

Güncel Prenatal Tanı Teknikleri ve Uygulamaları

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Uz. Mehmet FİDANBOY

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Turgay BUDAK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ	
MEDİTEZYEN KÜTÜPHANESİ	
Denirbaş No.	38189
Tasvir No.	618.22
	F11
	1999

2007 / 2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

M
6

T E Ş E K K Ü R

Gerek yetişmemde, gerek çalışmalarım süresince büyük yardım ve desteklerini gördüğüm, ilgi duyduğum prenatal tanı konusundaki laboratuvar çalışmalarım ile yüksek lisans öğrenciliğim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu çalışmanın ortaya çıkmasında bana yol gösteren D.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı ve Prenatal Tanı Merkezi Kurucusu sayın Prof.Dr.Turgay BUDAK'a,

Çalışmalarım süresince yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm sayın Prof.Dr.Ali KELLE'ye,

Çalışmalarım süresince bana büyük emeği geçen ve tezimin hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın Yrd.Doç.Dr.M.Nail ALP'e,

Çalışmalarım sırasında işbirliği içinde olduğum ve sürekli yardım ve desteklerini gördüğüm Araş.Gör. sayın Ayşegül BENGİSU'ya, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. sayın Murat YAYLA'ya ve Uz.Dr. sayın Ahmet YALINKAYA'ya, Anabilim Dalımız Araş. Görevlisi sayın Nurcan ARAS'a, Araş.Görevlisi sayın Selahattin TEKEŞ'e, Araş.Görevlisi sayın Hilmi İSİ'ye, Araş.Görevlisi sayın Diclehan ÖKTÜREN (ORAL)'a ve tüm mesai arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Uz. Mehmet FİDANBOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ.....	1 - 13
GEREÇ ve YÖNTEM.....	14 - 37
BULGULAR.....	38 - 50
TARTIŞMA.....	51 - 53
SONUÇ.....	54
ÖZET.....	55 - 56
KAYNAKLAR.....	57 - 61

G İ R İ Ş

Yeni buluşlar, hayat olayları hakkındaki bilgilerin yeniden gözden geçirilmesini gerektirmiştir. En yaygın gelişmelerden biri, hücrenin yapı ve işlevini anlamaya yönelik ilginin belirgin şekilde artması ve yaklaşımın gittikçe moleküler düzeyde olmasıdır. Hücre yapısının organizasyonu ve işlevi arasında birliğin bulunması gereği gittikçe daha açık şekilde ortaya çıkmaktadır. Özellikle kalıtsal kontrol ve metabolizmanın kontrolünde işgören moleküler olaylarla ilgili olarak bakterilerden insana kadar bütün şekilleri için ortak olan görüntüler belirlenmeye başlamıştır. Böylece biyolojik olayların moleküler düzeyde açıklanması için yapılan çalışmalardan " Genetik " olarak bilinen bilim dalı gelişmiştir.

Genetiğin babası sayılan Mendel'in ve diğer birçok araştırmacının yaptıkları deneyler sonucu canlıların tüm özelliklerinin kuşaktan kuşağa "Gen " adı verilen maddelerle taşındığı bilinmektedir (8).

Yeryüzünde yüzbinlerce canlı türünün birbirinden farklı olmasını sağlayan en önemli faktör, türe özgü kromozom sayısı ve kromozomlar üzerindeki genlerin sayı ve içerdikleri nükleotid dizilişlerindeki farklılıktır. Kromozom sayısı aynı olsa bile her türün kromozomlarındaki gen içeriği farklıdır. Hücre nükleusunda bulunan hayatın ve canlılığın sırrı DNA adı verilen genetik materyalin yapısında yer alan dört bazın (A,G,T,C) milyonlarca değişik dizilişinde ve her dizilişin belirli anlam ifade edişinde gizlidir (22).

Moleküler genetik alanındaki yeni araştırma yöntemi olarak kısa süre önce yerini almış olan " Gen Klonlama Sistemleri " ve " Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) " DNA haritalarının çıkarılması çalışmalarına katkılarıyla moleküler genetik çalışmalarda derin sayılabilecek bir süreci başlatmıştır (48). Kalıtsal madde değişimi kapsayan " Mutasyon " dediğimiz olay, DNA'da nokta mutasyonlardan kromozom düzensizliklerine kadar değişik düzeylerde kendisini gösterebilmektedir. Bu değişim tamir olgularıyla eski şekline dönebildiği gibi tamir işlerinde kusurlarda mutasyona sebep olabilirler. Mutasyonlardan bazıları sessiz bir şekilde kalırlarken, bazıları doğaya daha uygun tiplerin seçimine olanak verirler. Diğer yandan ağır seyreden mutasyonlar canlının yaşama şansını tamamen yok edebilirler.

Prenatal Tanı

Rahatsızlıkların doğum öncesi dönemde erken tanınması ve mümkünse önlenmesi amaçlarına yönelik girişimleri ifade eder. Prenatal tanıda esas düşünce, anomalili fetüsü barındıran bir gebeliği sonlandırılması değildir. Ana amaç; bebeklerinde tedavisi olanaksız, yaşam boyu ciddi bedensel ve zihinsel özüre neden olabilecek hastalık riski yüksek olan çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olma şansının artırılmasıdır. Tedavisi mümkün olmayan bir hastalığın söz konusu olduğu gebeliklerde ise aile gebeliğin sonlandırılması arzu edebilir. Böyle bir isteğin etik olarak uygun olabilmesi ve en az komplikasyon riski ile gerçekleştirilebilmesi için prenatal tanının mümkün olan erken gebelik haftalarında ve kesin olarak yapılabilmesi temel prensiptir.

Prenatal tanıda ifade edilen doğum öncesi dönem, sadece gebelik sürecini içermez. Doğumun planlandığı ilk andan itibaren gebelik ile ilgili hazırlıklarının başlaması gereklidir. Gebelik bu sürecin sadece bir parçasıdır.

Prenatal dönemin bu özelliği gerek sağlık personeli gerekse toplum tarafından çok fazla anlaşılmamıştır. Özellikle ülkemizde gebelerin hemen hemen tamamının gebelik ilerledikten sonra ve hatta doğum anında hekime başvurdıkları düşünüldüğünde toplumun gebelik ve öncesi konusunda daha iyi bilgilendirilmesi gerektiği açıktır.

Prenatal tanı girişimleri multipliner bir yaklaşımı gerektirir. Bu çalışma içinde kadın-doğum uzmanı, genetisyen, pediatri, çocuk cerrahı, diğer cerrahi branşların uzmanları, fizyoterapist, sosyal hizmet uzmanı, psikoloğ ve laboratuvar branşları yer almalıdır. Bu ortak çalışma içinde ultrasonografistin sorumluluğu oldukça fazladır. Son zamanlarda, gerek ultrasonografik görüntülerin kalitesindeki artış gerekse bu konudaki deneyimlerin artması ile daha başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır.

Prenatal Tanı Endikasyonları

Doğumsal anomalilerin farklı nedenleri olabilir. Fetüsteki patolojiler kromozomal düzeyde, gen düzeyinde, biyokimyasal düzeyde, serolojik düzeyde veya hematolojik düzeyde kendini belli edebilir (41, 47).

Fetüsün risk altında olduğu ve prenatal tanının yapılmasının gerektiği durumlar gebelik öncesinde veya gebelik sırasında ortaya çıkabilir. Prenatal tanı endikasyonları genetik amaçlı olabileceği gibi intrauterin enfeksiyonlar veya fetal kan hastalıkları gibi hastalıklar da prenatal tanı endikasyonu oluştururlar (Tablo1). Sık görülmesi, prognozunun kötü olması ve henüz tedavi olanağının olmaması nedeniyle prenatal tanı endikasyonları içinde ilk sırayı genetik hastalıklar alır (44).

Tablo 1. Prenatal Tanı Endikasyonları

Öyküde

İleri anne yaşı

Önceki çocukta kromozom düzensizliği

Anne veya babanın dengeli kromozom düzensizliği taşıyıcısı olması

Ailede kalıtsal metabolik hastalık öyküsü

Ebeveynlerde gen mutasyonu taşıyıcılığı olması

Öyküde iki veya daha fazla spontan abortus

Ebeveynlerde gen mutasyonu taşıyıcılığı olması

İntrauterin enfeksiyonlar

Gebelik sırasındaki izlem muayenelerinde

Maternal serum biyokimyasal taramalarında (ikili test-üçlü test gibi) yüksek risk

Patolojik ultrasonografik bulgusu (fetal anomali, şiddetli gelişme geriliği gibi)

Doğumsal anomali nedenlerinden birisi akraba evlilikleridir. Özellikle ülkemizin de aralarında olduğu bazı ülkelerde akraba evlilikleri oldukça yaygındır. Bu evliliklerin sonucunda konjenital anomali sıklığının arttığı bilinmektedir. Bu durum sonuçta önemli toplumsal ve ekonomik sorunlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde akraba evliliklerinin önlenmesi konusunda çeşitli kuruluşlarca başarılı çalışmalar yapılmasına rağmen sorun henüz çözüme ulaşmaktan uzaktır. Şüphesiz sorun sadece akraba evliliklerinden

kaynaklanmamaktadır. Çeşitli kalıtsal hastalıklar, ileri yaş gebelikleri gibi ciddi medikal sorunlar, gebelik sırasında teratojenik ilaç kullanımı, fetal kan hastalıkları, tekrarlayan düşük veya erken doğumlar, intrauterin veya yenidoğan döneminde nedeni bilinmeyen bebek kayıpları vardır. Fetal kan, korionik villüsler, amniotik sıvı, fetal karaciğer veya cilt biyopsi materyalinde özellikle PCR teknolojisi ile DNA düzeyinde incelemelerin mümkün hale gelmesi fetal dokularda tanısı konulabilen hastalık sayısını hızla artırmaktadır (51).

Prenatal Tanı Teknikleri

Risk altında olan gebeliklerde fetüsün değerlendirilmesine yönelik direkt veya indirekt tetkik yöntemleri mevcuttur. Direkt incelemede invaziv teknikler kullanılmaktadır. İndirekt incelemede ise non-invaziv teknikler kullanılır (Tablo 2).

Tablo 2. Prenatal Tanıda Direkt (invaziv) ve İndirekt (non-invaziv) Teknikler

İnvaziv teknikler

Amniosentez (AS)

Erken Amniosentez (eAS)

Koryon Villus Örnekleme (CVS)

Fetal Kan Örnekleme (Kordosentez) (KS)

Fetal Doku Örnekleme (FTS)

Non-invaziv teknikler

Ultrasonografi (USG)

Maternal Dolaşımında Fetal Hücreler

Biyokimyasal Marker Taramaları

Uygulanabilecek prenatal tanı teknikleri gebelik yaşına göre farklıdır. Korionik villus biyopsisi sıklıkla ilk trimesterde kullanılırken, amniosentez, kordosentez gibi yöntemler ikinci trimesterde uygulanan klasikleşmiş yöntemlerdir (34, 36, 44).

İnvaziv teknikler ile elde edilen fetal hücrelerde veya alınan sıvılarda fetüsü temsil ettiği düşünülen korial hücrelerde yapılabilecek tetkikler endikasyonlara göre farklılık gösterir (Tablo 3). Daha sıklıkla uygulanan bir tetkik yöntemi olan kromozom incelenmesinde sayısal ve yapısal sapmalar klasik bantlama tekniklerine göre araştırılır. Son zamanlarda gündeme gelmeye başlayan FISH (floresan in situ hibridizasyon) tekniğinde de sayısal ve yapısal anomaliler oldukça başarılı şekilde ortaya konabilmektedir. DNA ve enzimatik çalışmalar ise daha güç olup PCR gibi özel teknikler gerektirirler.

Tablo 3. Endikasyonlara Göre Tercih Edilecek Analiz Yöntemleri

<u>Endikasyon</u>	<u>Analiz</u>
İleri anne yaşı	Kromozom
Eşlerden birinin dengeli translokasyon taşıyıcısı olması	Kromozom
Önceki çocuklarda kromozom anomalisi	Kromozom
İki yada daha fazla abortus öyküsü	Kromozom
Maternal serumda anormal üçlü test sonucu	Kromozom
Patolojik ultrason bulgusu	Kromozom
Akrabalık öyküsü	DNA
Ailede hemoglobinopati öyküsü	DNA
Ebeveynlerde gen mutasyonu taşıyıcılığı olması	DNA
Ailede kalıtsal metabolik hastalık öyküsü	DNA/Enzimatik

Genetik Hastalıklarda Prenatal Tanı

Genetik hastalıklar etkili oldukları düzeye göre 5 ana grup oluştururlar. Genetik hastalıklara yol açan bazı problemler kromozomal düzeydeki düzensizliklere bağlı iken, hastalıklar da kromozomları oluşturan DNA düzeyindeki hatalara bağlıdır. Önemli bir grup hastalık ise multifaktöriyel geçiş gösterir (Tablo 4).

Tablo 4. Genetik Hastalık Grupları

Tek gen düzensizlikleri

* Kromozomal düzensizlikler

Multifaktöriyel düzensizlikler

Mitokondrial düzensizlikler

* Mitokondrial DNA düzensizlikleri

Somatik hücre mutasyonlarından kaynaklanan düzensizlikler

Genetik yapılanma ile ilgili sorunlar konsepsiyon döneminde başlamaktadır. Oluşan kromozom anomalilerinin çoğunluğu letaldır ve gebeliklerin hemen başında abortus ile sonuçlanmaktadır. Fertilize olmuş ovumların %60-80 oranında implante olamadan veya erken implantasyon döneminde asemptomatik olarak kaybedildiği bilinmektedir (3). Gelişmiş ülkelerdeki çocuk ölümlerinin yaklaşık yarısında genetik hastalıkların sorumlu olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde hastanede yatan çocukların 1/3'ünde genetik problem vardır. Toplumdaki tüm çocukların % 0.3-0.4 kadarı mental

retarde olup bunların büyük bir bölümünden genetik hastalıklar sorumludur. İleri yaş populasyonlarında ise genetik temeli olan kronik hastalıklar erişkinlerin % 10-20'sini etkiler. Yirmibeş yaşındaki kişilerin % 5'inde ise direkt genetik veya genetik kısmı baskın olan rahatsızlıklar olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak; günümüzde tüm yaşlarda görülen bir çok hastalığın altında genetik sorunlar yatmaktadır (3). Tüm hastalıklar dikkate alındığında tanısı konabilen genetik hastalıkların sayısı azdır. Ancak günümüzde Tıbbi genetikteki hızlı ilerleme sonucu tanısı konabilen hastalık sayısı, bunun sonucunda hastalık riski olan ailelere yardım imkanı ve risk altındaki fetüsün kromozom yapısı belirlenerek bu ailelere sağlıklı bebek sahibi olma şansı verilmektedir.

Prenatal Tanı Yöntemleri

Günümüz teknolojik alanlarındaki hızlı gelişmelere paralel olarak; insan kromozomları, prenatal tanıda da fotal hücrelerde aranmıştır. 1974'te Williamson ve arkadaşları (52) tarafından amniotik sıvıdaki fotal hücrelerde, 1980'de Amnionda fotal deride ve koryonik membranda X-Kromatin testi yapmışlardır. 1982'de fotal dokularda mozaizm, 1983'te ilk trimestride koryon villus biopsisinde genetik hastalıkların prenatal tanıda rutin çalışmalarda tespiti ve 1984'te ise koryon villi analizi çalışmalarına geçilmiştir (2, 47, 49). Sekiz haftaya ulaşmış gebeliklerde, CVS, Amniosentez, Fetal Kan Örneklemesi, Fetoskopi ve Fetal Doku Örneklemesi, Ultrasonografi ve Maternal Serum incelenmesi ile prenatal tanı yapılabilir (20,25,26, 33). Villus örneklerinden, amniotik sıvı hücrelerinden ve fotal kandan sitogenetik veya kromozom analizi mümkündür (7, 13, 17, 23, 38).

Riskli gruba prenatal tanı uygulamadan önce laboratuvarlardan veya merkezlerden belirli standartlar beklenmeli ve istenmelidir.

a) Tanı örneğinin, geçerli ve güvenilir bir şekilde tanımlanmaması. Kültür sıvısının değiştirilmesi veya ekim esnasında kontamine olmuş plastik veya cam laboratuvar malzemenin kullanılması, teknik hatalar ve dikkatsizlik hamileliğin yanlışlıkla sonlandırılmasına neden olabilir. Doku kültürü her olgu için titiz ve uzun sabır gerektiren işlemlerdir.

b) Doku kültürü yöntemlerinin başarısında, teknik araç ve gereçlerin kalitesi, kullanım kolaylığı ve sterilizasyonu çok önemli bir etkindir.

c) Sonuçların uygun süre içinde elde edilebilmesi çok önemlidir. Amniosentez, gebeliğin 16-18 haftalarında uygulanır, sitogenetik sonuçlar 10-21 gün içerisinde, CVS 8. haftadan sonra uygulanmalı, sonuçlar 48 saat ila 16 gün arasında, fetal kordosentez ise 19. Haftadan itibaren uygulanır ve sonuçlar 48-72 saatte alınabilmelidir. Eğer, fetal karyotipi oluşturmak 4 hafta veya daha fazla sürüyorsa; klinisyen ve araştırmacı nedenini araştırmalıdır.

d) Sonuçların değerlendirilmesi, ancak deneyimli sitogenetik bilgisi olan uzman kişilerce sağlanmalı.

e) Gerektiğinde ileri genetik çalışmalar için elde bulunan olanaklar kullanılmalı.

f) Genetiksel nedenlerle sonlandırılacak gebeliklerde tanının doğrulanması ve takip çalışmaları yapılmalıdır.

g) Kayıtların gizliliği, etik ve yasal kurallar, doğum öncesi tanıda araştırmacı için büyük sorumluluk getirmektedir. Araştırmacı prenatal tanıdaki bilgilerin tıbbi amaç dışında kullanılmasına engel olmalıdır. Elde edilen

sonuçları çok iyi değerlendirilmeli normal bir hamileliğin sonlandırılmasına neden olunmamalıdır.

Koryon Villus Örneklemesi (CVS = Chorionic Villus Sampling)

Koryon villusların erken gebelik haftalarında tüm gebelik kesesini sarmalarına karşın 7'nci haftadan itibaren *koryon frondosum* ve *koryon leve*'ye ayrılırlar. Bunlardan koryon leve hücreleri dejenere olurken koryon frondosum plasentayı geliştirir (8, 30, 49).

Koryon villus örneklemesi, 15 yıldan daha uzun bir süredir, I. Trimesterde Prenatal tanı (PNT) amacıyla başarıyla kullanılan bir tekniktir. Gebeliğin daha ileriki dönemlerinde prenatal tanıda kullanılır olmasına karşın, fetal sitogenetik, moleküler ve biyokimyasal hastalıkların tanısında süratle birincil tanı aracı haline gelmiştir. Bunlara ek olarak, sınırlı plasental mozaizm ve unipaternal disomi gibi bir çok biyolojik sürecin aydınlatılmasını da sağlamıştır. Gelişen plasentadan villus dokusunun örneklenmesi ve analizi yaklaşık 25 yıl önce Çin'li araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (18) Bu araştırmacılar gebeliğin ilk trimesterinde fetal cinsiyet saptamak amacıyla ince bir kataterle serviksten bir miktar amnion ile villus dokusunu aspire edip, materyaller sex kromatin açısından değerlendirmişlerdir. Daha sonra gelişen tekniklerle materyal alma kolay hale gelmiştir (50). Bir çok olguda hasta yada hekimin tercihi kullanılacak yaklaşımı belirler. Ancak bağımsız merkezlerden gelen birçok rapor, CVS'in güvenli bir metod olduğunu ve düşük gebelik kayıp oranları taşıdığını göstermiştir (2, 14).

Koryon villus aspirasyonu, rutin uygulamaya başlandığı 1983 yılından itibaren, henüz fikir birliğine varılmamış bazı çekincelere karşın, prenatal tanıda hızla gelişen önemli uygulama alanı bulmuştur. Aspirasyon işlemi ultrasonografi (USG) eşliğinde transervikal ve transabdominal yolla iyi eğitim görmüş kadın-doğum uzmanı tarafından 9-11. haftalarda uygulanır (27, 30). Aspire edilen örneğin bir kısmı kromozom analizi için, bir kısmı ise fetustaki DNA analizi ile metabolik hastalıkların tanısında kullanılır.

Kromozom analizi için, direkt yöntem kullanılarak 1-2 gün içerisinde ya da uzun süreli kültür kullanılarak 2-3 hafta içerisinde sonuç alınır (27, 30). Villusların ayırımı-arındırılması, deneyimli ve sitogenetik sonuçların sorumluluğunu taşıyan bir uzman kişi tarafından yapılmalıdır. Maternal hücre kontaminasyonlarına karşı en az iki flask besi ortamına ekilmelidir. Her olgu için hem direkt hem de hücre kültürü yöntemi beraber uygulanmalıdır. Mozaik ve diğer tereddütlü olgulardaki sonuçların doğruluğunun kontrolü için amniosentez yapılmalıdır. Mozaik bulguyu atlamamak için en az 20 metafaz plağı analiz edilmelidir.

Amniosentez (AS , Amniocentesis)

Daha önceleri araştırma amacıyla kullanılan amniosentez (AS) ve CVS, artık obstetrik incelemelerin ana komponentleri haline gelmiştir. 1950'lerde işlemin tanısal yeterliliği ortaya konabilmiştir. 1952'de Bevis (9) Rh izoimmunnizasyonun ciddiyetinin tahmininde amnion sıvısının spektrofotometrik analizinin kullanılabileceğini göstermiştir. Serr ve arkadaşları(39), Fuchs ve Riis (19) antenatal cinsiyetin saptanmasında amniosentezin kullanımını ilk olarak bildirmişlerdir. 1966'da Steele ve Breg

(42), PNT amacıyla AS'i kullanmış ve amniotik hücreleri kültür ortamında hazırlayarak karyotip analizini gerçekleştirmişlerdir.

1985'ten sonra 15 veya daha önceki gebelik haftalarında AS uygulanmasına ait teknik komplikasyon ve kaygılara yer olmadığını gösteren bir rapor yayınlanmıştır. PNT amaçlı sıklıkla uygulanan bir tekniktir, ancak I. Trimesterde prenatal tanıya olan talep, erken amniosentez (eAS) ve CVS uygulamalarında artışa neden olmuştur.

Genetik amaçlı amniosentez için, günümüzde gebeliğin 16-18 haftalar arasında USG eşliğinde transabdominal yolla 20-22 gau'luk spinal iğne uygulanarak amniotik mayi alınır. Erken amniosentez ise 10-14. gebelik haftaları arasında yapılmaktadır. Ortalama olarak 15-20 ml kadar alınan amniotik sıvı en yakın genetik merkezde rutin işleme alınmaktadır. Sonuç mutlaka 24'ncü haftaya kadar alınarak karar verilmelidir. Bu süreye dikkat edilmediği takdirde terapötik abortus süresi geçirilmiş olabilir (30).

Amniosentez yapılmadan önce, amniosentez endikasyonu konmuş olan anneye ve eşine durum iyice anlatılarak yazılı izinleri kesinlikle alınmalıdır (30, 47).

Kordosentez (KS, Cordosentesis)

Son yıllarda obstetrik teknik ve USG teknolojisindeki gelişmelerle fetal dolaşıma erişim artık çok daha kolay hale gelmiştir. 1983'te Daffos ve arkadaşları (16) tarafından fetal umbilikal kan örnekleme hakkında ilk klinik bildiri sunulmuştur. Bu gün bu teknik kordosentez yada perkutan umbilikal kan örnekleme (PUBS) olarak bilinmektedir. Günümüzde fetal dolaşıma erişim için kullanılan metodlar arasında kordosentez, II.trimesterden terme kadar

uygulanabilir olması, düşük fetal kayıp oranı, relatif teknik kolaylığı ve elde edilen kan örneklerinin saflığı avantajı ile tercih edilen metoddur (19,42). CVS ve amniosentez uygulama ve USG bilgisi olan kadın-doğum uzmanı tarafından umbilikal ven ponksiyon ile uyumlu plasentaya spinal iğne uygulanarak, heparinize enjektöre 1-2 ml fetal kan çekilir. En yakın genetik merkezine gönderilir. Kültür işleminde 72 saat tutulur. 3-5 gün içerisinde de her olgu için uygun tanı konulabilecek 10-15 metafaz incelenerek tanı konulur (30).

GEREÇ VE YÖNTEM

A. GEREÇ

1997-1998 yıllarında, prenatal tanı endikasyonu olan gebelerden sitogenetik çalışma için Anabilim dalımıza gönderilen, 12'si CVS , 101'i Amniyosentez ve 45'i Kordosentez yöntemiyle olmak üzere elde edilen toplam 158 fetal örnekte kromozom analizi yapılmıştır.

1. Kullanılan Kiyasal Maddeler

- a) CDM -Chromosome Diagnostic Medium (Sigma C-8197)
- b) Nutrient Mixture F 10 Ham's (Sigma N-6015)
- c) Fetal Bovin Serum (Sigma F-4135)
- d) PHM-L (Seromed M-5030)
- e) Demacalcine (Sigma D-1925)
- f) KCl
- g) Glacial Acetic Acid (Merck)
- h) Methanol (Merck)
- i) Xylol (Merck)
- j) Giemsa Stain Stock Solution (Sigma G--3032)
- k) Heparin (Liquephine, Roche)

- l) Etil Alkol (% 96, Tekel)
- m) Serum Fizyolojik (Bacter)
- n) Trypsin 1:250 (Sigma T-4799)
- o) Trypsin-EDTA Sol (Sigma T-3924)
- ö) Sodium Phosphate (Na_2HPO_4) (Sigma S-0876)
- p) Potassium Phosphate (KH_2PO_4) (Sigma P-5379)
- r) Distile Water (Sigma W-3500)
- s) Collagenase V-steril (Sigma C-2674)
- ş) Ethidium Bromide 1 gr (Sigma. E-8751)
- t) Basal Medium (Sigma B-1522)
- u) L-Glutamin (Sigma L-7513)
- ü) Penicillin-Streptomycin (Sigma P-4333)

2. Kullanılan Solüsyonlar

- a) Hipotonik Solüsyonu (0.075 M KCl)
- b) Stok Tespit Solüsyonu (Fiksatif)

3 Kısım Methanol : 1 Kısım Glacial Acetik Acid

- c) Fitohemaglutinin Solüsyonu

PHM - L 5 mg + 5 ml Distile Water

- d) Söransan Tampon

11.88 gr Na_2HPO_4 + 1000 ml Distile Su

9.08 gr KH_2PO_4 + 1000 ml Distile Su (pH 6.8)

- e) Boya Solüsyonu

95 ml söransan tampon + 5 ml Giemsa Stock Solution

f) Tripsin Solüsyonu

50 mg Tripsin + 100 ml İzotonik Solüsyon

g) Tespit Solüsyonu (%50)

50 ml Stok Tespit Solüsyonu + 50 ml Distile Su

h) Giemsa (direkt boyama için)

5 ml Giemsa Stain Stock Solution + 95 ml Distile Su

ı) Tripsin Solüsyonu (Giemsa Bantlama İçin)

0.1 gr Tripsin 1 : 250 + 100 ml İzotonik Solüsyonu

i) Asetik Asit Solüsyonu (%60)

60 ml Glacial Acetic Acid + 40 ml Distile Su

j) İbramow Solüsyonu

92 ml Distile Su + 5 ml Glacial Asetic Acid + 3 ml Methanol

j) Ethidium Bromide Solüsyonu

1 ml Ethidium Bromide + 9 ml Nutrient Mixture F 10 Ham's

k) Kollagenaz V Solüsyonu

5 mg Collagenase V + 5 ml Nutrient Mixture F10 Ham's

3. Kültür Ortamları**a. CVS ve Amniosentez İçin**

100 ml Basal Medium (CDM) + 2 ml Suplement

+ 1 ml Penicillin - Streptomycin

b. Kordosentez İçin

100 ml Nutrient Mixture F10 Ham's

+ 18.5 ml Fetal Bovin Serum

+ 1.5 ml Penicillin - Streptomycin

4. Aygıtlar ve Gereçler

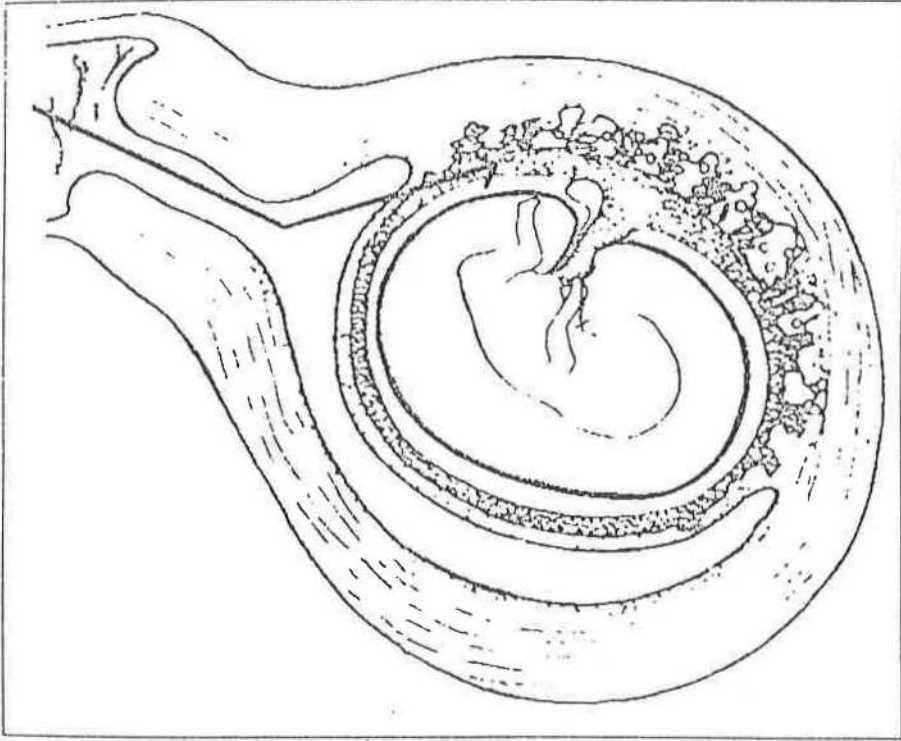
- a) Cytovision Ultra (Karyotyping and FISH Workstation-
Applied Imaging)
- b) Mikroskop [Light (Nikon) ve İnvert Phase Contrast (Olympus)]
- c) Suplination Full Color Printer (Mitsubishi)
- d) Zaman ayarlı santrifüj (Hettich Üniversal II)
- e) Kuru Hava Sterilizatörü (Köttermann)
- f) Değişik çapta enjektörler
- g) Dikey Şaleler (100 ml)
- h) Steril Cam ve plastik pipetler (5,10,15 ve 20 ml)
- ı) 15 ml Steril Plastik Santrifüj Tüpü (Sigma C-3048)
- i) Kültür Flaskı (70ml, 25cm²) (Sigma C-7046)
- j) Petri kapları (5, 10 ve 15 ml)
- k) Mezürler
- l) Traşlı Lam
- m) 0.2 µ Sartorius Filtre
- n) CO₂ 'li Etüv (Heraeus)
- o) UV lamba
- ö) UV'li Laminar Air Flow (Clan Laf VFS 1806)
- p) pH Metre (Consort P-107)
- r) Hot Plate (Jencons)
- s) Vortex (Jencons)

B. YÖNTEM

PRENATAL TANIDA KROMOZOM ELDE ETME YÖNTEMLERİ

I. Koryon Villus Örneklemesi (CVS)

Gebeliğin 8-12 haftaları arasında önce plastik bir katater yardımı ile transservikal yolla *chorion frondosum*'dan elde edilen villus materyalinden kromozom analizi yapılmaktadır (30, 32, 37) (Şekil 1).



Şekil 1. Transservikal CVS Girişimi

Direkt ya da Hücre Kültürü Yöntemi uygulanabilir. USG kontrolü altında serumsuz heparinize edilmiş Nutrient Mixture F 10 Ham's besi ortamı içeren 20 ml'lik enjektöre aspire edilen en az 10 mg doku, steril plastik petri kabına boşaltılır. Doku kültürü mikroskobu (Invert Phase Contrast) altında incelenir. Kandan arındırılmış dokunun yeterli olup olmadığına bakılır. Yeterli ise kromozom analizi için direkt ya da hücre kültürü yöntemi uygulanır.

1. Direkt Preparasyon

- a) En az 5 mg. doku, medium (Ham's F 10) ortamında en az bir defa kandan arındırılarak iğne ucu ile parçalanır. 1-2 saat 37° C 'de etüvde bekletilir. Final konsantrasyonu 0.04 µg/ml olacak şekilde demacalcine' den iğne ucu çıkarılmış 2'lik enjektör ile 1 damla damlatılır, 3 saat 37° C' de etüvde bekletilir.
- b) Besi ortamı pasteur pipeti ile atılır. İğne yardımı ile villus örnekleri birbirinden ayrılması sağlanır. Üzerine 4 ml 0.075 M KCl ilave edilir. 20 dakika 37° C 'de etüvde bekletilir.
- c) Hipotonik solüsyon atılır. % 50'lik tespit solüsyonundan 3 ml ilave edilir dökelti atılır, 3 ml tespit solüsyonu eklenir, 10 dakika bekletilir.
- d) Dökelti atılır, villusların hafif kuruması beklenir, % 60'lık glassial asetik asit solüsyonundan 10 mg villus dokusu için 0.5 ml olacak şekilde ilave edilir.
- e) 15 dakika hücrelerin ayrışması beklenir ve doku kültürü mikroskopunda incelenir.
- f) Hot plate üzerinde bulunan 6-7 adet temiz lamdan her birine Pastör pipetiyle 2-3 damla hücre süspansiyonu damlatılır. L şeklindeki başka bir cam pastör pipeti ile hücrelerin yayılması sağlanır.
- g) Preparatlar 95° C'de yarım saat veya 37° C'de 3 gün bekletilerek, uygun boyama ve bant teknikleri uygulanır.

2. Hücre Kültürü Yöntemi

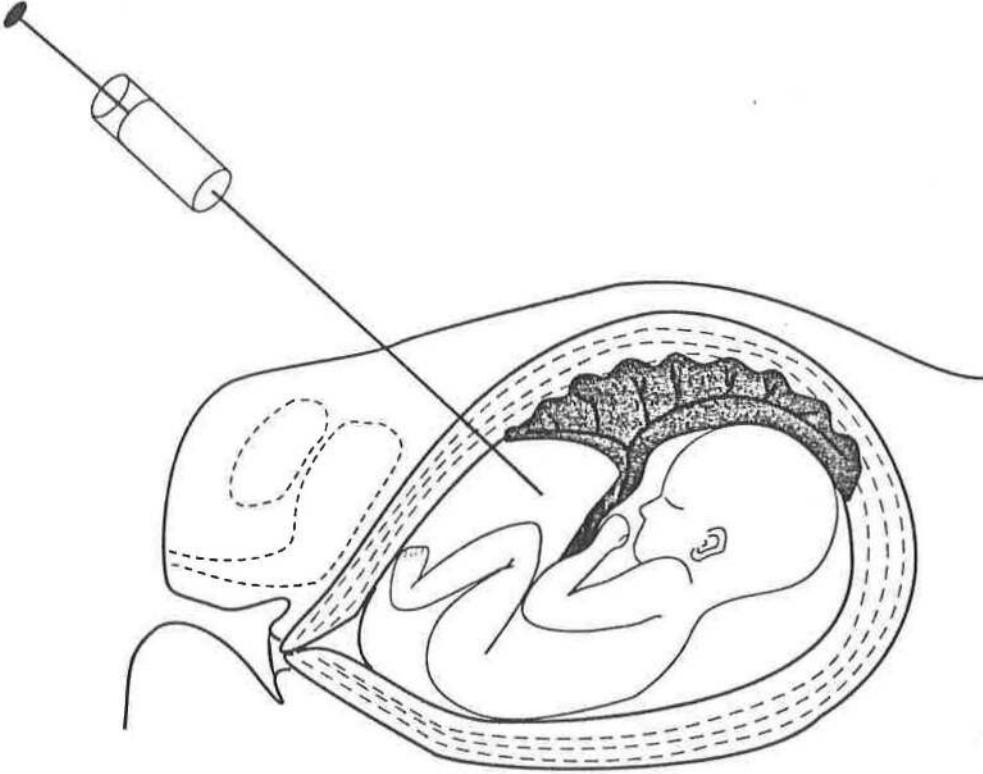
- a) En az 5 mg çok iyi arındırılmış villus dokusu, serumsuz Ham' s F10'nun bulunduğu steril petri kabına alınır.

- b) Steril iğne ile villi örnekleri küçük parçacıklara ayrılır. En az 3 kere mediumla yıkama işlemi yapılır.
- c) 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu içeren steril petri kutusuna pens yardımıyla aktarılır. 10-15 dakika 37° C'de bekletilir.
- d) Süre sonunda villuslar Kollagenaz V solüsyonu içeren 3 ml besi ortamına konur. Bisturi ucu veya iğne ucuyla küçük parçalara ayrılır. 10 dakika beklenir. Santrifüj tüpüne pasteur pipetiyle aktarılır. 1000-1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Dökelti atılır. 2 kez yıkama-santrifüj işlemi tekrarlanır.
- e) Çökelti üzerine villus ağırlığına göre 5 mg doku için 4 ml olacak şekilde 37°C'de ısıtılmış besi ortamı (CDM) ilave edilir. 2 adet Kültür Flaskı hazırlanır. Üzerine protokol, materyal, olgu adı ve tarih yazılarak hücreler aktarılır. 7 gün boyunca CO2'li etüvde dokunmadan bekletilir.
- f) Süre sonunda kültür ortamının ½ si kültür mediumu ile tazelenir. Doku kültürü mikroskobunda gerekli bilgiler kaydedilir. Yeterli üreme durumuna göre 2-3 günde bir kültür ortamının tamamı yenilenir.
- g) Süre sonunda doku kültürü mikroskobunda hücre üremesi kontrol edilir. Kültür flaskının 1/3'ü hücre ile dolduğunda, 10X büyütme alanda 4-5 mitoz gözleendiğinde 1 damla democolcine damlatılır. 1-1.5 saat 37°C'de etüvde bekletilir.
- h) Kültür flaskı tekrar doku kültürü mikroskobunda incelenir, hafifçe 2-3 çırpma işlemi yapılır. Besi ortamı temiz bir santrifüj tüpüne aktarılıp, flaska 1.5 ml tripsin-EDTA ilave edilir. 10 dk. bekletilir hafifçe yıkanır, bir önceki tüpe boşaltılır. Hücrelerin üzerine film tabakası olacak şekilde birkaç damla tripsin-EDTA damlatılır, 3-5 dk. bekletilir.

- k) Mikroskop altında hücrelerin birbirinden ayrıldığı gözlemlendiğinde, 2 ml medium ortama ilave edilir. Pipet ile hücreler tekrar bir önceki tüpe aktarılır.
- l) Kültür bir sonraki çalışmalar için besi ortamı ile yenilenerek CO₂'li etüvde en az iki gün bekletilir.
- m) Santrifüj tüpündeki hücreler hafifçe vortekslenir, 1200 rpm de 10 dk santrifüj edilir.
- n) Dökelti atılır, üzerine 8 ml hipotonik solüsyon ilave edilir. 15-20 dakika 37°C'deki etüvde bekletilir. Süre sonunda tekrar 10 dakika santrifüj edilir.
- o) Dökelti atılır, tüp hafif parmak darbeleriyle sarsılırken üzerine damla damla fiksatif damlatılarak hücrelerin birbirine yapışmaması sağlanır.
- p) 10 dakika santrifüj edilir. Aynı işlem fiksatif ile 2 kere daha yapılır
- (Gerektiğinde ilk fiksatifte bir gün +4°C'de bekletilebilir.)
- r) Yıkanmış hücre dökeltileri atılır ve üzerine 0.5 ml fiksatif eklenerek hafifçe ince uçlu pasteur pipetiyle pipetaj yapılır.
- s) Daha önce yıkanmış temizlenmiş 6-8 adet buzdolabında saklanmış lam çıkarılır, her nemli lama 45° lik açı ile 10 cm yukarıdan 1 damla damlatılır. Damlanın yayılması beklenir, gerektiğinde hafifçe üflenebilir. Doku kültürü mikroskopunda preparat incelenir, yayma işlemi gerektiğinde odanın nem ve sıcaklık durumuna göre tekrarlanır. En uygun oda sıcaklığı 20-25°C dir.
- t) Preparatların üzerine protokol ve sıra numarası, olgu adı ve tarih yazılır. Uygun boyama ve bant tekniği için oda ısısında preparat kutularında saklanır.

II. Amniosentez

- a) Gebeliğin 15-18. Haftalarında steril koşullarda, USG kontrolünde 21 gau'luk steril spinal iğne ile ortalama 15-20 ml amniotik mayi alınır (Şekil 2).



Şekil 2. Amniosentez Girişimi.

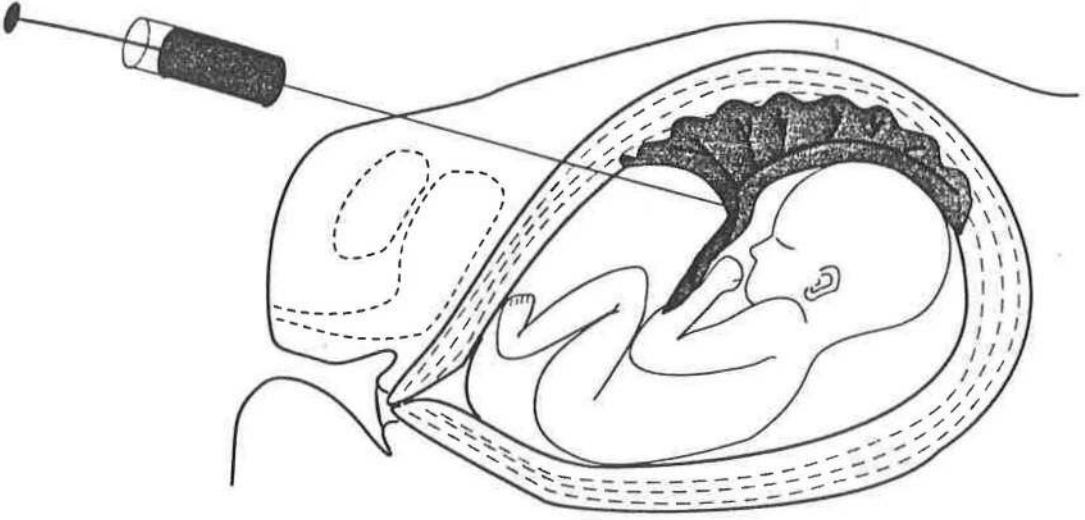
- b) Alınan amniotik mayi 15 ml'lik iki steril plastik santrifüj tüpüne boşaltılır.
- c) Tüpler 1000-1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- d) Dökelti gerektiğinde α -fetoprotein veya diğer tayinler için ayrılır.
- e) Çökelti üzerine 37°C'de ısıtılmış 5 ml besi ortamı ilave edilir. Steril plastik veya cam pastör pipeti ile köpürtülmeden hafifçe karışımı sağlanır.
- f) Daha önceden hazırlanmış olan kültür flasklarına isim, protokol no, tarih ve materyalin adı yazılır. Hücreler pipet ile aktarılır. Flaskların kapakları bir tur açık bırakılarak 37°C' de CO₂ ' li etüve konulur, bir hafta süresince dokunmadan bekletilir.

- g) Süre sonunda kültür ortamının 1/2 si kültür mediumu ile tazelenir. Doku kültürü mikroskopunda gerekli bilgiler kaydedilir. Yeterli üreme durumuna göre 2-3 günde bir kültür ortamının tamamı yenilenir.
- h) Süre sonunda doku kültürü mikroskopunda hücre üremesi kontrol edilir. Kültür flasksının 1/3'ü hücre ile dolduğunda, 10X büyütme alanda 4-5 mitoz gözleendiğinde 1 damla demacalcine damlatılır. 1-1.5 saat 37°C'de etüvde bekletilir.
- k) Kültür flasksı tekrar doku kültürü mikroskopunda incelenir, 2-3 hafif çırpma işlemi yapılır. Besi ortamı temiz bir santrifüj tüpüne aktarılıp, flaska 1.5 ml tripsin-EDTA ilave edilir. 10 dakika bekletilir hafifçe yıkanır. Bir önceki tüpe boşaltılır. Hücrelerin üzerine bir film tabakası oluşturacak şekilde birkaç damla tripsin-EDTA damlatılır, 3-5 dk. bekletilir.
- l) Mikroskop altında hücrelerin birbirinden ayrıldığı gözleendiğinde, 2 ml medium ortama ilave edilir. Pipet ile hücreler tekrar bir önceki tüpe aktarılır.
- m) Bir sonraki çalışmalar için besiy ortamı ile kültür yenilenir. CO₂'li etüvde en az iki gün bekletilir.
- n) Santrifüj tüpündeki hücreler hafifçe vortekslenir, 1200 rpm de 10 dk santrifüj edilir.
- o) Dökelti atılır, üzerine 8 ml hipotonik solüsyon ilave edilir. 15-20 dakika 37°C'deki etüvde bekletilir. Süre sonunda tekrar 10 dakika santrifüj edilir.
- p) Dökelti atılır, tüp hafif parmak darbeleriyle sarsılırken üzerine damla damla fiksatif damlatılarak hücrelerin birbirine yapışmaması sağlanır.
- r) 10 dakika santrifüj edilir. Aynı işlem fiksatif ile 2 kere daha tekrarlanır. (Gerektiğinde ilk fiksatifte bir gün +4°C'de bekletilebilir.)

- s) Yıkanmış hücre dökeltleri atılır ve üzerine 0.5 ml fiksatif eklenerek ince uclu pasteur pipetiyle hafifçe pipetaj yapılır.
- t) Daha önce yıkanmış temizlenmiş 6-8 adet buzdolabında saklanmış lam çıkarılır, her nemli lama 45 ° lik açı ile 10 cm yukarıdan 1 damla damlatılır. Damlanın yayılması beklenir, gerektiğinde hafifçe üflenebilir. Doku kültürü mikroskopunda preparat incelenir, odanın nem ve sıcaklık durumuna göre gerektiğinde yayma işlemi tekrarlanır. En uygun oda sıcaklığı 20-25 °C dir.
- u) Preparatlar üzerlerine protokol ve sıra numarası, olgu adı ve tarih yazılarak uygun boyama ve bant tekniği için oda ısısında preparat kutularında saklanır

III. Kordosentez

- a) Gestasyonun 18 haftasından sonra USG kontrolü altında heparinize enjektöre 1-2 ml fetal kan alınır (Şekil 3).
- b) Her olguya ait iki kültür tüpü kullanılır. Tüplere besi ortamından (Nutrient Mixture F 10 Ham's) kapaklı steril plastik santrifüj tüpüne 5 ml bırakılır. Üzerine iğnesi çıkarılmış 2'lik enjektör ile 5-6 damla kordon kanı damlatılır. 69 saat 37° C'lik etüvde bekletilir.
- c) Kültürün 69'ncu saatinde EtBr (Ethidium Bromide) solüsyonundan iki damla damlatılır. 90 dakika 37°C'de bekletilir.
- d) Üzerine demacalcineden 2 damla damlatılır, 90 dakika 37°C'lik etüvde bekletilir.
- e) Süre sonunda vortekslenir. 10 dakika 1000-1200 rpm'de santrifüj edilir, dökeltisi atılır.



Şekil 3. Kordosentez Girişimi.

- f) 37°C'de ısıtılmış hipotonik solüsyonundan 8 ml yavaş yavaş damlatılırken el yardımıyla karışması sağlanır. 10-15 dakika 37°C'de bekletilir. Tekrar 10 dakika santrifüj edilir, dökeltisi atılır.
- g) 5 ml İbramow solüsyonu vortex üzerinde tüplere damlatılır. 10 dakika santrifüj edilir.
- h) 5 ml metanol damlatılır. Santrifüj edilir.
- k) 3 defa 5 ml fiksatif ile yıkama işlemi tekrarlanır. Gerektiğinde ilk fiksatifte 1 gün + 4°C'de saklanır.
- l) Dökelti pasteur pipetiyle atılır. Daha önce temizlenmiş lamların buzdolabında soğuk buğu alması sağlanır.
- m) Çökelti üzerine 0.5 ml fiksatif damlatılır. Soğuk lamlara pasteur pipeti ile 45°'lik açıyla 10 cm yukarıdan 1-2 damlatılır.
- n) Yaymayı kolaylaştırmak için, hafif üflenebilir.

- o) Odanın nem oranı, sıcaklığı son derece önemlidir. 22-25°C odalarda yayma ideal olmaktadır.
- q) Preparatlar açık ve koyu metafaz yaymalarına, kalitelerine göre sıralanır. Üzerine olgunun adı, protokol numarası yazılır. Uygun boyama ve bantlama tekniği için 37°C'de saklanır.

Boyama Yöntemleri

1. Direk Boyama (Solid Staining)

1970'li yıllara kadar rutin olarak kullanılan bir yöntemdir (30, 43,45). Bu tip boyama ile kromozomların büyük bir kısmını tanımlamak mümkün değildir. Günümüzde sadece sayısal analizler ile kromozom kırık noktaları, gap ve frajil bölgelerin varlığını saptamada kullanılır. Kurumuş preparatlar, Giemsa ile (5 ml Giemsa stain stock solüsyon + 95 ml Distile su) 5 dakika boyanır. 2 ayrı distile su şalesinden geçirilir, kurutulup incelemeye alınır.

2. Giemsa Bantlama (G-Banding = GTG)

Sitogenetik laboratuvarlarında sıkça başvurulmuş ve tanımlamada kullanılan en yaygın yöntemdir. Her kromozom kendine özgü açık ve koyu bant bölgeleri içerir. Bu bölgeler premetafaz ve metafaz kromozomlarında sayıca farklıdır. İlk defa Paris kongresinde (1971) idiogramlar belirlenmiş, en son şekli 1995 ISCN' de yayınlanmıştır(31).

Preparatları bantlamak için tripsin solüsyonu hazırlanır. 37 °C etüvde 2 saat bekletilir. Önce bir preperat 5-10 saniye trypsin solüsyonundan geçirilir. Distile su ile yıkanır. Gerekğinde bu süreler azaltılıp artılabilir.

Daha sonra preparat boya solüsyonu şalesinde 5-6 dakika bekletilir. İki ayrı şaledeki distile su serisinden geçirilip kurutulur. 10x'lik mikroskop objektifinde kromozomların bant seviyesi tespit edilir. Kromozomların tanımlanması Paris kongresinde ve en son ISCN idiyogramlarına göre gerçekleştirilir.

Değerlendirme

Üzerine ait olduğu kişinin protokol ve preparat numarası yazılmış olan preparatlar, mikroskopta incelemeye alınır. Önce küçük büyütmeli objektifle taranarak iyi nitelikli hücreler (metafaz plakları) önceden hazırlanmış bilgi işlem formuna yazılır. Hücreler daha sonra immersiyon objektifi ile incelenerek

şunlar yapılır :

- a) Her olgu için en az 15 hücredeki kromozomlar sayılarak varsa yapısal düzensizlikleriyle birlikte bilgi işlem formundaki özel bölümlere yazılır.
- b) Mikroskop incelemesiyle ortaya çıkan bilgi işlem formundaki tablo değerlendirilir. Kusurlu hücrelerin sayısına, kromozom kusurlarının sayısına, tipine ve oranına bakılır.
- c) Karyotip yapılacak metafaz plakları (en az 5-10) cam yazar kalemle işaretlenir. Kromozom analiz cihazında (Cytovision Ultra) metafazlar kameralı mikroskop aracılığı ile bilgisayar ortamına aktarılır.
- d) Metafaz kromozomları tek tek bağımsızlaştırılarak karyotip yapılır.

- e) Karyotip tekrar sayısal ve yapısal kromozom düzensizliği açısından değerlendirilir. Varsa düzensizliğin hangi kromozomu tuttuğu saptanmaya çalışılır.

Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Kromozomlar, ışık mikroskopu kullanılarak mitoz bölünmenin metafaz evresinde incelenirler (1, 8, 12, 30, 42). Normal kromozomlarda görülen bazı morfolojik özellikler şunlardır (Şekil 4).

- a) **Sentromer**.Kromozomların en soluk boya alan kesimidir (Şekil 4,A). Her kromozomda yalnızca bir tane olan sentromerler hücre bölünmesi sırasında kromozomların iç ipliklerine tutunmasını sağlarlar. Kromozomlar sentromerlerinin lokalizasyonuna göre 3 gruba ayrılırlar ve bunların dışındaki örnekler genellikle normal sayılmazlar.

1) **Median (Metasentrik) Kromozom** . Sentromeri ortada ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlar (Şekil 4,B).

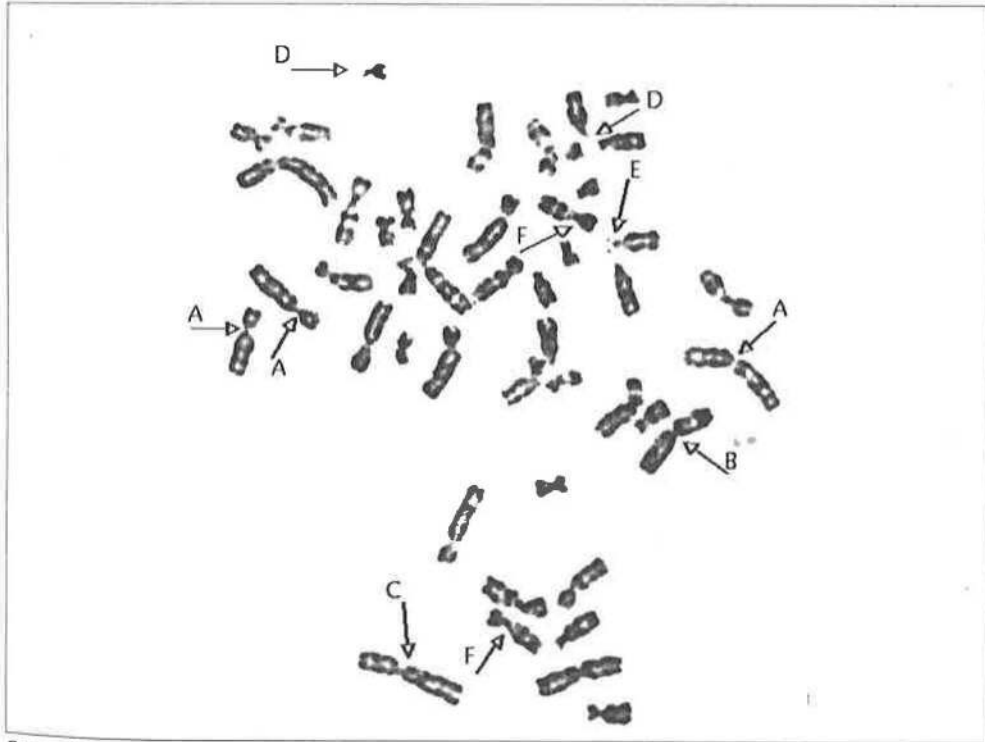
2) **Submedian (Submetasentrik) Kromozom** . Sentromerleri merkezden uzak ve iki kolu birbirine eşit olmayan kromozomlar (Şekil 4,C).

3) **Akrosentrik Kromozom** . Sentromeri kromozomun bir ucuna çok yakın olan kromozomlar (Şekil 4, D).

İnsan kromozomları 34 metasentrik ve submetasentrik, 10 akrosentrik otozom ile 1 submetasentrik (X) ve 1 akrosentrik (Y) gonozomundan oluşurlar (1, 24).

b) **Satellit (Uydu)** . İnce bir sapla belirli kimi kromozomların kısa kollarına bağlanan, yuvarlak düğme biçimindeki kromatin materyalidir. D (13-15) ve G (21-22) grubu kromozomlarının tümünün kısa kollarında bir satellit bulunur (Şekil 4,E).

c) **Sekonder Darlık** . Sentromerin tüm kromozomlarda bulunmasına karşılık, bu oluşum ancak belirli kimi kromozomlarda (Özellikle 1,3,9 ve 16 numaralı kromozomlar) görülürler ve ayrıca sentromerden daha açık boyanırlar (Şekil 4,F). Kromozomların uzun kolunda olup sentromere bitişiktirler ve uzunlukları farklılıklar göstermektedirler. Akrosentrik kromozomlarda görülen sekonder darlık, yani satelliti gövdeye bağlayan sap ise çekirdekçik oluşumu ile ilgilidir.



Case: 1998-569 Slide: 1 Cell: 1 Patient: B.C.

Şekil 4. A. Sentromer, B. Metasentrik kromozom, C. Submetasentrik kromozom, D. Akrosentrik kromozom, E. Satellit, F. Sekonder darlık.

Kromozomların Adlandırma Sistemi

1956 yılında Tjio ve Levan (46) tarafından insan kromozomlarının tam sayısı bulunduğundan sonra ($2n=46$), ortaya konan kromozom hastalıklarında belirgin bir artma görülmüştür. Fakat kromozomları tanımlayan yayınlar arasında belli bir sisteme uyma durumu olmadığı için, giderek karışıklıklar görülmeye başlamıştır. Bunun üzerine, bulguları standartlaştırmak ve belli ilkeleri saptamak için 1960 yılında Denver'de (A.B.D.) genetikçilerin ilk uluslararası toplantısı yapılmıştır. Bu toplantıda kabul edilen sisteme Denver Sistemi ya da klasifikasyonu denir (1, 8, 28, 31, 35, 43).

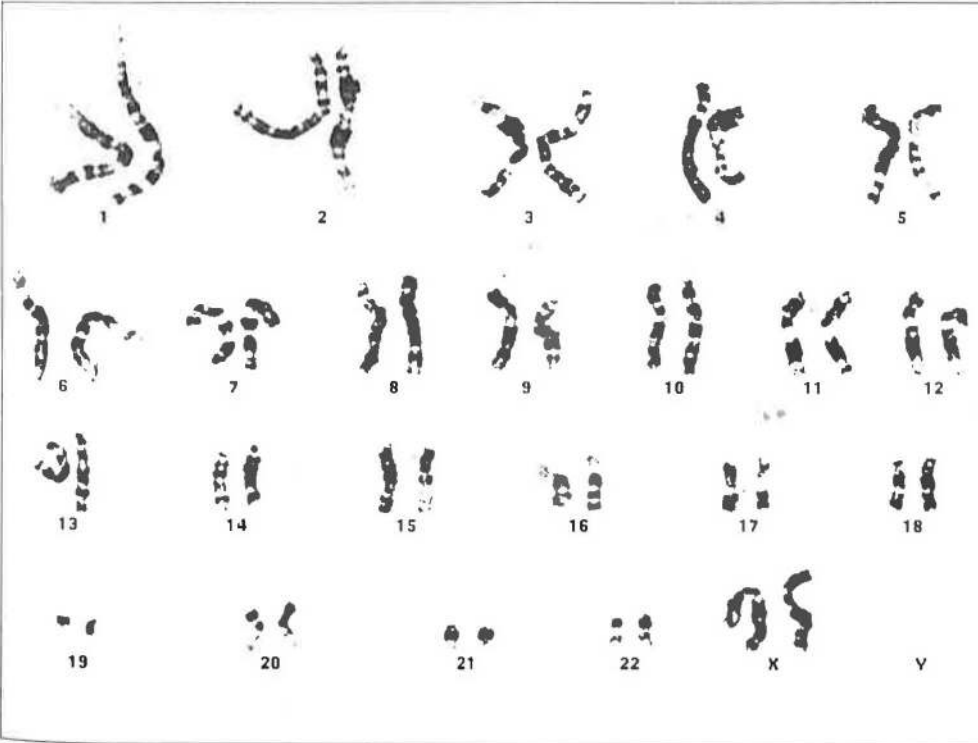
Ancak, ortaya konan sistemin eksiklerini tamamlamak üzere daha sonra bir dizi toplantılar yapılmıştır (1963 Londra, 1963 Chicago ve 1971 Paris konferansı ve diğerleri) (31).

Böylece, Denver sistemi daha da geliştirilmiş ve insan kromozomları standardizasyona tabi tutularak ortak bir adlandırma sistemi kabul edilmiştir. Buna göre, tüm bilgi bir formül içerisinde toplanmakta, önce total kromozom sayısı yazılmakta, sonra cinsiyet kromozomlarının yapısı ve daha sonra da varsa kromozom anomalileri belirtmektedir.

Kabul edilen sisteme göre, insan kromozomları yedi gruba ayrılmakta (A,B,C,E,F,G) ve cinsiyet kromozomları dışındaki kromozomlar, en büyükten başlamak üzere 1-22 arasında numaralanmaktadır. Kromozomların tanısında; kromozomun uzunluğu, sentromerin bulunduğu yer, sekonder darlığın bulunup bulunmaması, kromozomların band ve otoradyografik özellikleri kriter olarak alınır. Bu kriterler esas alınarak ayrılan kromozomlar, Denver sistemine göre sıralanarak karyotip hazırlanmaktadır (Şekil 5, 6).

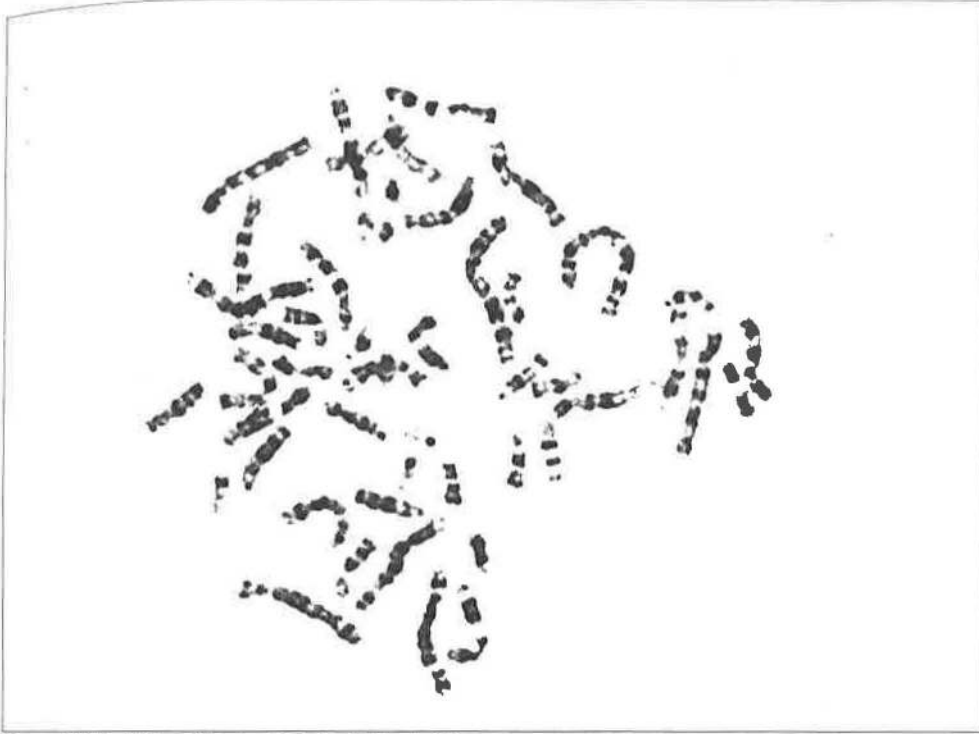


Case: 1998-712 Slide: 1 Cell: 1 Patient: N.A.

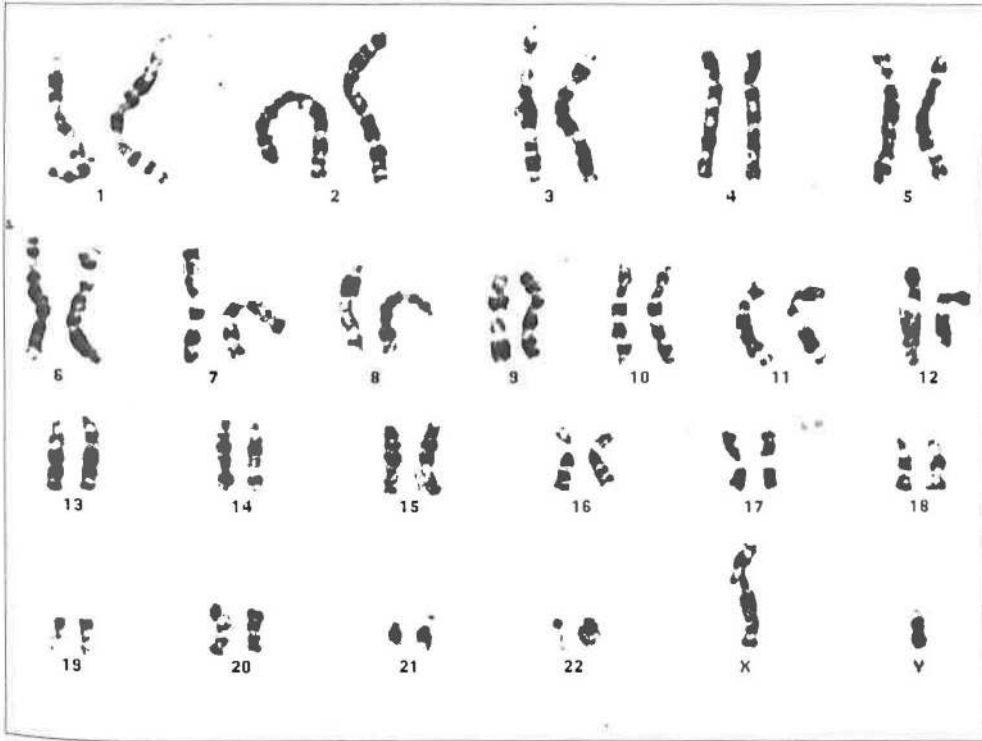


Case: 1998-712 Slide: 1 Cell: 1 Patient: N.A.

Şekil 5. Denver sistemine göre hazırlanmış normal bir kadına ait karyotip.



Case: 1997-579 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.B.



Case: 1997-579 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.B.

Şekil 6. Denver sistemine göre hazırlanmış normal bir erkeğe ait karyotip.

Kromozomal Düzensizlikler

Karakterlerin kuşaktan kuşağa değişmeden aktarılmasını sağlayan kromozomlar, şekil büyüklük ve sayı bakımından her canlı türü ve o tür içindeki ait olduğu birey bakımından sabit ve karakteristiktir. Normalde 46 tane olan insan kromozomları bazen hem sayı, hem şekil ve hem de yapı bakımından değişiklikler gösterebilirler.

Genetik materyaldeki mutasyonlar bazen kromozomun çok geniş bir bölgesini kapsayabilir ve bu düzensizlik ışık mikroskopunda gözlenebilecek kadar büyük ise kromozomal düzensizlik olarak adlandırılır. Işık mikroskobu ile gözlenebilen en küçük artma ya da eksilme genomun yaklaşık %0.13 kadardır. Tüm gebeliklerin %7.5 kadarında kromozom düzensizlikleri gözlenir.

Böyle gebeliklerin %50-60 kadarı spontan olarak atılırken %0.6 kadarı canlı doğumlarda ortaya çıkmaktadır. Bu sözkonusu düzensizlikler, kullanılan yeni tekniklerle (bantlama, floresans, otoradyografi, rekombinant DNA, FISH gibi) bu gün için kolaylıkla saptanmaktadır.

Kromozom düzensizlikleri otozomal ya da gonozomal kromozomlarda olabilir ve eşlerdeki germ hücre mutasyonu yada somatik hücrelerdeki mutasyonlarla ortaya çıkabilirler ki, bunların somatik hücrelerde gerçekleşmesi halinde hücrelerin bazıları normal yapıda iken bazıları mutant olur (8).

Bu çalışmada kromozom düzensizliklerinin belirtilmesinde kullanılan deyimler ve tanımlar (1, 8, 11, 12, 31, 43) aşağıda belirtilmiştir.

A. Kromozomlardaki Sayısal Düzensizlikler

Normal kromozom sayısından sapmalarla ortaya çıkan düzensizliklerdir.

1) **Öploid (euploidy)**. Hücrelerdeki kromozom sayısının ($n=23$) tam

katı kadar artış veya azalmalardır.

a) **Triploidi**. Temel kromozom sayısının üç katı artmasıdır ($3n=69$)

b) **Tetraploidi**. Temel kromozom sayısının dört katı artmasıdır

(Şekil 7).

c) **Endoredüplikasyon**. Sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmemesi nedeniyle katı kadar artmış kromozomların ikişer kromatidli kromozom çiftleri halinde olmasıdır (Şekil 8).

d) **Yüksek Poliploidiler**. Karyotipte $4n$ 'den daha fazla kromozom bulunmasıdır.

2) **Anöploidi**. Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelerdir. Anöploidi poliploidiye göre daha sık ortaya çıkar ve kromozomal sendromların büyük bir bölümünde gözlenen düzensizliktir.

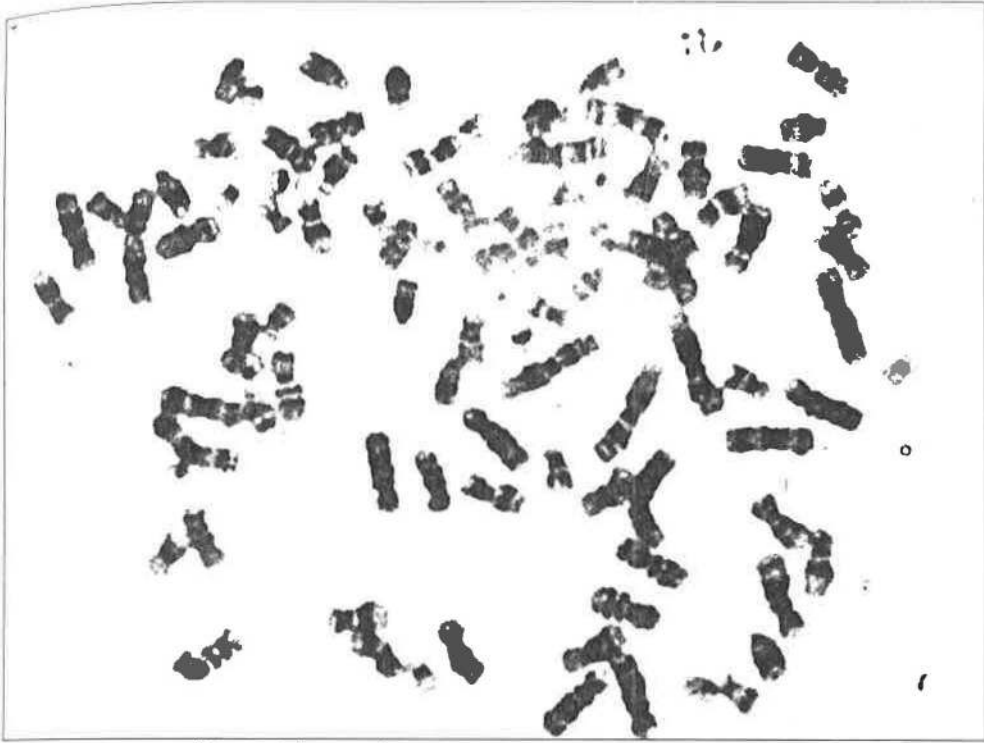
a) **Hiperploidi**. $2n+1$ ve $2n+2$ gibi kromozom sayısındaki artmalar.

b) **Hipoploidi**. $2n-1$ ve $2n-2$ şeklindeki kromozom sayısındaki azalmalar

c) **Miksoploidi yada mozaisizm**. Aynı zigottan kaynaklanan organizma ya da herhangi bir dokunun değişik hücrelerinde, değişik kromozom kuruluşuna rastlanması durumu.

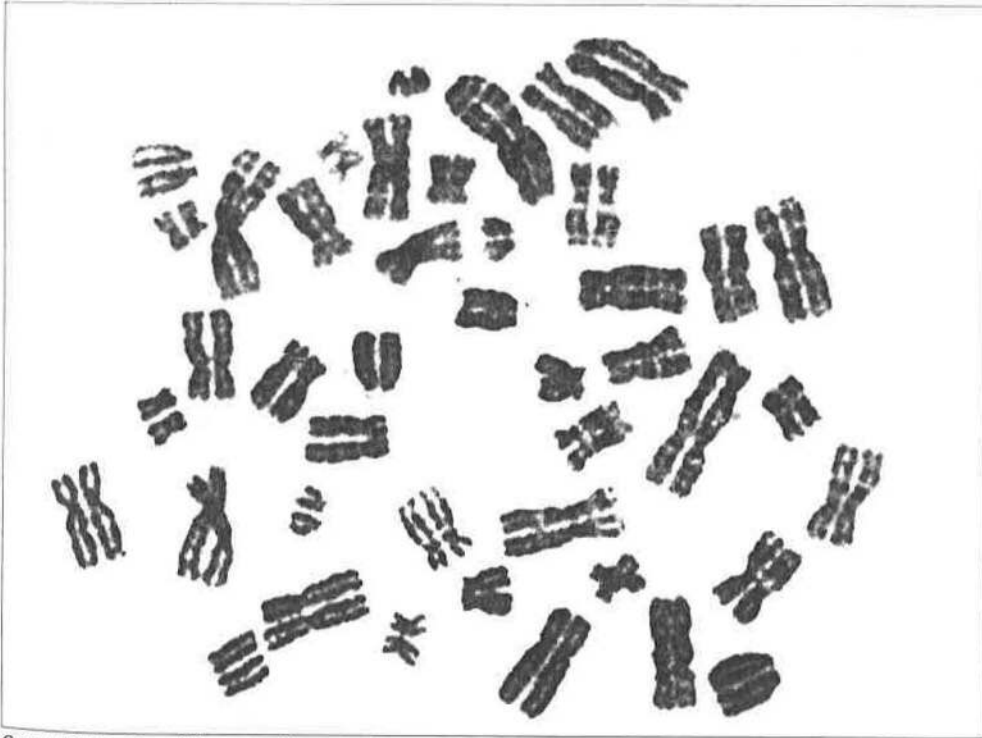
B. Kromozomlardaki Yapısal Düzensizlikler

Kromozomlardaki yapısal düzensizliklerin nedeni aynı ya da değişik kromozomlardaki kırılma ve yeniden düzenlenmelerdir.



Case: 1997-515 Slide: 1 Cell: 1 Patient: S.K.

Şekil 7. Tetraploid bir hücre.



Case: 1998-99 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.G.

Şekil 8. Endoreduplikasyon.

1) **Yer Değişirme (Translokasyon)**. Kromozom materyalinin kromozomlar arasındaki değişimdir. Her iki kromozomda kırıkların oluşması ve normalin dışında bir yeniden düzenleme ile tamir edilmesi ya da mayoz sırasında homolog olmayan kromozomlar arasındaki rekombinasyondan kaynaklanmaktadır. Bu değişimde genellikle DNA kaybı olmaz ve kişi klinik olarak normaldir (dengeli translokasyon).

2) **Artma (Duplikasyon)**. Homolog olan ya da olmayan iki kromozomdan birinden kopan bir parçanın diğer kromozoma eklenmesi.

3) **Eksilme (Delesyon)**. Bir kırılma sonucu kromozomun küçük bir parçasının kopmasıdır.

4) **Gap (Aralık)**. Kromozomun herhangi bir bölgesinde, kromatidin enini geçmiyen ve kromozom ekseninden sapmış, boya almıyan bir bölgenin görülmesi.

a) **Kromatid gap**. Gap'in kromozomun bir kromatidinde görülmesi.

b) **İzokromatid gap**. Gap'in kromozomun her iki kromatidinde görülmesi.

5) **Kırık**. Kromozomun herhangi bir bölgesinde, bir kromatid enini aşan ve kromozom ekseninden sapan boyanmamış bölgeler.

a) **Kromatid kırığı**. Kırık olarak değerlendirilen düzensizliğin, kromozomun bir kromatidinde görülmesi.

b) **İzokromatid kırığı**. Kırık olarak belirtilen bozukluğun, kromozomun her iki kromatidinde ve eş kesimlerinde görülmesi.

6) **İki sentromerli kromozom (disentrik)**. Kromozomda bir yerine iki sentromerin bulunması

7) Sentromersiz kromozom (asentrik kromozom, asentrik fragment). Birbirine paralel duran, sentromerleri görünmeyen ya da bulunmayan kromozomlar.

8) Minik kromozom (minute). Sentromersiz kromozomlardan daha küçük kromatid çiftleridir. Görünüşlerinden dolayı kromozom ya da kromatin damlacığı olarak tanımlanırlar.

9) Halka (yüzük, ring) kromozom. Kromozomun iki ucunun birleşerek yüzük görünümü oluşturması.

10) Yapışkanlık. Kromozomların yığın haline gelmesi.

11) Satellit asosiasyonu . Büyük ve küçük akrosentrik kromozomların metafaz plaklarında beklenenden daha sık olmak üzere kısa kollarındaki uyduları birbirine çevirmiş biçimde biraraya gelerek, rozet biçimi toplanmaları.

12) İri satellitler. D ve G grup kromozomlardaki satellitlerin normalden büyük görülmeleri.

13) Sentromer bölünmesinde asenkroni. Sentromerlerin aynı zamanda bölünmemesi.

B U L G U L A R

Bu araştırma; 01.01.1997-31.12.1998 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Prenatal Tanı Laboratuvarına gönderilen CVS, AS ve KS örneklerinden çalışılarak hazırlanmıştır. Toplam 158 örnek değerlendirilmiştir. Her örnek için, 2 kültür yapılmış, ortalama 12 preparat hazırlanmıştır. Bu preparatlardan bir tanesi direkt Giemsa ile geri kalan preparatlar ise Giemsa Bantlama Tekniği (GTG-Banding) ile hazırlanmıştır (30, 37). Değerlendirilmeye alınan preparat sayısı $12 \times 158 = 1896$ adettir.

Laboratuvarımıza gönderilen CVS, AS ve KS için; ileri yaştan 37, dengeli translokasyon taşıyıcısı olan 3, down riski olan (triple test sonucu) 22, fetal anomali riski olan (USG bulgusu) 50, daha önce anomalili fetusu olan 3, habitual abortusu olan 18, oligohidrioamnioslu 7, polihidrioamnioslu 5, direkt müracaatlı 11, toksoplazmosisli 1 ve kötü obstetrik anemnezi olan 1 örnek materyal olmak üzere toplam 158 materyal değerlendirilmiş, sitogenetik çalışma yapılarak kromozom elde edilmiş ve analizleri yapılmıştır (30,32,37).

Prenatal tanı endikasyonu olan gebelerin; 12'sinden CVS örneği sağlanmıştır. Sitogenetik inceleme amacıyla, CVS örneği sağlanmış 12 gebeden 6'sı fetal anomali riski (USG bulgusu) taşıyordu. 5'inin habitual abortusu vardı. 1'i laboratuvarımıza direkt müracaat etmiş ve klinisyenler tarafından istemi makul bulunmuştu (Çizelge 1).

Klinik ön tanısı konulan ve sitogenetik çalışma için alınmış bulunan 101 AS örneğinin 31'i ileri yaş gebeliği, 3'ü dengeli translokasyon taşıyıcılığı, 2'si Down sendromu riski (triple test sonucu), 23'ü fetal anomali riski (USG bulgusu), 2'si daha önce anomalili fetusu, 8'i habituel abortusu, 3'ü oligohidramnioslu, 1'i polihidramnioslu, 8'i direkt müracaatlı ve 1'i kötü obstetrik anemnezi olan gebeye aitti (Çizelge 1).

Klinik ön tanısı konulan toplam 45 kordosentez (KS) örneğinden 72 saatlik kültür yapılmıştır. Sözkonusu 45 KS örneğinin 6'sına ileri yaş gebeliği, 1'ine Down sendromu riski (triple test sonucu), 21'ine fetal anomali riski (USG bulgusu), 1'ne daha önce anomalili fetusu olması, 5'ne habituel abortus, 4'üne oligohidramnios, 4'üne polihidramnios, 2'sine direkt müracaatları nedeniyle, 1'ine ise toksoplazmosis şüphesi ile kordosentez yapılmıştı (Çizelge1).

Elde edilen genel bulgular şöyledir:

Hazırlanan 158 örnek materyalin 74 tanesinde 46,XX, 65 tanesinde 46.XY, 3'ünde 46,XX,t(4;10), 46,XX,t(6;7), 46,XY,t(2;15), (dengeli translokasyon taşıyıcısı), 2'sinde 46,XX,9qh+, 3'ünde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlik, 2'sinde 45,X (Turner Sendromu), 1'inde 47,XY,+21 (Down Sendromu), 1'inde 47,XXY (Klinefelter Sendromu) saptanmıştır (Şekil 9,10,11,12,13,14,15). Toplam 2 olguya ait örnekte yeterli üreme olmadığından sonuç elde edilememiştir. Toplam 5 olgu ise kontaminasyon nedeniyle değerlendirilememiştir.

Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonucumuz yoktur. Kültürde başarı oranımız $\cong$ % 96 olmuştur.

Genel bulguların, kullanılmış metodlar dikkate alındığında dağılımları şöyledir:

1) CVS Direkt Preparasyon ve Uzun Süreli Kültür Sonuçları:

Klinik bulgulara göre kesin tıbbi abortus gerektirdiğini düşündüren ve sitogenetik laboratuvarımıza gönderilen 12 CVS materyalinden 8'ine direkt metotla bakılmış, ayrıca hepsi de uzun süreli kültüre alınarak değerlendirilmiştir.

Direkt metotla çalışılan 8 örnekten 2'sinde 46,XX, 3'ünde 46,XY, 1'inde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlikler saptanmıştır. 2 örnekten sonuç alınamamıştır (Çizelge 2). Direkt metod uygulaması kısa sürede bir sonuca varmak ve CVS kültür yöntemini desteklemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Uzun süreli kültür yöntemi uygulanarak çalışılan 12 örnekten 5'inde 46,XX, 3'ünde 46,XY, 2'sinde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlik, 1 tanesinde de 45,X (Turner Sendromu) saptanmıştır. Örneklerden 1 tanesi kontamine olduğu için sonuç alınamamıştır (Çizelge 2).

2) AS Kültür Sonuçları:

Prenatal tanı laboratuvarımıza gönderilen 101 AS örneğinden 49'unda 46,XX, 42'isinde 46,XY, 3'ünde 46,XX,t(4;10), 46,XX,t(6;7), 46,XY,t(2;15) (dengeli translokasyon taşıyıcısı), 1'inde 45,X (Turner Sendromu), 1'inde 47,XXY (Klinefelter Sendromu) saptanmıştır.

Bir örnek materyalden yeterli üreme sağlanamamış, 4 örnek materyal ise kontamine olduğundan sonuç alınamamıştır (Çizelge 2).

3) KS Kültür Sonuçlar:

Prenatal tanı laboratuvarımıza gönderilen 45 fetal kan örneğinden 20'si 46,XX, 20'si 46,XY, 2'si 46,XX9ph+, 1'inde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlik, 1'inde 47,XY,+21 (Down Sendromu) saptanmıştır. 1 örnekten ise yeterli üreme olmadığından sonuç alınamamıştır (Çizelge 2).

BULGULARIN
ŞEKİL ve ÇİZELGELERİ

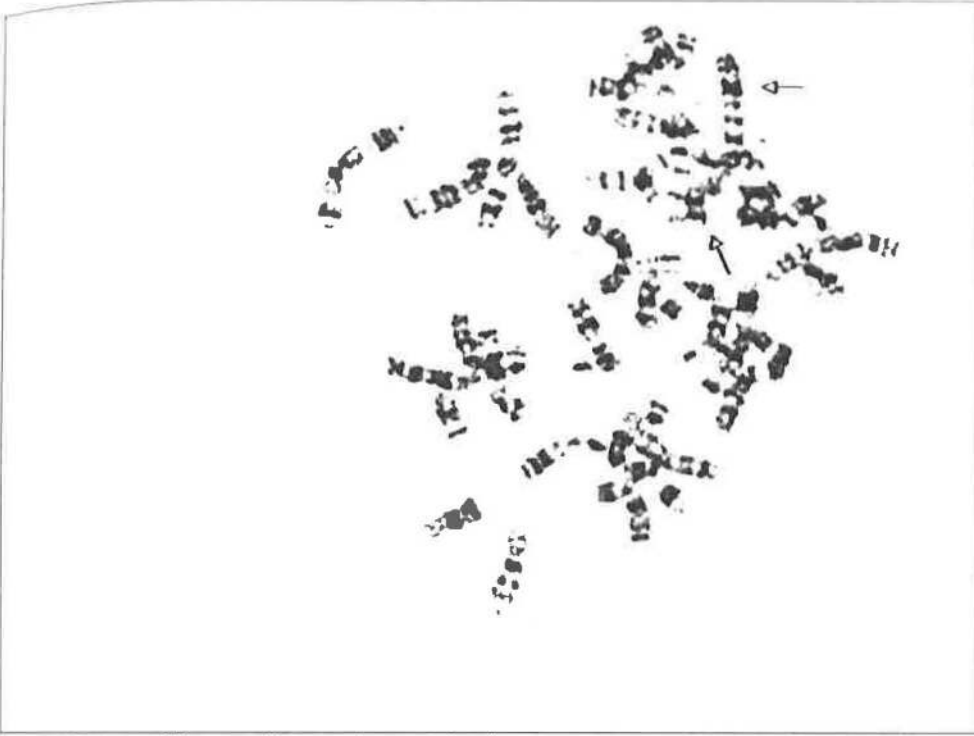
Çizelge 1. Prenatal tanı endikasyonu olan gebelerin klinik öntanılarına ve uygulanan tekniklere göre dağılımı.

KLİNİK ÖN TANI	CVS	AS	KS	Toplam
İleri Yaş	-	31	6	37
Dengeli Translokasyon Taşıyıcısı	-	3	-	3
Down Riski (Triple Test Sonucu)	-	21	1	22
Fetal Anomali Riski (USG bulgusu)	6	23	21	50
Daha Önce Anomalili Fetus	-	2	1	3
Habituel Abortus	5	8	5	18
Oligohidramnios	-	3	4	7
Polihidramnios	-	1	4	5
Direkt Müracaat	1	8	2	11
Toksoplazmosis	-	-	1	1
Kötü Obstetrik Anemnez	-	1	-	1
Genel Toplam	12	101	45	158

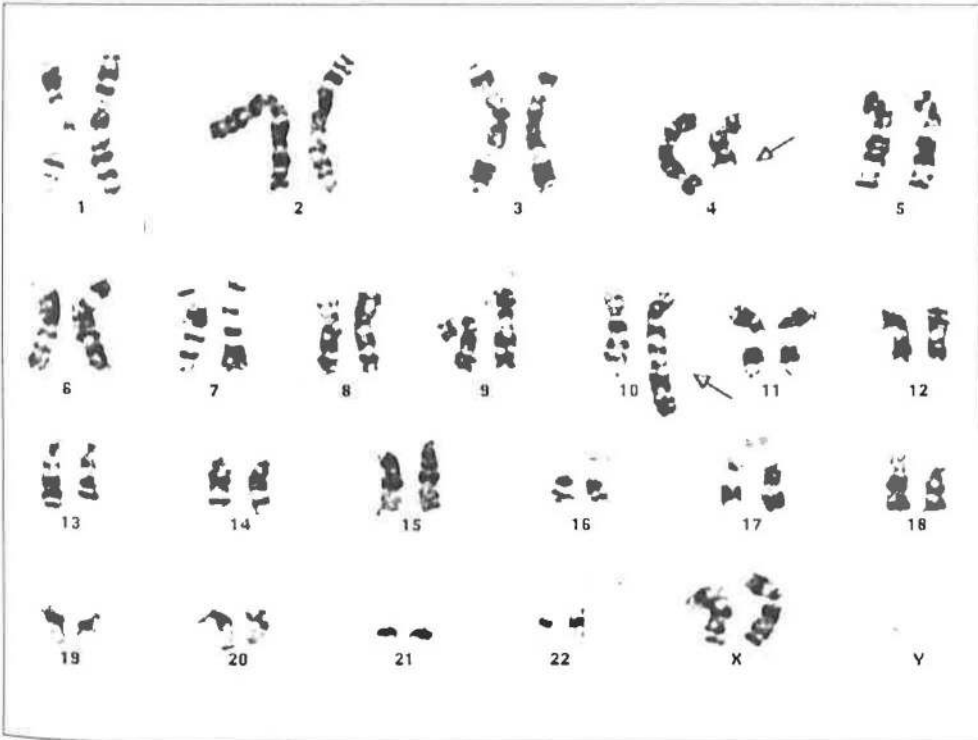
Çizelge 2. Prenatal tanı endikasyonu olan gebelerde saptanan sitogenetik bulguların uygulanan tekniklere göre dağılımı

	CVS		AS	KS	Toplam
	UZUN SÜRELİ %	DİREKT *	%	%	
46,XX	5 42	(2)	49 48	20 ~45	74
46,XY	3 25	(3)	42 42	20 ~45	65
Dengeli Trans.Taşıyıcısı	-	-	3 3	-	3
Farklı Metafazlarda Tekrarlamayan Yapısal ve Sayısal Düzensizlik Gözlenen	2 17	(1)	-	1 2	3
Turner Sendromu	1 8	-	1 1	-	2
Down Sendromu	-	-	-	1 2	1
Klinefelter Sendromu	-	-	1 1	-	1
46,XX,9qh+	-	-	-	2 ~5	2
Üreme Olmayan	-	(2)	1 1	1 1	2
Kontamine Olan	1 8	-	4 4	-	5
Kültürde Başarı %					≈96
Genel Toplam	12 100	(8)	101 100	45 100	158

* Direkt bakılan CVS'lerin tümüne uzun süreli kültür de yapılmıştır.
Mükerrer olmaması bakımından genel toplama dahil edilmemişlerdir.

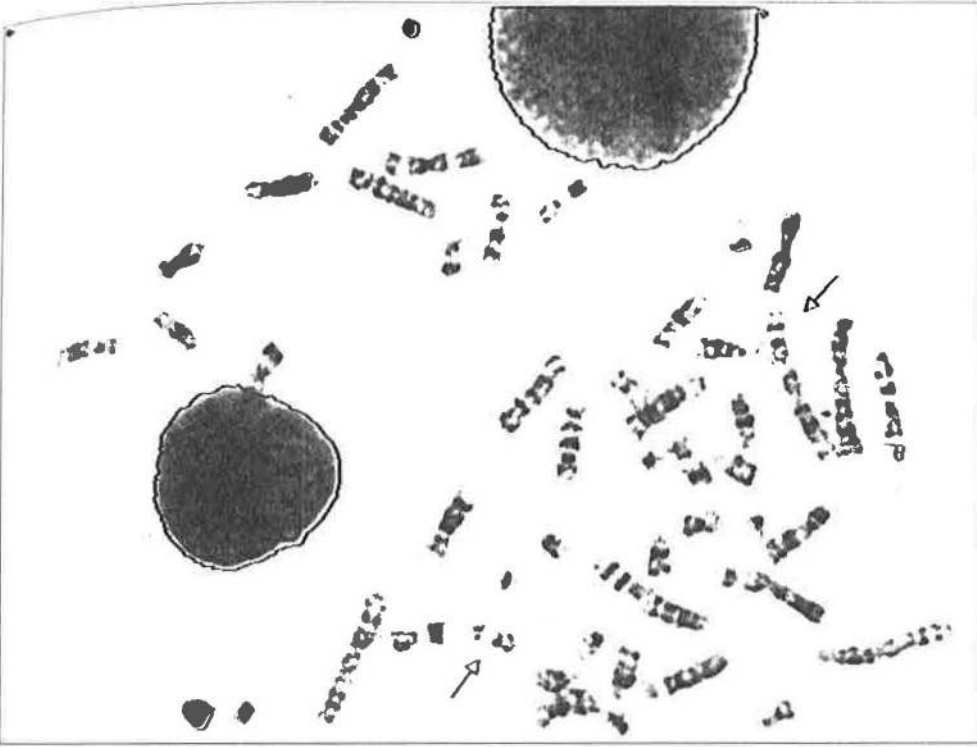


Case: 1998-4 Slide: 1 Cell: 4 Patient: R.D. (AS)

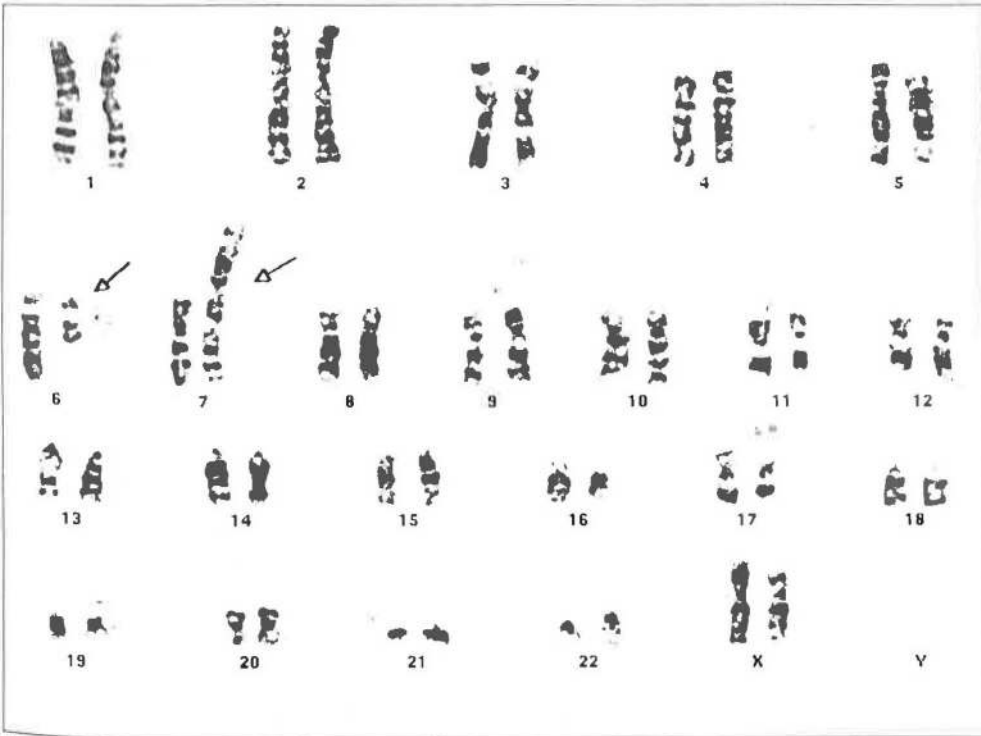


Case: 1998-4 Slide: 1 Cell: 4 Patient: R.D. (AS)

Şekil 9. 46, XX, t(4;10) translokasyonuna sahip olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip

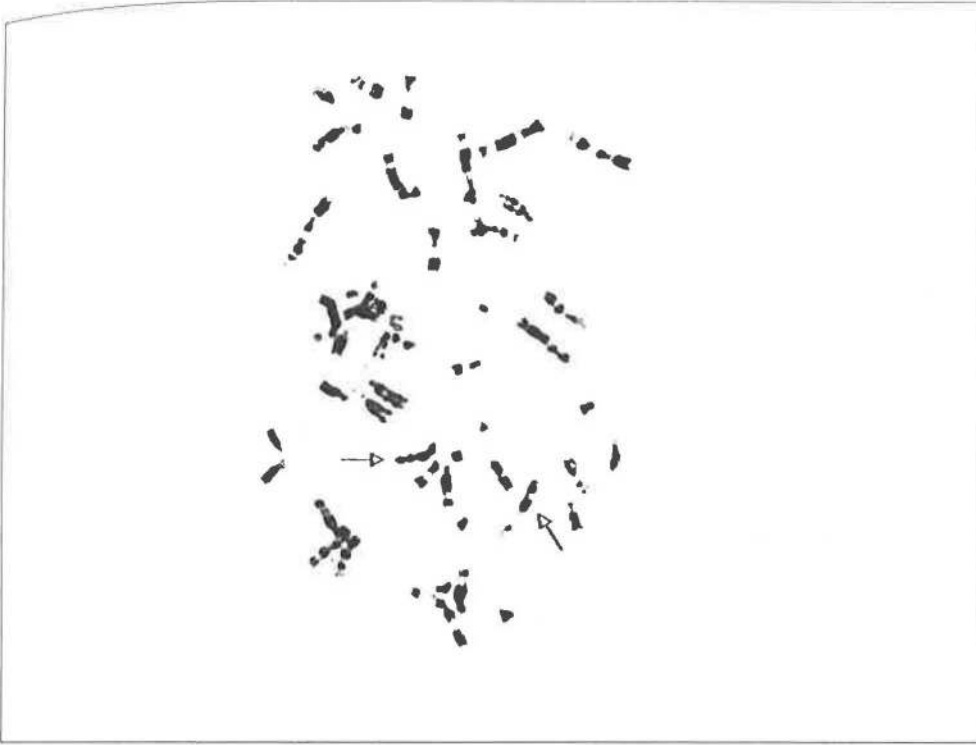


Case: 1998-18 Slide: 1 Cell: 3 Patient: S.T. (AS)

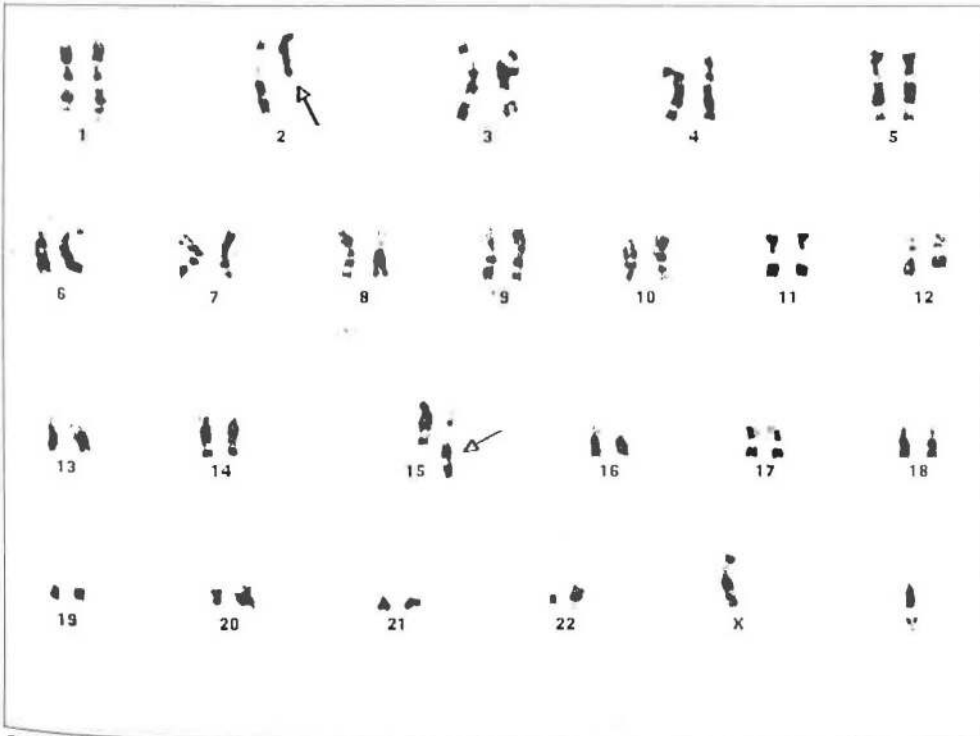


Case: 1998-18 Slide: 1 Cell: 3 Patient: S.T. (AS)

Şekil 10. 46, XX, t(6;7) translokasyonuna sahip olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip

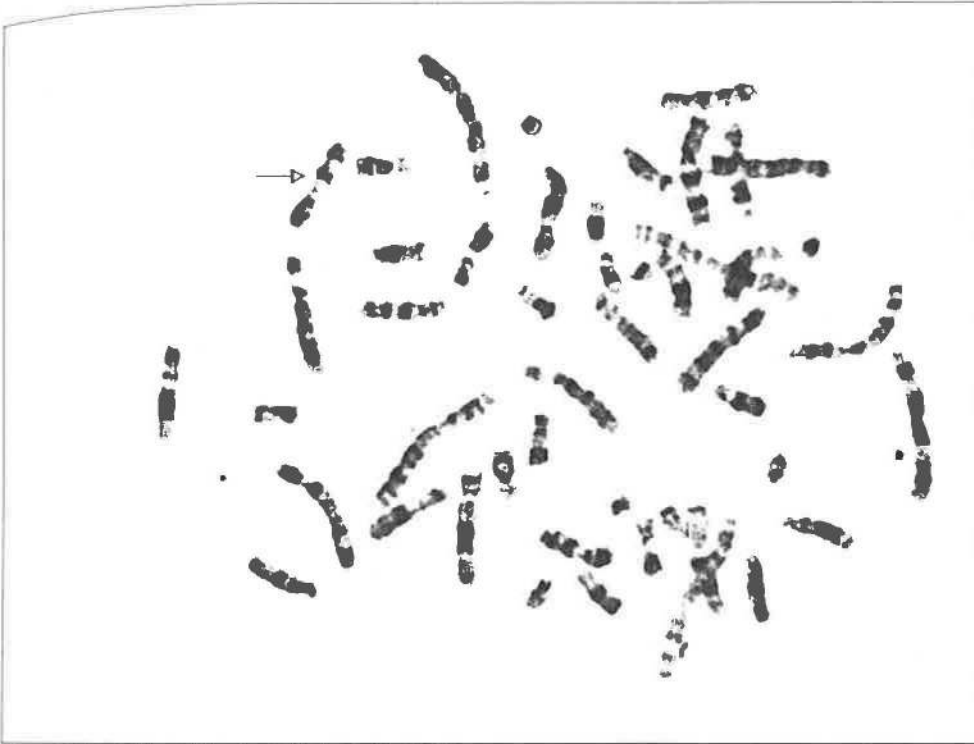


Case: 1996-379 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.Y.



Case: 1996-379 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.Y.

Şekil 11. 46, XY, t(2;15) translokasyonuna sahip olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip

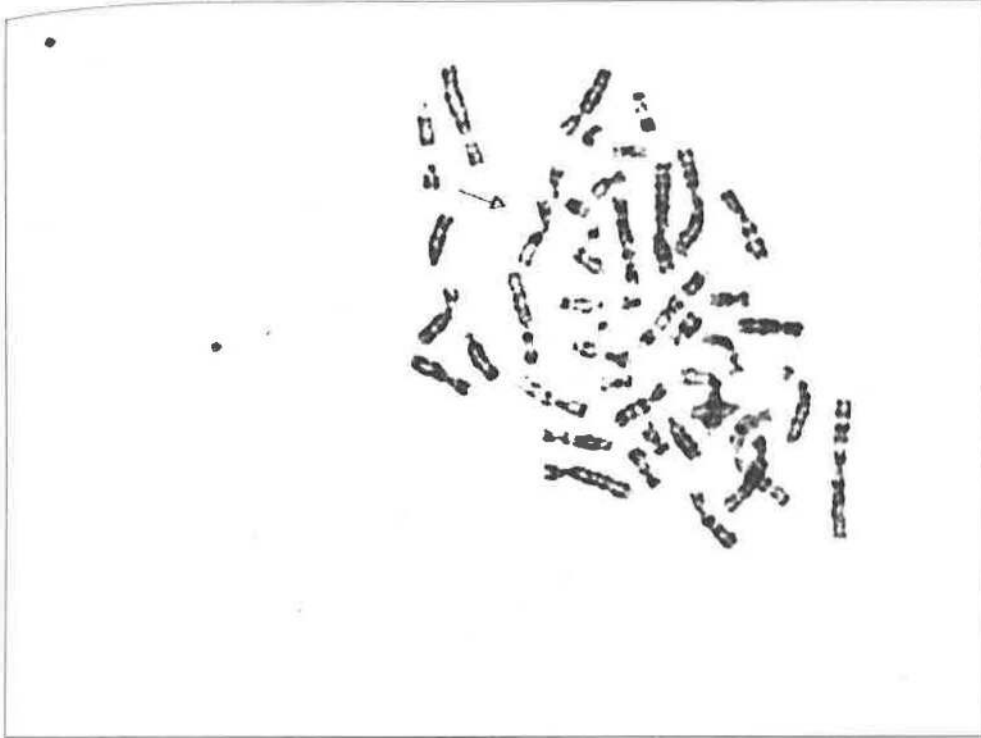


Case: 1998-675 Slide: 1 Cell: 1 Patient: T.D.

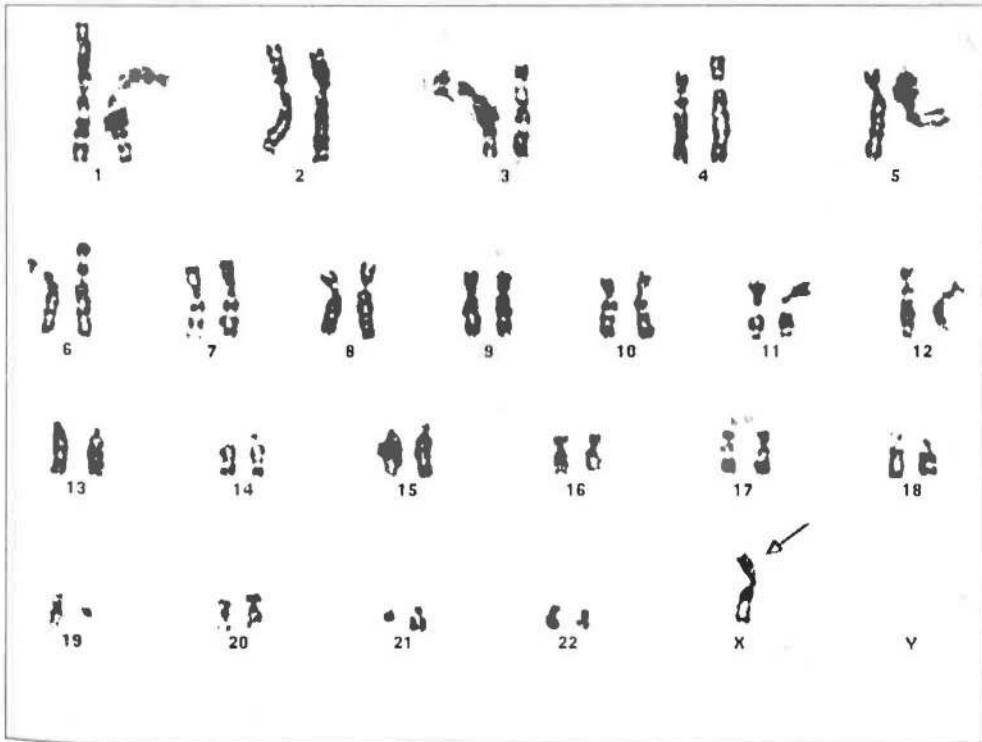


Case: 1998-675 Slide: 1 Cell: 1 Patient: T.D.

Şekil 12. 46, XX, 9qh+ kromozom kuruluşuna sahip olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip

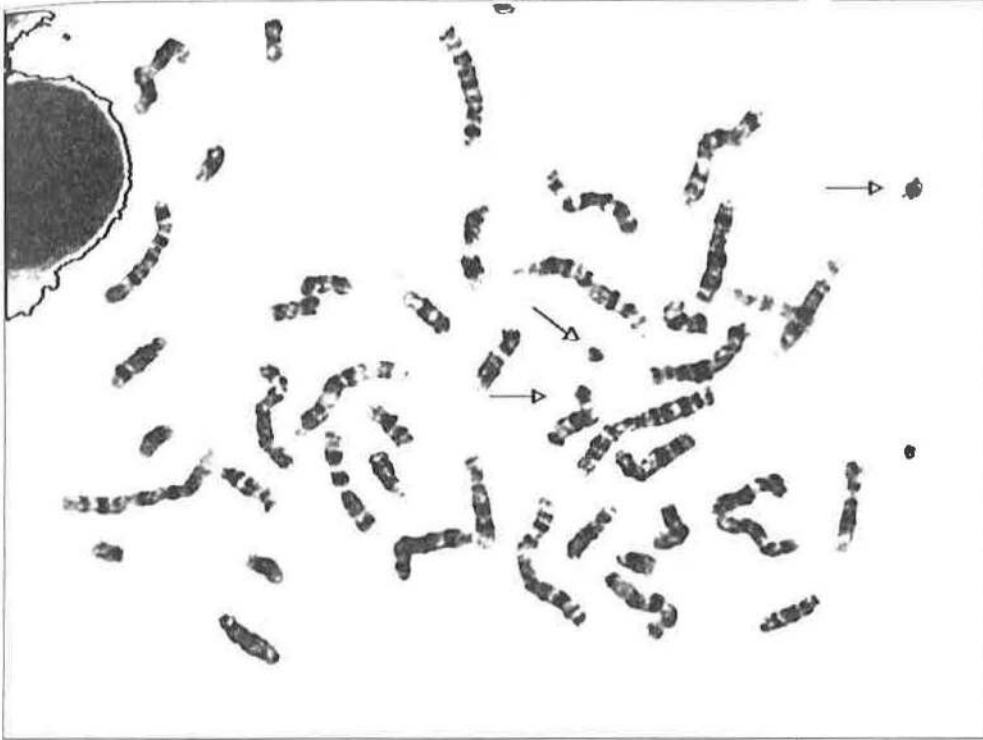


Case: 1998-196 Slide: 1 Cell: 6-CVS Patient: K.B. (CVS)

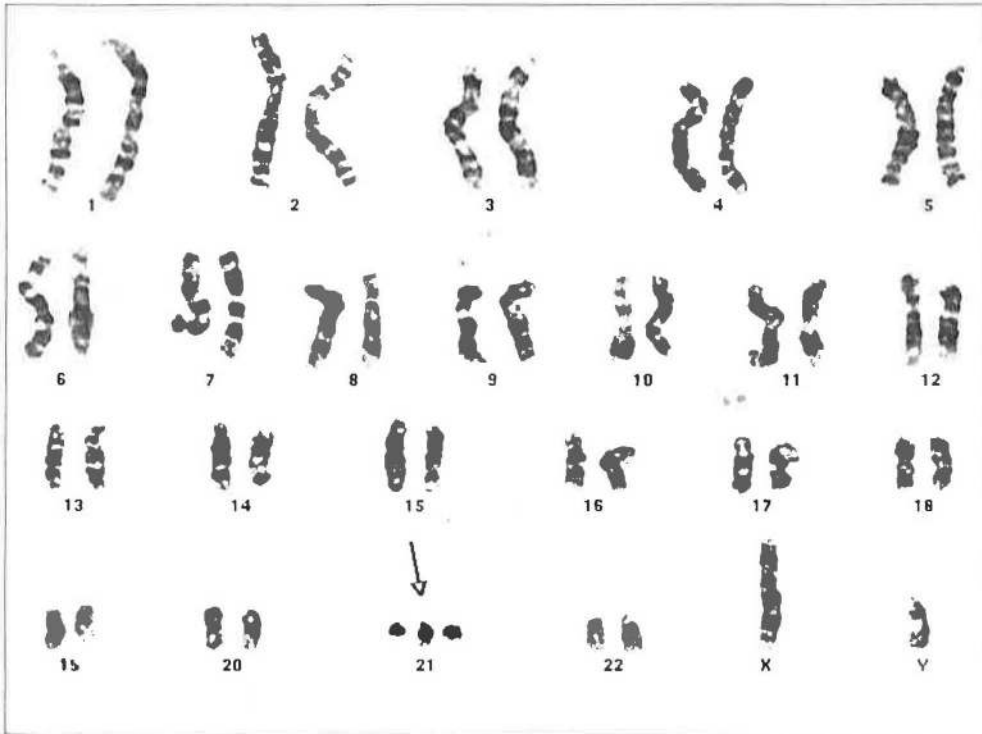


Case: 1998-196 Slide: 1 Cell: 6-CVS Patient: K.B. (CVS)

Şekil 13. Turner sendromlu (45, X) olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip

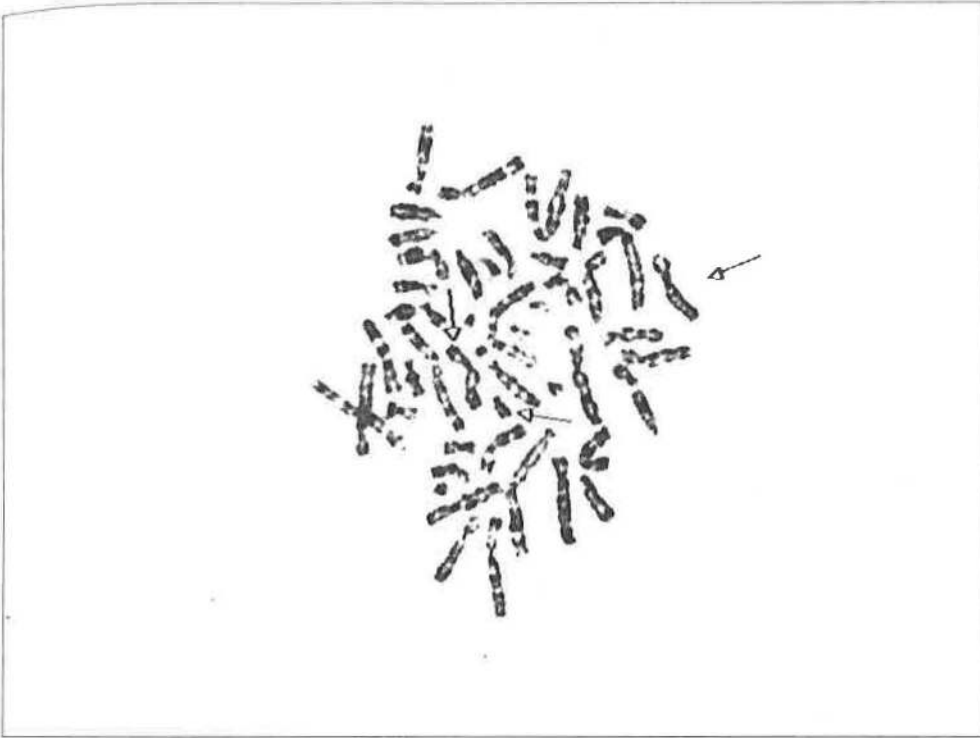


Case: 1998-452 Slide: 1 Cell: 1 Patient: N.D. (K.S.)



Case: 1998-452 Slide: 1 Cell: 1 Patient: N.D. (K.S.)

Şekil 14. Down sendromlu (47, XY, +21) olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip



Case: 1997-609 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.P. (AS)



Case: 1997-609 Slide: 1 Cell: 2 Patient: S.P. (AS)

Şekil 15. Klinefelter sendromlu (47, XXY) olguya ait Giemsa bantlama yöntemi ile hazırlanmış karyotip

T A R T I Ş M A

Günümüzde tanısı konulabilen hastalıklar incelendiğinde, genetik hastalıkların sayısının az olduğu görülmektedir. Fakat tıbbi genetikteki hızlı gelişmeler sonucu, tanısı konulabilen hastalık sayısı artmaktadır.

Hastalık riski olan ailelere tıbbi yardım olanağı sağlamak, ailelere sağlıklı bebek sahibi olma şansı tanıyabilmek için, fetusun kromozomal sağlığının belirlenmesi son derece önemlilik arzeder. Bu husus, Devletin ve ailenin ekonomisine, sağlık planlarına oldukça önemli katkılar sağlar.

Bütün bu çalışmalar ve değerlendirmeler, ancak çok iyi organize olmuş sağlık kuruluşlarındaki prenatal tanı merkezlerinde gerçekleştirilebilmektedir. Bizde çalışmamızın sonunda ve uygulamada da gördük ki; yeterli finans ve yeterli donanımın mevcudiyetinde iyi eğitilmiş hekim, sitogenetik uzmanı, psikolog ve biyologtan oluşan ve çok iyi organize edilmiş bir ekip çalışması ile ancak; başarılı bir prenatal tanıya ulaşılabilen mümkün olabilmektedir.

Laboratuvarımızda değerlendirilen toplam 158 örnek materyalden 139'unda normal karyotip, 3'ünde dengeli translokasyon taşıyıcılığı, 3'ünde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlik, 2'sinde 45,X (Turner sendromu), 1'inde 47,XY,+21 (Down sendromu), 1'inde 47,XXY (Klinefelter sendromu) saptadık.

Toplam 2 kültürde yeterli hücre çoğalması olmaması nedeni ile sonuç alınamazken, 5'inin ise ilk 4-7'nci günlerinde kontamine olması başarılı sonuç almamıza engel olmuştur (Çizelge 2).

Bulgularımızı literatür bilgilerinin ışığında değerlendirdiğimizde:

A) Karyotip Amaçlı CVS :

Los F.J. ve arkadaşlarının (29) yapmış oldukları kromozom eldesi amaçlı CVS kültür çalışmalarında %6.3 oranında, Block ve arkadaşlarının (10) çalışmalarında ise % 14 oranında anormal karyotip saptamıştır.

Atıl ve arkadaşlarının (4) yapmış olduğu karyotip amaçlı 135 vakalık CVS serisinde anomali oranı %8.15 olarak bulunmuştur. Kontamine olan kültürleri yoktur. Yanlış pozitif ile plasenta ile sınırlı mozaizm %1.4 oranında tespit edilmiştir.

Serimizde anomalili karyotip oranı % 25 ve kontamine olan kültür oranı ise %8 'dir. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonucumuz yoktur.

Baltacı ve arkadaşlarının (6) kromozom eldesi amaçlı CVS kültürlerinde başarı oranları % 60 olmuştur. Aldıkları başarılı sonuçların %67'sinde normal karyotip ve % 33'ünde ise multiple anomali saptamışlardır.

Çalışmamızda başarı oranı %92'dir. Normal karyotip oranı %72, sayısal ve yapısal anomali saptanan karyotip oranı ise %28 'dir.

B) Karyotip Amaçlı AS :

Bal ve arkadaşları (5) üçlü taramaya göre riskli hastalarda yaptıkları çalışmalarında, %29.5 normal karyotip, İki vakada ise anöploidi tespit etmişlerdir. Öte yandan Shalev ve arkadaşları (40) %13.5'inde sayısal kromozom düzensizliği saptamışlardır.

Serimizde %63 oranında normal karyotip, % 2'sinde ise sayısal düzensizlik içeren karyotip saptadık. %1'inde üreme elde edemedik %4'ünde ise kültürler kontamine olduğundan değerlendiremedik.

C) Karyotip Amaçlı KS:

Costa ve arkadaşlarının (15) yaptıkları çalışmalarda, %16'sında kromozom anomalisi saptamışlardır. Ve Gosden ve arkadaşları (21) ise %24'ünde anomali saptamışlardır.

Serimizde, normal karyotip oranı %94 anomalili karyotip oranı %4'tür. %2'sinden ise sonuç alınamamıştır.

Çalışmamızın kapsadığı tüm seriden alınan sonuçlar, diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında çelişmedikleri ve başarılı oldukları gözlenmektedir.

S O N U Ç

Hazırlanan 158 örnek materyalin 74'ünde 46,XX, 65'inde 46.XY, 3'ünde 46,XX,t(4;10), 46,XX,t(6;7), 46,XY,t(2;15), (Dengeli translokasyon taşıyıcısı), 2'sinde 46,XX,9qh+, 3'ünde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlik, 2'sinde 45,X (Turner sendromu), 1'inde 47,XY,+21 (Down sendromu), 1'inde 47,XXY (Klinefelter sendromu) saptanmıştır. Toplam 2 olguya ait örnekte yeterli üreme olmadığından sonuç elde edilememiştir. Toplam 5 olgu ise kontaminasyon nedeniyle değerlendirilmemiştir (Çizelge 2).

Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonucumuz yoktur. Kültürde başarı oranımız % 96 olmuştur.

Bu çalışma sonunda ve uygulamada gördük ki; yeterli finans ve yeterli donanımın mevcudiyetinde iyi eğitilmiş hekim, sitogenetik uzmanı, psikolog ve biyologtan oluşan ve iyi organize edilmiş bir ekip çalışması ile ancak; başarılı bir prenatal tanıya ulaşılabilir.

Sonuçlarımızın diğer araştırmacıların sonuçları ile çelişmediği ve başarılı olduğu gözlenmektedir.

Çalışmamız prenatal tanı amaçlı CVS, AS ve KS tekniklerinin D.Ü.Tıp Fakültesi'nde rutin olarak uygulanmasını sağlamıştır.

Bu durumun, bir bölge hastanesi niteliğindeki D.Ü.Eğitim ve Araştırma Hastanesi için önemli bir kazanım olduğu açıktır.

Ö Z E T

Hazırlanan 158 örnek materyalin 74'ünde 46,XX, 65'inde 46.XY, 3'ünde 46,XX,t(4;10), 46,XX,t(6;7), 46,XY,t(2;15) şeklinde dengeli translokasyon taşıyıcılığı, 2'sinde 46,XX,9qh+, 3'ünde farklı metafazlarda tekrarlanmayan yapısal ve sayısal düzensizlik, 2'sinde 45,X (Turner sendromu), 1'inde 47,XY,+21 (Down sendromu), 1'inde 47,XXY (Klinefelter sendromu) saptanmıştır. Toplam 2 olguya ait örnekte yeterli üreme olmadığından sonuç elde edilememiştir. Toplam 5 olgu ise kontaminasyon nedeniyle değerlendirilmemiştir.

Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonucumuz yoktur. Kültürde başarı oranımız % 96 olmuştur.

S U M M A R Y

Material (CVS, AS, CB) from 158 patients were screened for prenatal diagnosis. 74 of them were found to have 46,XX and, 65 of them were found to have 46,XY chromosomal structure. 3 patients were found to have translocation such as; 46,XX,t(4;10), 46,XX,t(6;7), 46,XY,t(2;15) and, 2 patients were evaluated as 46,XX,9qh+ chromosomal structure. Nonrepeated structural and, numerical chromosomal aberrations were observed in different metaphases of 3 patients. 2 patients were found to have 45,X (Turner syndrome) and, 1 has 47 XXY (Klinefelter syndrome) chromosomal structure. Culture of 2 patients were unsuccessful and, no result has been obtained. Material from 5 patients were not evaluated due to contamination

None false positive and false negative results were obtained in our study. The success rate of culture was 96%.

K A Y N A K L A R

1. Alp, M. N.: Malignite ile tek gen mutasyonları ve kromozom düzensizliklerinin ilişkisi üzerine araştırmalar (Doktora tezi). Dicle Üniv. Tıp Fak., Diyarbakır, 1983.
2. Aras, N.: Kürtaj ve abortus materyalinden koryon (Chorion) villus biopsisi ile direkt kromozom analizi (Yüksek lisans tezi). Dicle Üniv. Tıp Fak., Diyarbakır, 1991.
3. Artan, S.: Prenatal tanıda kullanılan sitogenetik ve moleküler yöntemler. Gentam Bülteni. 4-5: 111, 1995.
4. Atıl, Y., Başaran, S., Ermiş, H., İbrahimoglu, L., Karaman, B., Kovancı, E., Apak, M.Y.: Koryon villus biopsisi deneyimlerimiz : İnvazif girişimler, sitogenetik sonuçlar ve fetal akibetler. T Klin Jineköl Obst., 6:6-17, 1996.
5. Bal, F., Yıldız, A., Yirmibeş, M., Taner, Z., Eskandari, R., Menevşe, S.: Üçlü test ile fetal down sendromu tanısında ilk sonuçlarımız. Perinatoloji Dergisi, 4(4):197-199, 1996.
6. Baltacı, V., Şaylı, B.S., Baltacı, A., Haberal, A., İmirzalıoğlu, N.: Missed abortus ve blighted ovum ön tanılı gebeliklerde terminasyon öncesi koryon villus örnekleme ile sitogenetik incelemeler. Perinatoloji Dergisi, 4(4):200-204, 1996.
7. Başaran, S., Aydınli, K., Miny, P., Holzgreve, W., Horst, J.: Transabdominal korion villus biopsisi: ikinci ve üçüncü trimesterde hızlı kromozom analizi için alternatif bir yöntem. Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi. 3:23-28, 1989.
8. Başaran, N.: Tıbbi Genetik. Bilim ve teknik yayınevi, Eskişehir, 1996.
9. Bevis, D.C.A.: The antenatal prediction of haemolytic disease of the newborn. Lancet, 1:395, 1952.

10. Block, W.A, Jr., Wolf, G.C., Best, R.G.: Chromosomal abnormalities in ectopic pregnancy chorionic villi. J Soc Gynecol Investig., 5(6): 324-6, 1998.
11. Buckton, K.E., Evans, H.J.: Méthodes d'analyse des aberrations chromosomiques humaines. Organisation Mondiale de la Santé, Gèneve, 1973.
12. Budak, T.: Güneydoğu Anadolu Bölgesinde sıklıkla kullanılan insektisidlerden Malathion ve Lindane'nin fare kromozomları üzerine *in vivo* etkilerinin araştırılması (Doçentlik tezi). Dicle Üniv. Tıp Fak., Diyarbakır, 1981.
13. Charrow, F., Nadler, H.L.: Prenatal diagnosis principles and practice of medical genetics. 145-147, 1985.
14. Clarck, B.A., Bissonnette, J., Olson, S.B., et al: Pregnancy loss in a small chorionic villus sampling series. Am j Obstet Gynaecol., 161:301, 1989.
15. Costa, D., Borrell, A., Soler, A., Carrio, A., Margarit, E., Balesta, F., Puerto, B., Caballin, MR., Fortuny, A.: Cytogenetic studies in fetal blood. Fetal Diagn Ther., 13(3): 169-75, 1998.
16. Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M., Forestier, F.: A new procedure for fetal blood sampling in utero preliminary results of fifty-three cases. Am J Gynaecol., 146:985, 1993.
17. Dellaloğlu, G.Y., Yardım, T., Yüce, A.: Prenatal teşhiste koryonik villus biopsisi. Trakya Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi. 4(2-3):209-213, 1987.
18. Department of obstetrics and gynecology, tietung hospital of anshan iron and steel Co. Anshan China: Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy. Chinese Med J., 1:117, 1975.
19. Fuchs, F., Riis, R.: Antenatal sex determination. Nature.117:330, 1956.
20. Goldberg, J.D., Golbus, M.S.: Koryonik villus örneklemesi. Queennan J.T., Hobbins, J.C.: Yüksek riskli gebeliklerde tanı ve tedavi protokolleri 3.baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara, 115-119, 1997.

21. Gosden, C., Rodeck, C.H., Nicoladies, K.H., Campbell, S., Eason, P., Sharp, J.C.: Fetal blood chromosome analysis: Some new indications for prenatal karyotyping. *Br J Obstet Gynaecol.*, 29(9): 915-20, 1985.
22. Gözükar, E.: *Biyokimya. Evin Matbaası, Malatya*, 1994.
23. Hahneman, N.: Early prenatal diagnosis: A study of biopsi techniques and cell culturing from extraembryonic membranes. *Clinical Genetics*. 6:294-306, 1974.
24. Hsu, T.C., Benirschke, K.: *An atlas of mammalian chromosomes. Volume I. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, New York*, 1967.
25. Jackson, L.S., Zachary, J.M., Fowler, S.E., Desnick, R.J., Golbus, M.S., Ledbetter, D.H., Mahoney, M.J., Pergament, E., Simpson, J.L., Black, S.: A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic villus sampling. The U.S. National Institute of Child Health and Human Development. Chorionic villus sampling and amniocentesis study grup. *N Engl J Med.*, 327:594-8, 1992.
26. Jurkovic, D., Jauniaux, E., Campbell, S., Pandya, P., Cardy, D.L., Nicolaides, K.H.: Coelocentesis. A new technique for early prenatal diagnosis. *Lancet*, 341:1623-4, 1993.
27. Kullander, S., Sandahl, B.: Fetal chromosome analysis after transcervical placental biopsies during early pregnancy. *Obstet Gynecol Scand.*, 52:355, 1979.
28. Lejeune, J., Levan, A.: Proposed standart system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet*, 1:1063, 1960.
29. Los, F.J., van den berg, C., Van opstal, D., Noomen, P., et al: Abnormal karyotypes in semi-direct chorionic villus preparations of women with different cytogenetic risks. *Prenat Diagn.*, 18(10): 1023-40, 1998.
30. Lüleci, G., Başaran, S., Bağcı, G., Keser, İ.: *Sitogenetik uygulama yöntemleri. Meteksan, Ankara*, 1990.
31. Mitelman, F.: *An international system for human cytogenetic nomenclature. Karger, Basel*, 1995.

32. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl Cell Res.*, 20:613, 1960.
33. Önderoğlu, L.S.: Fetal invazif girişimler: Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi. Güneş Kitabevi, Ankara, 1532-52, 1996.
34. Palmer, C.G., Miles, J.H., Howard-Peebles, P.N., Magenis, R.E., Patil, S., Friedman, J.M.: Fetal karyotype following ascertainment of fetal anomalies by ultrasound. *Prenatal Diagnosis*. 7:551-5, 1987.
35. Patau, K.: Chromosome identification and Denver report. *Lancet*, 1:933, 1961.
36. Plat, L.D., Devore, G.R., Lopez, E., Herbert, W.W., Falk, R., Alf, O.: Role of amniocentesis is ultrasound detected fetal malformations. *Obstet Gynecol.*, 68:153, 1986.
37. Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H.: Human cytogenetics. Constitutional analysis A Practical Approach. Oxford, 1992.
38. Ruschoff, J., Köhler, A., Chudoba, I., Steuber, E.D.: Investigations of chorionic villi after chorionic villus sampling (CVS). *Human Genetics*, 81:329-334, 1989.
39. Seer, D.M., Sachs, L., Danon, M.: Diagnosis of sex before birth using cells from the amniotic fluid. *Bul Res Council.*, 1(58):137, 1955.
40. Shalev, E., Zalel, Y., Weiner, E., Cohen, H., Shneur, Y.: The role of cordocentesis in assessment of mosaicism found in amniotic fluid cell culture. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 73(2):119-22, 1994.
41. Sipson, J.I., Elias, S.: Prenatal diagnosis of genetic disorders. In (eds): Creasy, R.K., Resnik, R.: *Maternal-fetal medicine principles and practise*. Philadelphia, 61-88, 1994.
42. Steele, M.W., Berg, W.R.: Chromosome analysis of human amniotic cells. *Lancet*, 1:383, 1966.
43. Şaylı, B.S.: Medikal sitogenetik. Yargıçoğlu Yayınevi, Ankara, 1986.
44. Şen, C.: Obstetrik ve jinekoloji sürekli eğitim dergisi. Cilt 1, sayı 1-2 İstanbul, 1997.
45. Tayşi, K., Say. B.: Tıbbi genetik. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A 12, Ankara, 1975.

6. Tjio, J.H., Levan, A.: The chromosome number of man. *Hereditas*, 42:1, 1956.
7. Tunçbilek, E.: Genetik danışma ve doğum öncesi tanı. *Katkı Pediatri Dergisi*, 18(5): 651-658, 1997.
8. Tümer, Ö.: Gen kehaneti ile belirlenen insanın kaderi. *Cumhuriyet Bilim Teknik*, 313; 4-5, 1993.
9. Vimal, C.M., Fenson, A.H., Heaton, D., Ward, R.H.T., Garrod, P., Penketh, R.J.A.: Prenatal diagnosis of argininosuccini caciduria by analysis of cultured chorionic villi. *Lancet*, 1:521-522, 1984.
10. Ward, R.H., Modell, B., Petrou, M., Karagözoğlu, F., Douratsos, E.: Chorionic villi in first trimester of pregnancy under guidance of real time ultrasound. *Br Med J.*, 286(6377):1542-4, 1983.
11. Wax, J.R., Blakemore, K.J.: Fetal blood sampling. *Obstet Gyn Clin North Am.*, 20(3):533-562, 1993.
12. Williamson, R., Eskdale, J., Coleman, D.V., Niazi, M., Loffler, F.E., Modell, B.M.: Direct gene analysis of chorionic villi: A possible technique for first-trimester antenatal diagnosis of haemoglobinopathies. *Lancet*, 21: 1125-1127, 1981.