler matrikste biriktiği gösterilmiştir (203). Bu birikimlerin hücre matriks ve hücre hücre etkileşimlerinde rol aldığı düşünülmektedir (204). Bu sebeple, Kolajen XIX proteinin yer aldığı fizyolojik yollardaki işlev kayıplarının gelişim bozukluklarında rol oynaması muhtemel gözükmemektedir. Kolajen XIX'un fonksiyonel zenginleştirme analizinde, İOHF'e neden olan genlerden *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *CRTAP*, *LEPRE1* proteinleri ile güçlü ilişkisinin bulunması, tespit edilen varyantın İOHF fenotipinden sorumlu varyant olma olasılığını arttırmaktadır.

Olgu II’de yapılan analizlerde ek olarak *ANKRD11* geninde c.7835A>C *de novo* varyantı tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında, ense kalınlığı artışı bulgusuna sahip bir fetüste, *ANKRD11* geninde çerçeve kaymasına neden olan *de novo* c.2404dupC varyantı saptandığı görülmüştür. İlgili çalışmada, genin postnatal fenotipte neden olduğu kardiyak anomalilerin patofizyolojik açıdan hidrops ile bağlantı gösterdikleri belirtilmiş ve bu sebeple varyantın tanı koydurucu olduğu düşünülmüştür (102). Lord ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise, *ANKRD1* geninde çerçeve kaymasına neden olan *de novo* varyantı tespit edilmiş ve olgudaki atriyoventriküler kanal defekti ile ilişkilendirilerek patojen kabul edilmiştir (99). *ANKRD1* geni postnatal dönemde Coffin Siris Sendromu benzeri KBG Sendromuna neden olmaktadır. Zekâ geriliği, makrodonti, fasyal dismorfizm, iskelet anomalileri, kısa boy, işitme kaybı ve damak anomalileri hastalığın belirgin özellikleridir. Varyantın tespit edildiği olgu II bu anomaliler açısından değerlendirildiğinde, fenotip ile ilişkisi zayıf bulunmuştur. Bu değişimin REVEL ve MetaLR skorlarının da düşük olması, varyantın etiyolojik açıdan güçlü bir varyant olarak görülmemesine sebep olmuştur. Fakat prenatal fenotipin net olarak bilinmemesi prenatal tüm ekzom dizileme araştırmalarındaki önemli limitasyonlardan biridir. Bu nedenle, gendeki değişim aday varyant olarak şüphesini korunmaktadır.

Olgu III incelendiğinde *SMARCC2* geninde tespit edilen *de novo*, çerçeve kaymasına sebep olan c.3128del varyantı dikkat çekmektedir. *SMARCC2* geni, otozomal dominant kalıtım gösteren Coffin Siris Sendromuna neden olmaktadır. Coffin Siris Sendromu santral sinir sistemi anomalileri, aortik ark hipoplazisi, ventriküler septal defekt, 5.parmak anomalileri, yarı damak, hidrocefali, korpus kallozum agenezisi, diyafram hernisi bulguları ile ilişkilendirilmiştir (205). Kardiyak malformasyonların sebep olabileceği hemodinamik instabilite ve kardiyak disfonksiyonun hidrops fetalis patofizyolojisinde majör rol oynaması sebebiyle, olgudaki bu değişim tanısız genetik varyant olarak değerlendirilmiştir. *SMARCC2* geni, kromatin yeniden düzenleme kompleksi olan “SWItch/Sucrose NonFermentable-related chromatin regulator” proteinini kodlamaktadır. Fetal kromatin, embriyonik gelişim sırasında aktif olarak yeniden düzenlenmektedir. Ek olarak, embriyonik gelişim sırasında, belirli genlerin

transkripsiyonel aktivasyondan önce yeniden düzenlenme işleminden geçtiği bilinmektedir. Yeniden düzenlenme işleminden sorumlu protein kompleksini kodlayan birçok gendeki genetik varyantların, gelişim bozukluklarına yol açtığı bildirilmiştir (206, 207). SMARCC2 proteininin, STRING fonksiyonel protein assosiasyon ağında yapılan analizlerinde, İOHF'a neden olan ACTB geni ile anlamlı ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Varyantın *de novo* olması, ACMG kriterlerince muhtemel patojen kabul edilmesi ve çerçeve kaymasına sebep olarak güdük ('truncated') proteine sebep olması patojenik olduğunu düşündürmektedir.

Olgu III'te ayrıca *SLC25A38* genine ait varyantın en yüksek MetaLR skoruna sahip olduğu görülmektedir. *SLC25A38* geni, özellikle kemik iliğinde eritroid seri tarafından eksprese edilen, mitokondriyal taşıyıcı ailesine ait *SLC25A38* proteinini kodlamaktadır. Gendeki patojenik değişimler sendromik olmayan konjenital sideroblastik anemi ile ilişkilendirilmiştir. Mutasyonların neden olduğu klinik X'e bağlı sideroblastik anemi fenotipine benzemektedir ve benzer şekilde pridoksin tedavisine yanıt vermemektedir (208). Yapılan literatür taramasında genin İOHF ile ilişkisini bildirilen bir yayın görülmemiştir fakat gendeki patojenik değişimlerin neden olduğu anemi kliniğinin konjenital gözlemlenmesi ve İOHF patofizyolojisinde aneminin bilinen bir patofizyolojik sebep olması, bu varyantın ileri araştırmalar için uygun aday olduğunu düşündürmektedir.

Olgu IV incelendiğinde *SOX7* geninde tespit edilen değişim, en yüksek MetaLR ve REVEL skorlarına sahip olduğu için dikkat çekmektedir. Genin kodladığı transkripsiyon faktörü SOX transkripsiyon ailesine dahildir ve embriyonel gelişim ile hücre farklılaşmasında rol almaktadır (209). Yapılan literatür taramasında genin herhangi bir kalıtsal hastalık ile ilişkisi görülmemiştir fakat araştırmada kullanılan örnekleme kötü prognozlu fetüslerin bulunması, tespit edilen varyantın hidrops ile ilişkisi olabileceğini düşündürmüştür. Ek olarak *KLF15* genindeki varyant hem *de novo* olması hem de ACMG kriterleri ile değerlendirildiğinde muhtemel patojen klasifikasyona sahip olması açısından öne çıkmaktadır. Fakat *KLF15* geni ile ilişkili yapılan literatür taramasında İOHF ile ilişki herhangi bir patofizyolojik özellik

görülmemiştir. Tespit edilen bu iki varyantın literatür incelemesinde immün olmayan hidrops fetalise neden olduğuna yönelik bildirimi bulunmamaktadır fakat yapılan analiz sonucunda, etiyolojide rol oynayan genler ile anlamlı ilişki içerisinde oldukları görülmüştür (Tablo-10). Yapılacak ileri incelemeler ile, bu genlerin etiyolojideki rolünün aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Olgu V’de en yüksek REVEL ve MetaLR skorunun *BCSIL* geninde tespit edilen değişimde olduğu görülmektedir. Bu gen mitokondrial kompleks III’ün oluşumunda rol oynayan “ATPases Associated with diverse cellular Activities” (AAA) ailesinden bir ATPaz kodlamaktadır (212). Gendeki mutasyonların otozomal resesif Bjornstad Sendromu ve GRACILE Sendromuna sebep olduğu bilinmektedir. *BCSIL* geninin literatürde İOHF olguları ile bildirilen ilişkisi bulunmamaktadır. Fakat gendeki bu değişimin literatürde daha önce patojen olarak bildirilmiş olması ve ACMG kriterlerince patojenik tespiti, varyantın güçlü bir aday varyant olarak düşünülmesini sağlamaktadır. Güncel bilgilerimiz ışığında, literatürde bildirilen *BCSIL* gen delesyon/duplikasyonları bulunmamaktadır. Olguda, karşı allelde tüm ekzom dizileme ile tespiti mümkün olmayan genomik değişimlerden birinin varlığının ileri testlerle araştırılması ile bu değişimin klinik önemi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak muhtemeldir.

Olgu V’te tespit edilen diğer bir değişim ise *SOCS1* geninde tespit edilen *de novo* c.134\_139dup değişimidir. Bu varyant, ACMG kriterleri ile değerlendirildiğinde muhtemel patojen olması ve İOHF etiyolojisinde rol alan diğer genler ile protein etkileşiminde bulunması sebebiyle dikkat çekmektedir. Varyant ile ilgili yapılan literatür çalışmasında genin otoinflamatuvar sendromlar ile ilişkilendirildiği gözlemlenmiştir. *SOCS1* geni, genellikle sitokinler tarafından aktive edilen JAK/STAT yolağını inhibe eden SOCS1 proteinini kodlamaktadır. SOCS protein ailesi ubiquitin ligaz olarak rol alarak, sinyal yolağına ait proteinleri ubiquitin-proteozom yolağında yıkımı için işaretlemektedir. SOCS1 proteini farklı olarak JAK/STAT sinyal yolağını doğrudan inhibe etmektedir (213). Proteinin İOHF’e neden olduğu bilinen CBL, FBXW11, GLMN, HRAS, STAT3 proteinleri ile anlamlı etkileşimi, bu varyantı aday gen olarak

düşündürmektedir. Varyant ve gene yönelik yapılan ileri çalışmalar ile duruma açıklık getirmek mümkün olabilecektir.

Yapılan araştırmada *de novo* varyantların, İOHF olgularında tanısal olarak sıklıkla gözlemlenmesi ve ACMG kriterlerinde bir varyantın *de novo* olması klinik ile ilişkilendiriliyor ise güçlü patojenisite göstergesi olarak kabul edilmesi nedeniyle, analizlerde ayrıca tekrar değerlendirilmiştir (188, 201). Her insanda ortalama 70 adet *de novo* varyant bulunduğu tahmin edilmektedir (214). Bu nedenle bir varyantın *de novo* olması tek başına patojenik olarak sınıflandırılması için yeterli kalmamaktadır. Olgularda yapılan *de novo* varyantlar incelemesinde, her olgu için en az bir *de novo* varyant tespit edilmiştir. Bulunan *de novo* varyantlar ACMG kriterleri, in-silico prediksyon programlarında alınan skorlar ve STRING programında bilinen gen ve yollar ile ilişkilendirilmiş, anlamlı varyantlar olguların aday gen tablolarında önerilmiştir.

Araştırmamızda tanısal varyantların tespit edilemediği olgularda *de novo* varyant analizlerine ek olarak, olgular arasında ortak genetik etiyolojinin varlığını değerlendirmek amacıyla, saptanan ortak aday varyantlar ve aday varyantların bulunduğu ortak genler değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sırasında olgu III ve olgu IV'te immün olmayan hidrops fetalise sebep olan *DYNC2H1* geninde farklı varyantlar ve olgu II ve olgu III'te *SLC25A38* geninde farklı varyantlar dikkat çekmektedir. Tespit edilen genlerden *DYNC2H1* için yapılan literatür incelemesinde geninin İOHF olgularında bildirildiği görülmüştür. Fakat olgular incelendiğinde ortak aday genetik varyant gözlemlenmemiştir. İmmün olmayan hidrops fetalise etiyolojisinde rol oynayan gen sayısının fazla olması olgular arasında aday varyantların bulunduğu ortak gen tespitini açıklıyor olabilir.

Yapılan araştırmada, çalışılan tekniğin doğasından kaynaklanan limitasyonlar bulunmaktadır. Olguların prenatal fenotipinin değerlendirilmesinde kullanılan prenatal ultrasonografinin fetal fenotipik görüntüleme sınırlılığı, tüm ekzom dizileme analizi sırasında tespit edilen varyantlarda fenotip-genotip ilişkisinin kurulmasını zorlaştırmaktadır. Varyantların patojenisite klasifikasyonunda fenotip-genotip

korelasyonu ciddi önem arz etmektedir. Bu sebeple, hastalığa neden olan tanısal varyantların klinik ile korelasyonunun kurulamamasına bağlı, analizlerde gerekli değerlendirmelerin ve varyant önceliklendirmelerinin yapılamamış olması muhtemeldir. Ayrıca Tüm ekzom dizileme ile genomik yapısal değişimlerin, genomdaki kopya sayısı değişimlerinin, delesyon/duplikasyonların ve ekzon-intron bileşkesinde 10 bç dışındaki intronik değişimlerin tespiti mümkün olmamaktadır. İmmün olmayan hidrops fetalis olgularına neden olabilen bu tür genomik değişimlerin yapılan araştırmada tespiti mümkün değildir. Bu genomik değişimlerin farklı genetik testler ile araştırılması mümkündür ve ileride yapılacak çalışmalar ile literatüre kazandırılması durumunda, İOHF etiyolojisinin açıklanması için önemli bir adımı oluşturacaktır. Tüm ekzom dizilemenin bahsedilen değişimleri tespit edememesi haricinde tüm ekzom bölgelerinin eşit şekilde okunmaması, olgular ve çalışmalar arasında okuma farklarının bulunması da çalışmanın başka bir limitasyonudur. Bu bölgelerde bulunan tanısal bir değişimin olgu bazında tespit edilemeyecek kadar az okumaya sahip olmasının, olguların tanı alamamasında rol oynaması muhtemeldir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yapılan çalışma ile immün olmayan hidrops fetalis olgularında monogenik hastalıkların rolü toplam altı olguda araştırılmış ve iki olguda, *RIT1* geninde c.297T>G ve c.321G>C tanı konulabilmesini sağlayan genetik varyantlar tespit edilmiştir.
2. Tanısal varyant tespit edilemeyen iki olguda potansiyel klinik önemi olan SMARCC2 ve COL2A1 genlerinde, sırasıyla c.3128del ve c.1300C>T değişimleri saptanmıştır. Bu değişimlerin klinik etkisinin kanıtlanabilmesi için daha geniş hasta serilerinde araştırılması ve fonksiyonel analizler yapılması gerekmektedir.
3. Tanı konulamayan olgularda tespit edilen varyantlar in silico analizler ve literatür taramaları ile önceliklendirilmiş, ileri çalışmalar için toplam 66 aday varyant ve nadir varyant yükünün artmış olduğu üç hücresel yolak literatüre kazandırılmıştır.
4. Tespit edilen aday varyantların ve aday genlerin daha büyük örneklem ile yapılan çalışmalar ve fonksiyonel araştırmalar ile İOHF etiyolojisindeki rollerinin kesinleştirilmesi önerilmektedir.
5. Çalışmada tetkik seçimi sebebiyle epigenetik etkenler, intronik ve gen dışı DNA dizileri, tüm ekzom dizileme tarafından tespit edilemeyen büyük delesyon/duplikasyonlar, genomik yapısal değişimler ve çevresel etkiler araştırılmamıştır. Bu öğelerin İOHF etiyolojisindeki rolünün aydınlatılması için konu hakkında daha fazla çalışmanın yapılması önerilmektedir.
6. Sonuç olarak, immün olmayan hidrops fetalis olgularında tek gen hastalıklarının rolü gözlemlenmiş ve sonraki araştırmalar için aday gen ve varyantlar önerilmiştir. Tüm veriler göz önünde bulundurulduğunda kromozomal analizler sonucunda tanı konulamayan İOHF vakalarında tek gen hastalıklarının araştırılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Persson, M., Cnattingius, S., Villamor, E., Söderling, J., Pasternak, B., Stephansson, O., & Neovius, M. (2017). Risk of major congenital malformations in relation to maternal overweight and obesity severity: cohort study of 1.2 million singletons. *bmj*, 357.
2. Wapner, R. J., Martin, C. L., Levy, B., Ballif, B. C., Eng, C. M., Zachary, J. M., ... & Jackson, L. (2012). Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *New England Journal of Medicine*, 367(23), 2175-2184.
3. Robson, S. C., Chitty, L. S., Morris, S., Verhoef, T., Ambler, G., Wellesley, D. G., ... & Crolla, J. A. (2017). Evaluation of array comparative genomic hybridisation in prenatal diagnosis of fetal anomalies: a multicentre cohort study with cost analysis and assessment of patient, health professional and commissioner preferences for array comparative genomic hybridisation. *Efficacy and Mechanism Evaluation*, 4(1), 1-104.
4. Hillman, S. C., Pretlove, S., Coomarasamy, A., McMullan, D. J., Davison, E. V., Maher, E. R., & Kilby, M. D. (2011). Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 37(1), 6-14.
5. Wapner, R., Petrovski, S., Brennan, K., Bier, L., Wou, K., & Goldstein, D. (2017). 8: Whole exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: A prospective study of sequential patients. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 216(1), S5-S6.
6. Stranneheim, H., & Wedell, A. (2016). Exome and genome sequencing: a revolution for the discovery and diagnosis of monogenic disorders. *Journal of internal medicine*, 279(1), 3-15.
7. Jelin, A. C., & Vora, N. (2018). Whole exome sequencing: applications in prenatal genetics. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 45(1), 69-81.
8. Sunayna, B., Karen, W., & Neeta, V. (2017). Van der Veyver Ignatia B., Wapner Ronald, Chitty Lyn S. Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenatal Diagnosis*, 38(1), 10-19.
9. Daum, H., Meiner, V., Elpeleg, O., Harel, T., collaborating authors, Bar-Or, L., ... & Segel, R. (2019). Fetal exome sequencing: yield and limitations in a tertiary referral center. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 53(1), 80-86.
10. Norton, M. E., Chauhan, S. P., Dashe, J. S., & Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). (2015). Society for maternal-fetal medicine (SMFM) clinical guideline# 7: nonimmune hydrops fetalis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 212(2), 127-139.

11. Gedikbasi, A., Oztarhan, K., Gunenc, Z., Yildirim, G., Arslan, O., Yildirim, D., & Ceylan, Y. (2011). Preeclampsia due to fetal non-immune hydrops: mirror syndrome and review of literature. *Hypertension in pregnancy*, 30(3), 322-330.
12. Fukushima, K., Morokuma, S., Fujita, Y., Tsukimori, K., Satoh, S., Ochiai, M., ... & Wake, N. (2011). Short-term and long-term outcomes of 214 cases of non-immune hydrops fetalis. *Early human development*, 87(8), 571-575.
13. Steurer, M. A., Peyvandi, S., Baer, R. J., MacKenzie, T., Li, B. C., Norton, M. E., ... & Moon-Grady, A. J. (2017). Epidemiology of live born infants with nonimmune hydrops fetalis—insights from a population-based dataset. *The Journal of pediatrics*, 187, 182-188.
14. Mardy, A. H., Chetty, S. P., Norton, M. E., & Sparks, T. N. (2019). A system-based approach to the genetic etiologies of non-immune hydrops fetalis. *Prenatal diagnosis*, 39(9), 732-750.
15. Croonen, E. A., Nillesen, W. M., Stuurman, K. E., Oudesluijs, G., Van De Laar, I. M., Martens, L., ... & Yntema, H. G. (2013). Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *European Journal of Human Genetics*, 21(9), 936-942.
16. Sparks, T. N., Thao, K., Lianoglou, B. R., Boe, N. M., Bruce, K. G., Datkhaeva, I., ... & Norton, M. E. (2019). Nonimmune hydrops fetalis: identifying the underlying genetic etiology. *Genetics in Medicine*, 21(6), 1339-1344.
17. Baer, R. J., Norton, M. E., Shaw, G. M., Flessel, M. C., Goldman, S., Currier, R. J., & Jelliffe-Pawlowski, L. L. (2014). Risk of selected structural abnormalities in infants after increased nuchal translucency measurement. *American journal of obstetrics and gynecology*, 211(6), 675-e1.
18. Maya, I., Yacobson, S., Kahana, S., Yeshaya, J., Tenne, T., Agmon-Fishman, I., ... & Sharony, R. (2017). Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 50(3), 332-335.
19. Sparks, T. N., Lianoglou, B. R., Adami, R. R., Pluym, I. D., Holliman, K., Duffy, J., ... & Norton, M. E. (2020). Exome sequencing for prenatal diagnosis in nonimmune hydrops fetalis. *New England Journal of Medicine*, 383(18), 1746-1756.
20. Bellini, C., Donarini, G., Paladini, D., Calevo, M. G., Bellini, T., Ramenghi, L. A., & Hennekam, R. C. (2015). Etiology of non-immune hydrops fetalis: an update. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(5), 1082-1088.
21. Daniel-Spiegel, E., Ghalamkarpour, A., Spiegel, R., Weiner, E., Vikkula, M., Shalev, E., & Shalev, S. A. (2005). Hydrops fetalis: an unusual

prenatal presentation of hereditary congenital lymphedema. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 25(11), 1015-1018.

22. Overcash, R. T., Gibu, C. K., Jones, M. C., Ramos, G. A., & Andreasen, T. S. (2015). Maternal and fetal capillary malformation–arteriovenous malformation (CM–AVM) due to a novel *RASA1* mutation presenting with prenatal non-immune hydrops fetalis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(10), 2440-2443.

23. Burin, M. G., Scholz, A. P., Gus, R., Sanseverino, M. T. V., Fritsh, A., Magalhaes, J. A., ... & Giugliani, R. (2004). Investigation of lysosomal storage diseases in nonimmune hydrops fetalis. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 24(8), 653-657.

24. Cheng, Y., Verp, M. S., Knutel, T., & Hibbard, J. U. (2003). Mucopolysaccharidosis type VII as a cause of recurrent non-immune hydrops fetalis.

25. Gimovsky, A. C., Luzi, P., & Berghella, V. (2015). Lysosomal storage disease as an etiology of nonimmune hydrops. *American journal of obstetrics and gynecology*, 212(3), 281-290.

26. Surmeli-Onay, O., Yakarisik, S., Korkmaz, A., Akcoren, Z., Yuce, A., Runz, H., ... & Yurdakok, M. (2013). Prenatal-onset Niemann–Pick type C disease with nonimmune hydrops fetalis. *Pediatrics & Neonatology*, 54(5), 344-347.

27. Terespolsky, D., Farrell, S. A., Siegel-Bartelt, J., & Weksberg, R. (1995). Infantile lethal variant of Simpson–Golabi–Behmel syndrome associated with hydrops fetalis. *American journal of medical genetics*, 59(3), 329-333.

28. Derderian, S. C., Trivedi, S., Farrell, J., Keller, R. L., Rand, L., Goldstein, R., ... & MacKenzie, T. C. (2014). Outcomes of fetal intervention for primary hydrothorax. *Journal of pediatric surgery*, 49(6), 900-904.

29. Steele, M., & Breg Jr, W. R. (1966). Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *The Lancet*, 287(7434), 383-385.

30. American College of Obstetricians and Gynecologists. (2016). Practice bulletin no. 162: Prenatal diagnostic testing for genetic disorders. *Obstetrics and gynecology*, 127(5), e108-e122.

31. Breman, A., Pursley, A. N., Hixson, P., Bi, W., Ward, P., Bacino, C. A., ... & Van den Veyver, I. (2012). Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with > 1000 cases and review of the literature. *Prenatal diagnosis*, 32(4), 351-361.

32. Shaffer, L. G., Rosenfeld, J. A., Dabell, M. P., Coppinger, J., Bandholz, A. M., Ellison, J. W., ... & Fisher, A. J. (2012). Detection rates of clinically

significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenatal diagnosis*, 32(10), 986-995.

33. Hillman, S. C., McMullan, D. J., Hall, G., Togneri, F. S., James, N., Maher, E. J., ... & Kilby, M. D. (2013). Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(6), 610-620.

34. ACOG Committee on Practice Bulletins (2007). ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstetrics and gynecology*, 109(1), 217–227. <https://doi.org/10.1097/00006250-200701000-00054>.

35. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. (2016). *Obstetrics and gynecology*, 127(5), e123–e137. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001406>.

36. Ong, C. Y., Liao, A. W., Spencer, K., Munim, S., & Nicolaides, K. H. (2000). First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 107(10), 1265–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2000.tb11618.x>.

37. Wilson, K. L., Czerwinski, J. L., Hoskovec, J. M., Noblin, S. J., Sullivan, C. M., Harbison, A., ... & Singletary, C. N. (2013). NSGC practice guideline: prenatal screening and diagnostic testing options for chromosome aneuploidy. *Journal of genetic counseling*, 22(1), 4-15.

38. Bender, W., & Dugoff, L. (2018). Screening for aneuploidy in multiple gestations: the challenges and options. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 45(1), 41-53.

39. Dashe J. S. (2016). Aneuploidy Screening in Pregnancy. *Obstetrics and gynecology*, 128(1), 181–194. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001385>.

40. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2016 May;127(5):e123-e137. doi: 10.1097/AOG.0000000000001406. PMID: 26938574.

41. Malone, F. D., Canick, J. A., Ball, R. H., Nyberg, D. A., Comstock, C. H., Bukowski, R., ... & D'alton, M. E. (2005). First-and Second-Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. 2005. First-trimester or secondtrimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med*, 353(19), 2001-2011.

42. Park, Y. W. (2001). Diagnosis of fetal anomalies by sonography. *Yonsei medical journal*, 42(6), 660-668.

43. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Study Group. The antenatal diagnosis of fetal abnormalities. In: Drive GO, Donnai D, eds.

Proceedings of the Eighteenth Study Group of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. London: Springer Verlag, 1991.

44. Dulgheroff, F. F., Peixoto, A. B., Petrini, C. G., Caldas, T. M. R. D. C., Ramos, D. R., Magalhães, F. O., & Araujo, E. (2020). Fetal structural anomalies diagnosed during the first, second and third trimesters of pregnancy using ultrasonography: a retrospective cohort study. *Sao Paulo Medical Journal*, 137, 391-400.

45. Doğum Öncesi Bakım Yönetim Rehberi 2014. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı Aile Planlaması Genel Müdürlüğü. Ankara. Erişim yeri: <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/dogumonubakim.pdf>. Erişim tarihi: 15.11.2020.

46. Grennert, L., Persson, P. H., Gennser, G., & Kullander, S. (1978). Benefits of ultrasonic screening of a pregnant population. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 57(sup78), 5-14.

47. Eik-Nes, S. H. (2010). The 18-week fetal examination and detection of anomalies. *Prenatal diagnosis*, 30(7), 624-630.

48. Abramowicz, J. S., Kossoff, G., Marsal, K., & Ter Haar, G. (2003). Safety Statement, 2000 (reconfirmed 2003) International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG). *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 21(1), 100-100.

49. Grandjean, H., Larroque, D., & Levi, S. (1999). The performance of routine ultrasonographic screening of pregnancies in the Eurofetus Study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 181(2), 446-454.

50. Moore KL, Persaud TV. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. 5th d. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1993. p. 142-73.

51. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Update on overall prevalence of major birth defects--Atlanta, Georgia, 1978-2005. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 57(1), 1-5.

52. Mathews, T. J., MacDorman, M. F., & Thoma, M. E. (2015). Infant mortality statistics from the 2013 period linked birth/infant death data set.

53. Yeo, L., & Vintzileos, A. M. (2003, April). The use of genetic sonography to reduce the need for amniocentesis in women at high-risk for Down syndrome. In *Seminars in perinatology* (Vol. 27, No. 2, pp. 152-159). WB Saunders.

54. Nyberg, D. A., Luthy, D. A., Resta, R. G., Nyberg, B. C., & Williams, M. A. (1998). Age-adjusted ultrasound risk assessment for fetal Down's syndrome during the second trimester: description of the method and analysis of 142 cases. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 12(1), 8-14.

55. Simoni, G., Brambati, B., Danesino, C., Rossella, F., Terzoli, G. L., Ferrari, M., & Fraccaro, M. (1983). Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human Genetics*, 63(4), 349-357.
56. Ledbetter, D. H., Zachary, J. M., Simpson, J. L., Golbus, M. S., Pergament, E., Jackson, L., ... & De La Cruz, F. (1992). Cytogenetic results from the US collaborative study on CVS. *Prenatal diagnosis*, 12(5), 317-345.
57. Breed, A. S. P. M., Mantingh, A., Vosters, R., Beekhuis, J. R., Van Lith, J. M. M., & Anders, G. J. P. A. (1991). Follow-up and pregnancy outcome after a diagnosis of mosaicism in CVS. *Prenatal diagnosis*, 11(8), 577-580.
58. Tabor, A., Philip, J., Bang, J., Madsen, M., & Obel, E. B. (1988). Safety of amniocentesis. *Prenatal diagnosis*, 8(2), 167-168.
59. Schloo, R., Miny, P., Holzgreve, W., Horst, J., & Lenz, W. (1992). Distal limb deficiency following chorionic villus sampling?. *American journal of medical genetics*, 42(3), 404-413.
60. Froster, U. G., & Jackson, L. (1996). Limb defects and chorionic villus sampling: results from an international registry, 1992-94. *The Lancet*, 347(9000), 489-494.
61. Walker, A. H. C. (1957). Liquor amnii studies in the prediction of haemolytic disease of the newborn. *British medical journal*, 2(5041), 376.
62. Mujezinovic, F., & Alfircvic, Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology*, 110(3), 687-694.
63. Tongsong, T., Wanapirak, C., Kunavikantikul, C., Sirirchotiyakul, S., Piyamongkol, W., & Chanprapaph, P. (2001). Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 184(4), 719-723.
64. MAXWELL, D. J., JOHNSON, P., HURLEY, P., NEALES, K., ALLAN, L., & KNOTT, P. (1991). Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 98(9), 892-897.
65. Nicolaides, K. H. (2004). Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191(1), 45-67.
66. Snijders, R. J. M., Noble, P., Sebire, N., Souka, A., & Nicolaides, K. H. (1998). UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *The Lancet*, 352(9125), 343-346.
67. Pajkrt, E., De Graaf, I. M., Mol, B. W., Van Lith, J. M., Bleker, O. P., &

- Bilardo, C. M. (1998). Weekly nuchal translucency measurements in normal fetuses. *Obstetrics & Gynecology*, 91(2), 208-211.
68. Braithwaite, J. M., Morris, R. W., & Economides, D. L. (1996). Nuchal translucency measurements: frequency distribution and changes with gestation in a general population. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 103(12), 1201-1204.
69. Yagel, S., Anteby, E. Y., Rosen, L., Yaffe, E., Rabinowitz, R., & Tadmor, O. (1998). Assessment of first trimester nuchal translucency by daily reference intervals. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 11(4), 262-265.
70. Roberts, L. J., Bewley, S., Mackinson, A. M., & Rodeck, C. H. (1995). First trimester fetal nuchal translucency: Problems with screening the general population 1. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 102(5), 381-385.
71. Shakoor, S., Dileep, D., Tirmizi, S., Rashid, S., Amin, Y., & Munim, S. (2017). Increased nuchal translucency and adverse pregnancy outcomes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 30(14), 1760-1763.
72. Sotiriadis, A., Papatheodorou, S., & Makrydimas, G. (2012). Neurodevelopmental outcome of fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal prenatal and/or postnatal assessment: a systematic review. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 39(1), 10-19.
73. Prefumo, F., Bhide, A., & Thilaganathan, B. (2003). Nuchal translucency and early diagnosis of congenital anomalies. In *Ultrasound and Endoscopic Surgery in Obstetrics and Gynaecology* (pp. 301-309). Springer, London.
74. Huang, J., Poon, L. C., Akolekar, R., Choy, K. W., Leung, T. Y., & Nicolaides, K. H. (2014). Is high fetal nuchal translucency associated with submicroscopic chromosomal abnormalities on array CGH?. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 43(6), 620-624.
75. Nicolaides, K. H., Sebire, N. J., & Snijders, R. S. M. (1999). The 11-14 week scan: the diagnosis of fetal abnormalities (pp. 1-196). Parthenon Press.
76. Hyett, J. A., Perdu, M., Sharland, G. K., Snijders, R. S. M., & Nicolaides, K. H. (1997). Increased nuchal translucency at 10—14 weeks of gestation as a marker for major cardiac defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 10(4), 242-246.
77. Ville, Y. (2001). Nuchal translucency in the first trimester of pregnancy: ten years on and still a pain in the neck?. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 18(1), 5-8.

78. Kagan, K. O., Avgidou, K., Molina, F. S., Gajewska, K., & Nicolaides, K. H. (2006). Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. *Obstetrics & Gynecology*, 107(1), 6-10.
79. Sotiriadis, A., Papatheodorou, S., Eleftheriades, M., & Makrydimas, G. (2013). Nuchal translucency and major congenital heart defects in fetuses with normal karyotype: a meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 42(4), 383-389.
80. Jelliffe-Pawlowski, L. L., Norton, M. E., Shaw, G. M., Baer, R. J., Flessel, M. C., Goldman, S., & Currier, R. J. (2015). Risk of critical congenital heart defects by nuchal translucency norms. *American journal of obstetrics and gynecology*, 212(4), 518-e1.
81. Ghi, T., Huggon, I. C., Zosmer, N., & Nicolaides, K. H. (2001). Incidence of major structural cardiac defects associated with increased nuchal translucency but normal karyotype. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 18(6), 610-614.
82. Fukada, Y., Yasumizu, T., Takizawa, M., Amemiya, A., & Hoshi, K. (1997). The prognosis of fetuses with transient nuchal translucency in the first and early second trimester. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 76(10), 913-916.
83. Pajkrt, E., Van Lith, J. M., Mol, B. W., & Bleker, O. P. (1995). Nuchal translucency measurement in normal fetuses. *Obstetrics & Gynecology*, 86(6), 994-997.
84. Hyett, J., Perdu, M., Sharland, G., Snijders, R., & Nicolaides, K. H. (1999). Using fetal nuchal translucency to screen for major congenital cardiac defects at 10-14 weeks of gestation: population based cohort study. *Bmj*, 318(7176), 81-85.
85. Bilardo, C. M., Timmerman, E., Pajkrt, E., & Van Maarle, M. (2010). Increased nuchal translucency in euploid fetuses—what should we be telling the parents?. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 30(2), 93-102.
86. Alamillo, C. M., Fiddler, M., & Pergament, E. (2012). Increased nuchal translucency in the presence of normal chromosomes: what's next?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 24(2), 102-108.
87. Bakker, M., Pajkrt, E., & Bilardo, C. M. (2014). Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: what next?. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 28(3), 355-366.
88. Ngo, C., Viot, G., Aubry, M. C., Tsatsaris, V., Grange, G., Cabrol, D., & Pannier, E. (2007). First-trimester ultrasound diagnosis of skeletal dysplasia associated with increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound in Obstetrics*

and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 30(2), 221-226.

89. Hsieh, C. T. C., Yeh, G. P., Wu, H. H., Wu, J. L., Chou, P. H., & Lin, Y. M. (2008). Fetus with osteogenesis imperfecta presenting as increased nuchal translucency thickness in the first trimester. *Journal of Clinical Ultrasound*, 36(2), 119-122.

90. Zhen, L., Jiang, F., & Li, D. Z. (2019). Osteogenesis imperfecta type VIII: Association with increased nuchal translucency and prenatal diagnosis by targeted exome sequencing. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 235, 128-129.

91. Zhen, L., Zhang, Y., & Li, D. Z. (2016). Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with increased nuchal translucency using next-generation sequencing. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 201, 229-230.

92. Louka, A. P., Krampl, E., Bakalis, S., Heath, V., & Nicolaides, K. H. (2001). Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 18(1), 9-17.

93. Senat, M. V., De Keersmaecker, B., Audibert, F., Montcharmont, G., Frydman, R., & Ville, Y. (2002). Pregnancy outcome in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenatal diagnosis*, 22(5), 345-349.

94. Bilardo, C. M., Müller, M. A., Pajkrt, E., Clur, S. A., Van Zalen, M. M., & Bijlsma, E. K. (2007). Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: time for parental reassurance. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 30(1), 11-18.

95. Mula, R., Goncé, A., Bennásar, M., Arigita, M., Meler, E., Nadal, A., ... & Borrell, A. (2012). Increased nuchal translucency and normal karyotype: perinatal and pediatric outcomes at 2 years of age. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 39(1), 34-41.

96. Pergament, E., Alamillo, C., Sak, K., & Fiddler, M. (2011). Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenatal diagnosis*, 31(3), 307-310.

97. Hiippala, A., Eronen, M., Taipale, P., Salonen, R., & Hiilesmaa, V. (2001). Fetal nuchal translucency and normal chromosomes: a long-term follow-up study. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 18(1), 18-22.

98. Lee, K. A., Williams, B., Roza, K., Ferguson, H., David, K., Eddleman, K., ... & Kornreich, R. (2009). PTPN11 analysis for the prenatal diagnosis of

Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clinical genetics*, 75(2), 190-194.

99. Lord, J., McMullan, D. J., Eberhardt, R. Y., Rinck, G., Hamilton, S. J., Quinlan-Jones, E., ... & Wilson, E. (2019). Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *The Lancet*, 393(10173), 747-757.

100. Petrovski, S., Aggarwal, V., Giordano, J. L., Stosic, M., Wou, K., Bier, L., ... & Wapner, R. J. (2019). Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *The Lancet*, 393(10173), 758-767.

101. Yang, X., Huang, L. Y., Pan, M., Xu, L. L., Zhen, L., Han, J., & Li, D. Z. (2020). Exome sequencing improves genetic diagnosis of fetal increased nuchal translucency. *Prenatal Diagnosis*, 40(11), 1426-1431.

102. Choy, K. W., Wang, H., Shi, M., Chen, J., Yang, Z., Zhang, R., ... & Dong, Z. (2019). Prenatal diagnosis of fetuses with increased nuchal translucency by genome sequencing analysis. *Frontiers in genetics*, 10, 761.

103. Xue, S., Yan, H., Chen, J., Li, N., Wang, J., Liu, Y., ... & Chen, M. (2020). Genetic examination for fetuses with increased fetal nuchal translucency by genomic technology. *Cytogenetic and genome research*, 160(2), 57-62.

104. Den Hollander, N. S., Kleijer, W. J., Schoonderwaldt, E. M., Los, F. J., Wladimiroff, J. W., & Niermeijer, M. F. (2000). In utero diagnosis of mucopolysaccharidosis type VII in a fetus with an enlarged nuchal translucency. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 16(1), 87-90.

105. Tercanli, S., Uyanik, G., Hösli, I., Cagdas, A., & Holzgreve, W. (2000). Increased nuchal translucency in a case of long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Fetal diagnosis and therapy*, 15(6), 322-325.

106. Masturzo, B., Hyett, J. A., Kalache, K. D., Rumsby, G., Jauniaux, E., & Rodeck, C. H. (2001). Increased nuchal translucency as a prenatal manifestation of congenital adrenal hyperplasia. *Prenatal diagnosis*, 21(4), 314-316.

107. De Biasio, P., Prefumo, F., Casagrande, V., Stroppiano, M., Venturini, P. L., & Filocamo, M. (2006). First trimester fetal nuchal translucency and inherited metabolic disorders. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 26(1), 77-80.

108. Hyett, J., Moscoso, G., & Nicolaides, K. (1997). Abnormalities of the heart and great arteries in first trimester chromosomally abnormal fetuses. *American journal of medical genetics*, 69(2), 207-216.

109. Hyett, J., Moscoso, G., & Nicolaides, K. (1995). Morphometric analysis of the great vessels in early fetal life. *Human Reproduction*, 10(11), 3045-3048.

110. Hyett, J., Moscoso, G., & Nicolaides, K. (1995). Increased nuchal translucency in trisomy 21 fetuses: relationship to narrowing of the aortic isthmus. *Human Reproduction*, 10(11), 3049-3051.
111. Clark, E. B. (1984). Neck web and congenital heart defects: A pathogenic association in 45 X $\square$ O Turner syndrome?. *Teratology*, 29(3), 355-361.
112. Huggon, I. C., Turan, O., & Allan, L. D. (2004). Doppler assessment of cardiac function at 11–14 weeks' gestation in fetuses with normal and increased nuchal translucency. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 24(4), 390-398.
113. Haak, M. C., Twisk, J. W. R., Bartelings, M. M., Gittenberger $\square$ de Groot, A. C., & Van Vugt, J. M. G. (2005). First $\square$ trimester fetuses with increased nuchal translucency do not show altered intracardiac flow velocities. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 246-252.
114. Souka, A. P., Snijders, R. J. M., Novakov, A., Soares, W., & Nicolaides, K. H. (1998). Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 11(6), 391-400.
115. Brown, R. N., & Nicolaides, K. H. (2000). Increased fetal nuchal translucency: possible association with esophageal atresia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 15(6), 531-532.
116. Sebire, N. J., Snijders, R. J. M., Davenport, M., Greenough, A., & Nicolaides, K. H. (1997). Fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks' gestation and congenital diaphragmatic hernia. *Obstetrics & Gynecology*, 90(6), 943-946.
117. Perlitz, Y., Haddad, S., & Matilsky, M. (1997). Increased nuchal translucency is associated with asphyxiating thoracic dysplasia. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 10(4), 297-298.
118. Bronshtein, M., Lewit, N., Sujov, P. O., Makhoul, I. R., & Blazer, S. (1995). Prenatal diagnosis of congenital diaphragmatic hernia: timing of visceral herniation and outcome. *Prenatal diagnosis*, 15(8), 695-698.
119. Von Kaisenberg, C. S., Brand-Saberi, B., Christ, B., Vallian, S., Farzaneh, F., & Nicolaides, K. H. (1998). Collagen type VI gene expression in the skin of trisomy 21 fetuses. *Obstetrics & Gynecology*, 91(3), 319-323.
120. Von Kaisenberg, C. S., Krenn, V., Ludwig, M., Nicolaides, K. H., & Brand-Saberi, B. (1998). Morphological classification of nuchal skin in human

fetuses with trisomy 21, 18, and 13 at 12—18 weeks and in a trisomy 16 mouse. *Anatomy and embryology*, 197(2), 105-124.

121. Brand-Saberi, B., Flöel, H., Christ, B., Schulte-Vallentin, M., & Schindler, H. (1994). Alterations of the fetal extracellular matrix in the nuchal oedema of Down's syndrome. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 176(6), 539-547.

122. Brand-Saberi, B., Epperlein, H. H., Romanos, G. E., & Christ, B. (1994). Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell and tissue research*, 277(3), 465-475.

123. Engström-Laurent, A. (1989). Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states. *The biology of hyaluronan*, 143, 233-247.

124. Perris, R., & Johansson, S. (1990). Inhibition of neural crest cell migration by aggregating chondroitin sulfate proteoglycans is mediated by their hyaluronan-binding region. *Developmental biology*, 137(1), 1-12.

125. Kurnit, D. M., Aldridge, J. F., Matsuoka, R., Matthysse, S., Opitz, J. M., & Reynolds, J. F. (1985). Increased adhesiveness of trisomy 21 cells and atrioventricular canal malformations in Down syndrome: a stochastic model. *American journal of medical genetics*, 20(2), 385-399.

126. Kurnit, D. M., Layton, W. M., & Matthysse, S. T. E. V. E. N. (1987). Genetics, chance, and morphogenesis. *American Journal of Human Genetics*, 41(6), 979.

127. Souka, A. P., Von Kaisenberg, C. S., Hyett, J. A., Sonek, J. D., & Nicolaides, K. H. (2005). Increased nuchal translucency with normal karyotype. *American journal of obstetrics and gynecology*, 192(4), 1005-1021.

128. van der Putte S. C. (1977). Lymphatic malformation in human fetuses. A study of fetuses with Turner's syndrome or status Bonnevie-Ullrich. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology*, 376(3), 233-246. <https://doi.org/10.1007/BF00432399>.

129. Chitayat, D., Kalousek, D. K., & Bamforth, J. S. (1989). Lymphatic abnormalities in fetuses with posterior cervical cystic hygroma. *American journal of medical genetics*, 33(3), 352-356.

130. Von Kaisenberg, C. S., Nicolaides, K. H., & Brand-Saberi, B. (1999). Lymphatic vessel hypoplasia in fetuses with Turner syndrome. *Human Reproduction*, 14(3), 823-826.

131. Sabin, F. R. (1909). The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. *American Journal of Anatomy*, 9(1), 43-91.

132. Souka, A. P., Krampl, E., Geerts, L. T. G. M., & Nicolaides, K. H.

(2002). Congenital lymphedema presenting with increased nuchal translucency at 13 weeks of gestation. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 22(2), 91-92.

133. Bekker, M. N., Haak, M. C., Rekoert-Hollander, M., Twisk, J., & Van Vugt, J. M. G. (2005). Increased nuchal translucency and distended jugular lymphatic sacs on first-trimester ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 239-245.

134. Haak, M. C., Bartelings, M. M., Jackson, D. G., Webb, S., Vugt, J. M. V., & Groot, A. C. G. D. (2002). Increased nuchal translucency is associated with jugular lymphatic distension. *Human reproduction*, 17(4), 1086-1092.

135. Bekker, M. N., van den Akker, N. M., Bartelings, M. M., Arkesteijn, J. B., Fischer, S. G., Polman, J. A., ... & Gittenberger-de Groot, A. C. (2006). Nuchal edema and venous-lymphatic phenotype disturbance in human fetuses and mouse embryos with aneuploidy. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*, 13(3), 209-216.

136. Nagy, J. A., Vasile, E., Feng, D., Sundberg, C., Brown, L. F., Detmar, M. J., ... & Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 196(11), 1497-1506.

137. Schacht, V., Ramirez, M. I., Hong, Y. K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., ... & Detmar, M. (2003). T1 $\alpha$ /podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *The EMBO journal*, 22(14), 3546-3556.

138. Bekker, M. N., Arkesteijn, J. B., van den Akker, N. M., Hoffman, S., Webb, S., van Vugt, J. M., & Gittenberger-de Groot, A. C. (2005). Increased NCAM expression and vascular development in trisomy 16 mouse embryos: relationship with nuchal translucency. *Pediatric research*, 58(6), 1222-1227.

139. Sebire, N. J., Bianco, D., Snijders, R. J. M., Zuckerman, M., & Nicolaides, K. H. (1997). Increased fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks: is screening for maternal–fetal infection necessary?. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 104(2), 212-215.

140. PETRIKOVSKY, B. M., BAKER, D., & SCHNEIDER, E. (1996). Fetal hydrops secondary to human parvovirus infection in early pregnancy. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 16(4), 342-344.

141. Abrams, Matthew E., et al. "Hydrops fetalis: a retrospective review of cases reported to a large national database and identification of risk factors associated with death." *Pediatrics* 120.1 (2007): 84-89.

142. Gort, L., Granell, M. R., Fernández, G., Carreto, P., Sanchez, A., & Coll,

M. J. (2012). Fast protocol for the diagnosis of lysosomal diseases in nonimmune hydrops fetalis. *Prenatal diagnosis*, 32(12), 1139-1142.

143. Knilans, T. K. (1995, December). Cardiac abnormalities associated with hydrops fetalis. In *Seminars in perinatology* (Vol. 19, No. 6, pp. 483-492). WB Saunders.

144. Arcasoy, M. O., & Gallagher, P. G. (1995, December). Hematologic disorders and nonimmune hydrops fetalis. In *Seminars in perinatology* (Vol. 19, No. 6, pp. 502-515). WB Saunders.

145. Barron, S. D., & Pass, R. F. (1995, December). Infectious causes of hydrops fetalis. In *Seminars in perinatology* (Vol. 19, No. 6, pp. 493-501). WB Saunders.

146. Mahieu-Caputo, D., Salomon, L. J., Le Bidois, J., Fermont, L., Brunhes, A., Jouvett, P., ... & Dommergues, M. (2003). Fetal hypertension: an insight into the pathogenesis of the twin-twin transfusion syndrome. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 23(8), 640-645.

147. Galea, P., Jain, V., & Fisk, N. M. (2005). Insights into the pathophysiology of twin-twin transfusion syndrome. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 25(9), 777-785.

148. Van den Wijngaard, J. P., Ross, M. G., & Van Gemert, M. J. (2007). Twin-twin transfusion syndrome modeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1101(1), 215-234.

149. Bukowski, R., & Saade, G. R. (2000). Hydrops fetalis. *Clinics in perinatology*, 27(4), 1007-1031.

150. Bellini, C., Boccardo, F., Bonioli, E., & Campisi, C. (2006). Lymphodynamics in the fetus and newborn. *Lymphology*, 39(3), 110-117.

151. Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C., ... & Shendure, J. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461(7261), 272-276.

152. Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., Zumbo, P., ... & Lifton, R. P. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19096-19101.

153. Teer, J. K., & Mullikin, J. C. (2010). Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Human molecular genetics*, 19(R2), R145-R151.

154. Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 12(11), 745-755.

155. Becker, J., Semler, O., Gilissen, C., Li, Y., Bolz, H. J., Giunta, C., ... & Netzer, C. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*, 88(3), 362-371.
156. Montenegro, G., Powell, E., Huang, J., Speziani, F., Edwards, Y. J., Beecham, G., ... & Züchner, S. (2011). Exome sequencing allows for rapid gene identification in a Charcot-Marie-Tooth family. *Annals of neurology*, 69(3), 464-470.
157. Ng, S. B., Bigham, A. W., Buckingham, K. J., Hannibal, M. C., McMillin, M. J., Gildersleeve, H. I., ... & Shendure, J. (2010). Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nature genetics*, 42(9), 790-793.
158. Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., ... & Bamshad, M. J. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature genetics*, 42(1), 30-35.
159. Ostergaard, P., Simpson, M. A., Brice, G., Mansour, S., Connell, F. C., Onoufriadis, A., ... & Jeffery, S. (2011). Rapid identification of mutations in GJC2 in primary lymphoedema using whole exome sequencing combined with linkage analysis with delineation of the phenotype. *Journal of medical genetics*, 48(4), 251-255.
160. Sirmaci, A., Spiliopoulos, M., Brancati, F., Powell, E., Duman, D., Abrams, A., ... & Tekin, M. (2011). Mutations in ANKRD11 cause KBG syndrome, characterized by intellectual disability, skeletal malformations, and macrodontia. *The American Journal of Human Genetics*, 89(2), 289-294.
161. Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Şakalar, Y. B., Hasanefendioğlu-Bayrak, A., ... & Tekin, M. (2010). MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *The American Journal of Human Genetics*, 87(5), 679-686.
162. Walsh, T., Shahin, H., Elkan-Miller, T., Lee, M. K., Thornton, A. M., Roeb, W., ... & Kanaan, M. (2010). Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *The American Journal of Human Genetics*, 87(1), 90-94.
163. Züchner, S., Dallman, J., Wen, R., Beecham, G., Naj, A., Farooq, A., ... & Perićak-Vance, M. A. (2011). Whole-exome sequencing links a variant in DHDDS to retinitis pigmentosa. *The American Journal of Human Genetics*, 88(2), 201-206.
164. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ... & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.

165. Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current opinion in genetics & development*, 16(6), 545-552.
166. Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
167. Callaway, J. L., Shaffer, L. G., Chitty, L. S., Rosenfeld, J. A., & Crolla, J. A. (2013). The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature. *Prenatal diagnosis*, 33(12), 1119-1123.
168. Appenzeller, S., Balling, R., Barisic, N., Baulac, S., Caglayan, H., Craiu, D., ... & Ruzzo, E. K. (2014). De novo mutations in synaptic transmission genes including DNMT1 cause epileptic encephalopathies. *The American Journal of Human Genetics*, 95(4), 360-370.
169. Fitzgerald, T. W., Gerety, S. S., Jones, W. D., Van Kogelenberg, M., King, D. A., McRae, J., ... & McEntagart, M. (2015). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*, 519(7542), 223.
170. Zhu, X., Petrovski, S., Xie, P., Ruzzo, E. K., Lu, Y. F., McSweeney, K. M., ... & Goldstein, D. B. (2015). Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. *Genetics in Medicine*, 17(10), 774-781.
171. Medeira, A., Norman, A., Haslam, J., Clayton-Smith, J., & Donnai, D. (1994). Examination of fetuses after induced abortion for fetal abnormality—a follow-up study. *Prenatal diagnosis*, 14(5), 381-385.
172. Chandler, N., Best, S., Hayward, J., Faravelli, F., Mansour, S., Kivuva, E., ... & Chitty, L. S. (2018). Rapid prenatal diagnosis using targeted exome sequencing: a cohort study to assess feasibility and potential impact on prenatal counseling and pregnancy management. *Genetics in Medicine*, 20(11), 1430-1437.
173. Zhou, X., Chandler, N., Deng, L., Zhou, J., Yuan, M., & Sun, L. (2018). Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias using a targeted skeletal gene panel. *Prenatal diagnosis*, 38(9), 692-699.
174. Walkiewicz, M., Braxton, A., Liu, P., Xia, P. F., Bi, W., & Xiao, R. (2016). The utility of whole exome sequencing in prenatal diagnosis. In *American Society of Human Genetics Annual Meeting* (pp. 18-22).
175. Byrne, A., Feng, J., Schreiber, A., Brautigan, P., Nataran, N., Yu, S., ... & Hahn, C. (2017). The genomic autopsy: using whole exome and whole genome sequencing to solve complex fetal and neonatal presentations. *J Paediatr Child Health*, 53, 15-16.
176. McMullan, D. J., Lord, J., Eberhardt, R., Rinck, G., Hamilton, S., Keelagher, R., ... & Hurles, M. (2018, October). Exome sequencing of 406 parental/fetal trios with structural abnormalities revealed by ultrasound in the UK Prenatal Assessment of Genomes and Exomes (PAGE) project. In *EUROPEAN*

JOURNAL OF HUMAN GENETICS (Vol. 26, pp. 82-82). MACMILLAN BUILDING, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND: NATURE PUBLISHING GROUP.

177. Yates, C. L., Monaghan, K. G., Copenheaver, D., Retterer, K., Scuffins, J., Kucera, C. R., ... & Juusola, J. (2017). Whole-exome sequencing on deceased fetuses with ultrasound anomalies: expanding our knowledge of genetic disease during fetal development. *Genetics in Medicine*, 19(10), 1171-1178.

178. Zhang, Y., Lin, S., & Fang, Q. (2017). Prenatal diagnosis of Sotos syndrome characterized by fetal growth restriction. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 139(2), 248-250.

179. Ferretti, L., Mellis, R., & Chitty, L. S. (2019). Update on the use of exome sequencing in the diagnosis of fetal abnormalities. *European journal of medical genetics*, 62(8), 103663.

180. Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q. B., Antipenko, A., ... & Abel, L. (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), 5473-5478.

181. Meienberg, J., Bruggmann, R., Oexle, K., & Matyas, G. (2016). Clinical sequencing: is WGS the better WES?. *Human genetics*, 135(3), 359-362.

182. Filges, I., & Friedman, J. M. (2015). Exome sequencing for gene discovery in lethal fetal disorders—harnessing the value of extreme phenotypes. *Prenatal diagnosis*, 35(10), 1005-1009.

183. Monaghan, K. G., Leach, N. T., Pekarek, D., Prasad, P., & Rose, N. C. (2020). The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 22(4), 675-680.

184. Coffa, J., & Van Den Berg, J. (2011). Analysis of MLPA data using novel software Coffalyser .NET by MRC-Holland. *Modern approaches to quality control*. Rijeka, Croatia: InTech, 125-50.

185. Botstein, D., & Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*, 33(3), 228-237.

186. Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A., & Jabado, N. (2011). What can exome sequencing do for you?. *Journal of medical genetics*, 48(9), 580-589.

187. SEQ Analysis Platform. [Erişim Tarihi: 24 Haziran 2021]. <https://seq.genomize.com/>

188. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence

variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405-423.

189. Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome biology*, 4(9), 1-11.

190. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D607-D613. doi: 10.1093/nar/gky1131. PMID: 30476243; PMCID: PMC6323986.

191. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99:877–85.

192. Liu, X., Li, C., Mou, C. et al. dbNSFP v4: a comprehensive database of transcript-specific functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs. *Genome Med* 12, 103 (2020).

193. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Hum Mutat.* 2011 Aug;32(8):894-9. doi: 10.1002/humu.21517. PMID: 21520341; PMCID: PMC3145015.

194. Barat-Houari, M., Dumont, B., Fabre, A., Them, F. T., Alembik, Y., Alessandri, J. L., ... & Touitou, I. (2016). The expanding spectrum of COL2A1 gene variants IN 136 patients with a skeletal dysplasia phenotype. *European Journal of Human Genetics*, 24(7), 992-1000.

195. Romano, A. A., Allanson, J. E., Dahlgren, J., Gelb, B. D., Hall, B., Pierpont, M. E., ... & Noonan, J. A. (2010). Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*, 126(4), 746-759.

196. Van der Burgt, I. (2007). Noonan syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 2(1), 1-6.

197. Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*, 81(1), 153-208.

198. Lee, C. H. J., Della, N. G., Chew, C. E., & Zack, D. J. (1996). Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins. *Journal of Neuroscience*, 16(21), 6784-6794.

199. Wes, P. D., Yu, M., & Montell, C. (1996). RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *The EMBO journal*, 15(21), 5839-5848.

200. Shi, G. X., & Andres, D. A. (2005). Rit contributes to nerve growth

factor-induced neuronal differentiation via activation of B-Raf-extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades. *Molecular and cellular biology*, 25(2), 830-846.

201. Mone, F., Eberhardt, R. Y., Hurles, M. E., McMullan, D. J., Maher, E. R., Lord, J., ... & Kilby, M. D. (2021). Fetal hydrops and the Incremental yield of Next generation sequencing over standard prenatal Diagnostic testing (FIND) study: prospective cohort study and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*.

202. Su, M. W., Lee, B., Ramirez, F., Machado, M., & Horton, W. (1989). Nucleotide sequence of the full length cDNA encoding for human type II procollagen. *Nucleic acids research*, 17(22), 9473.

203. Sumiyoshi, H., Laub, F., Yoshioka, H., & Ramirez, F. (2001). Embryonic expression of type XIX collagen is transient and confined to muscle cells. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 220(2), 155-162.

204. Myers, J. C., Li, D., Amenta, P. S., Clark, C. C., Nagaswami, C., & Weisel, J. W. (2003). Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32047-32057.

205. Kosho, T., Okamoto, N., & Coffin-Siris Syndrome International Collaborators. (2014, September). Genotype-phenotype correlation of Coffin-Siris syndrome caused by mutations in SMARCB1, SMARCA4, SMARCE1, and ARID1A. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 166, No. 3, pp. 262-275).

206. Zaidi, S., Choi, M., Wakimoto, H., Ma, L., Jiang, J., Overton, J. D., ... & Lifton, R. P. (2013). De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature*, 498(7453), 220-223.

207. Scherl, A., Couté, Y., Déon, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., ... & Diaz, J. J. (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Molecular biology of the cell*, 13(11), 4100-4109.

208. Ducamp, S., & Fleming, M. D. (2019). The molecular genetics of sideroblastic anemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(1), 59-69.

209. Takash, W., Cañizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattéi, M. G., Jay, P., & Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic acids research*, 29(21), 4274-4283.

210. Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature*

protocols, 4(1), 44-57.

211. Koenighofer, M., Hung, C. Y., McCauley, J. L., Dallman, J., Back, E. J., Mihalek, I., ... & Bodamer, O. A. (2016). Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome—additional functional evidence and expanding the clinical phenotype. *Clinical genetics*, 89(3), 359-366.
212. Hinson, J. T., Fantin, V. R., Schönberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., ... & Seidman, C. E. (2007). Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *New England Journal of Medicine*, 356(8), 809-819.
213. Liao, N. P., Laktyushin, A., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Yao, S., Whitlock, E., ... & Babon, J. J. (2018). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nature communications*, 9(1), 1-14.
214. Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., ... & Stefansson, K. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 488(7412), 471-475.
215. Quinn, A. M., Valcarcel, B. N., Makhamreh, M. M., Al-Kouatly, H. B., & Berger, S. I. (2020). A systematic review of monogenic etiologies of nonimmune hydrops fetalis. *Genetics in Medicine*, 1-10.

## 8. EKLER

### EK 1. Etik Kurul Onayı

Tez araştırması için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 23.06.2021 tarihli 2021/19-12 numaralı kararıyla etik kurul onayı alınmıştır.

| DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ<br>GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI |                                                                         |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sayın Prof.Dr. Ayfer Ügenalp                                                  |                                                                         |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.                   |                                                                         |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.                                        |                                                                         |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| ETİK KOMİSYONUN ADI                                                           | DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ<br>GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| AÇIK ADRES                                                                    | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| TELEFON                                                                       | 0 232 412 22 54-0 232 412 22 58                                         |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| FAKS                                                                          | 0 232 412 22 43                                                         |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| E-POSTA                                                                       | goaek@deu.edu.tr                                                        |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
| BAŞVURU BİLGİLERİ                                                             | DOSYA NO:                                                               | 6466-GOA                                                                                                                                                                                             |                   |                                                                                                              |
|                                                                               | ARAŞTIRMA                                                               | UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/><br>YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/> |                   |                                                                                                              |
|                                                                               | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                                   | İmmün Olmayan Hidrops Fetalis Olgularında Tüm Ekzom Dizileme ile Aday Genlerin Tespiti                                                                                                               |                   |                                                                                                              |
|                                                                               | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                                 |                                                                                                                                                                                                      |                   |                                                                                                              |
|                                                                               | SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI                 | Prof.Dr. Ayfer Ügenalp<br>Tıbbi Genetik Anabilim Dalı                                                                                                                                                |                   |                                                                                                              |
|                                                                               | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                                           | TEK MERKEZ <input type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                 |                   |                                                                                                              |
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER                                                      | Belge Adı                                                               | Tarihi                                                                                                                                                                                               | Versiyon Numarası | Dili                                                                                                         |
|                                                                               | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                                                     | Mevcut                                                                                                                                                                                               |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                               | ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR                                          | Mevcut                                                                                                                                                                                               |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                               | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU                                     | Mevcut                                                                                                                                                                                               |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                               | OLGU RAPOR FORMU                                                        | Mevcut                                                                                                                                                                                               |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

|                                             | <b>Karar No:2021/19-12</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Tarih:23.06.2021</b>                                      |          |                                       |                                       |      |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|------|
| <b>KARAR BİLGİLERİ</b>                      | Prof.Dr. Ayfer Ülgenalp'in sorumlusu olduğu " <b>İmmün Olmayan Hidrops Fetalis Olgularında Tüm Ekzom Dizileme ile Aday Genlerin Tespiti</b> " isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. |                                                              |          |                                       |                                       |      |
| <b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                              |          |                                       |                                       |      |
| <b>ÇALIŞMA ESASI</b>                        | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                              |          |                                       |                                       |      |
| <b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                              |          |                                       |                                       |      |
| Unvanı/Adı/Soyadı                           | Uzmanlık Alanı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Kurumu                                                       | Cinsiyet | Araştırma ile ilişkili mi?            |                                       | İmza |
| Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)       | Kardiyoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü                | Erkek    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr. Emel Çalikoğlu (Başkan Yardımcısı) | Preventif Onkoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Onkoloji Enstitüsü                                           | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan                | Moleküler Tıp                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Sağlık Bilimleri Enstitüsü                                   | Erkek    | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/>            |      |
| Prof.Dr. Suna Asilsoy                       | Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü                | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Seher Özyürek                        | Muskuloskeletal Fizyoterapi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu              | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay                   | Tıbbi Farmakoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı            | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney                 | Halk Sağlığı Hemşireliği                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği                | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın                | Göğüs Hastalıkları                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı           | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr. Aliye Akcalı                        | Periodontoloji                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Diş Hekimliği Fakültesi                                      | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr. Şule Özbilgin                       | Anesteziyoloji ve Reanimasyon                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü               | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur           | Tıbbi Biyoloji ve Genetik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Sağlık Bilimleri Enstitüsü                                   | Kadın    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin                    | Spor Yönetim Bilimleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi                        | Erkek    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel                    | Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D | Erkek    | E <input type="checkbox"/>            | H <input checked="" type="checkbox"/> |      |

Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan çalışmada sorumlu araştırmacı olduğu için çalışma görüşülürken toplantıda bulunmamıştır.

## EK 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu (Kişinin Kendisi İçin)

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
EĞİTİM BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ETİK KURULU

### BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Bu formun amacı katılmanız rica edilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek ve katılmanız ile ilgili izin almaktır.

Bu kapsamda “*İmmün Olmayan Hidrops Fetalis Olgularında Tüm Ekzom Sekanslama İle Aday Genlerin Tespiti*” çalışması **gönüllü katılımcılarla** yürütülmektedir. Araştırma sırasında sizden alınacak bilgiler gizli tutulacak ve sadece araştırma amaçlı kullanılacaktır. Araştırma sürecinde konu ile ilgili her türlü soru ve görüşleriniz için aşağıda iletişim bilgisi bulunan araştırmacıyla görüşebilirsiniz. Bu araştırmaya **katılmama** hakkınız bulunmaktadır. Aynı zamanda çalışmaya katıldıktan sonra çalışmadan **çıkabilirsiniz**. Bu formu onaylamanız, **araştırmaya katılım için onam verdiğiniz** anlamına gelecektir.

Rutin genetik testler ile tanı konulmamış immün olmayan hidrops fetalis olgularına tanı konulması amacıyla tüm ekzom dizileme çalışılmaktadır. Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda çalışılan fetal örnek ve ebeveynlerine ait tespit edilen genomik değişimler analiz edilmekte ve rapor hazırlanmaktadır. Yapılması planlanan bu çalışmada tespit edile bu genomik değişimler kullanılarak tanı alan hasta sayılarının ve hangi genlerde değişimler olduğu belirlenecek, tanı alamayan hastalarda ise literatür ve in-silico analiz olarak isimlendirilen bilgisayar analizleri kullanılarak aday gen ve değişimler saptanmaya çalışılacaktır. Araştırma Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafında yürütülecektir. Beklenen toplam gönüllü sayısı 10 olmak ile beraber bu sayının değişmesi muhtemeldir. Araştırma 01.06.2021– 01.08.2021 tarihleri arasında iki ay sonunda sonuçlanacaktır. Araştırma sonucunda bulunan bulgular aşağıda belirtilecek kişinin kendi isteği doğrultusunda kişi ile genetik danışma eşliğinde paylaşılacak/paylaşılmayacaktır. Araştırmacının gönüllüler açısından herhangi bir riski bulunmamaktadır. Araştırmaya katılan gönüllülerden herhangi bir ücret alınmayacak ayrıca araştırma masrafları herhangi bir şekilde gönüllünün sosyal güvenlik kuruluşuna yansıtılmayacaktır.

#### Çalışmaya Katılım Onayı (bireyin kendisi için):

Katılmam beklenen çalışmanın amacını, nedenini, katılmam gereken süreyi ve yeri ile ilgili bilgileri okudum ve gönüllü olarak çalışma süresince üzerime düşen sorumlulukları anladım. Çalışma ile ilgili ayrıntılı açıklamalar sözlü olarak araştırmacı tarafından yapıldı. Bu çalışma ile ilgili faydalar ve riskler ile ilgili bilgilendirildim.

Bu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcının (Islak imzası ile)

Adı-Soyadı:  
İmzası:

Araştırmacının

Adı-Soyadı:  
e-posta:  
İmzası:

Tarih:.....

### EK 3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu (Fetal Örnek İçin)

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
EĞİTİM BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ETİK KURULU

#### BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Bu formun amacı katılmanız rica edilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek ve katılmanız ile ilgili izin almaktır.

Bu kapsamda “İmmün Olmayan Hidrops Fetalis Olgularında Tüm Ekzom Sekanslama İle Aday Genlerin Tespiti” çalışması gönüllü katılımcılarla yürütülmektedir. Araştırma sırasında sizden alınacak bilgiler gizli tutulacak ve sadece araştırma amaçlı kullanılacaktır. Araştırma sürecinde konu ile ilgili her türlü soru ve görüşleriniz için aşağıda iletişim bilgisi bulunan araştırmacıyla görüşebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmama hakkınız bulunmaktadır. Aynı zamanda çalışmaya katıldıktan sonra çalışmadan çıkabilirsiniz. Bu formu onaylamanız, araştırmaya katılım için onam verdiğiniz anlamına gelecektir.

Rutin genetik testler ile tanı konulmamış immün olmayan hidrops fetalis olgularına tanı konulması amacıyla tüm ekzom dizileme çalışılmaktadır. Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda çalışılan fetal örnek ve ebeveynlerine ait tespit edilen genomik değişimler analiz edilmekte ve rapor hazırlanmaktadır. Yapılması planlanan bu çalışmada tespit edile bu genomik değişimler kullanılarak tanı alan hasta sayılarının ve hangi genlerde değişimler olduğu belirlenecek, tanı alamayan hastalarda ise literatür ve in-silico analiz olarak isimlendirilen bilgisayar analizleri kullanılarak aday gen ve değişimler saptanmaya çalışılacaktır. Araştırma Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafında yürütülecektir. Beklenen toplam gönüllü sayısı 10 olmak ile beraber bu sayının değişmesi muhtemeldir. Araştırma 01.06.2021- 01.08.2021 tarihleri arasında iki ay sonunda sonuçlanacaktır. Araştırma sonucunda bulunan bulgular aşağıda belirtilecek kişinin kendi isteği doğrultusunda kişi ile genetik danışma eşliğinde paylaşılacak/paylaşılmayacaktır. Araştırmanın gönüllüler açısından herhangi bir riski bulunmamaktadır. Araştırmaya katılan gönüllülerden herhangi bir ücret alınmayacak ayrıca araştırma masrafları herhangi bir şekilde gönüllünün sosyal güvenlik kuruluşuna yansıtılmayacaktır.

#### Çalışmaya Katılım Onayı (fetal materyal için):

Katılmam beklenen çalışmanın amacını, nedenini, katılmam gereken süreyi ve yeri ile ilgili bilgileri okudum ve gönüllü olarak çalışma süresince üzerime düşen sorumlulukları anladım. Çalışma ile ilgili ayrıntılı açıklamalar sözlü olarak araştırmacı tarafından yapıldı. Bu çalışma ile ilgili faydalar ve riskler ile ilgili bilgilendirildim.

Bu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

#### Katılımcının (Islak imzası ile)

Adı-Soyadı:  
İmzası:

#### Araştırmacının

Adı-Soyadı:  
e-posta:  
İmzası:

Tarih:.....

## EK 4. Veri Kayıt Formu

### Veri Kayıt Formu

Babanın:

Yaş:

Özgeçmiş:

Geçirdiği operasyonlar:

Kronik hastalıklar

Kullandığı İlaçlar:

Soygeçmiş:

Genetik tetkik sonucu(varsa):

Annenin:

Yaş:

Özgeçmiş:

Geçirdiği operasyonlar:

Kronik hastalıklar:

Kullandığı İlaçlar:

Soygeçmiş

Genetik tetkik sonucu(varsa):

Fetüs ile ilgili bilgiler:

Annenin Gravida/Para/Abort bilgisi:

Başvuru Anında CRL ye göre haftası:

Ultrasonografi bulguları:

İkili / Üçlü Tarama testi Sonuçları:

Parental akrabalık:

Tüm Ekzom Sekanslama Tespit Edilen Varyantlar

Gen

Değişim

Benign / Muhtemel Benign / VUS / Muhtemel Patojenik / Patojenik

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.
- 11.
- 12.
- 13.
- 14.
- 15.
- 16.
- 17.
- 18.
- 19.
- 20.
- 21.
- 22.
- 23.