

91687

OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'NA BAĞLI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

**KOMPERATİF GENOMİK HİBRİDİZASYON TEKNİĞİNİN
PRENATAL TANI DA UYGULANMASI**

DOKÜMANLAMA MERKEZİ

Doktora Tezi

Arş.Grv.Yavuz Hakan ÖZÖN

Danışman : Prof.Dr.Nurettin BAŞARAN

2000

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yavuz Hakan Özön' ün DOKTORA tezi olarak hazırladığı “Komperatif genomik hibridizasyon tekniğinin prenatal tanıda uygulanması” başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

11/12/2000

Üye: Prof.Dr.Nurettin BAŞARAN



Üye: Prof.Dr.Turgay ŞENER

Üye: Prof.Dr.Aynur ACAR



Üye: Prof.Dr.Mustafa SOLAK

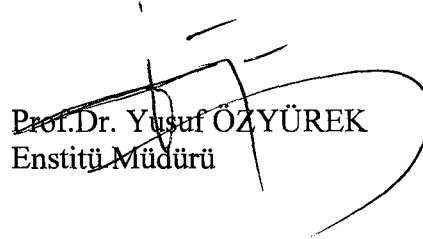


Üye: Doç.Dr.Sevilhan ARTAN



Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ~~14.12.2000~~ 14.12.2000 gün ve ~~494/1308~~ sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimi yaptığım süre boyunca ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde yol gösterip değerli bilgileriyle çalışmalarına katkıda bulunan hocam sayın Prof.Dr.Nurettin BAŞARAN'a, manevi olarak desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen anabilim dalımız başkanı sayın hocam Ayşe BAŞARAN'a, hasta akışındaki yardımlarından dolayı sayın hocam Prof.Dr.Turgay ŞENER'e, tüm tez çalışmaları sırasında aktif olarak hem laboratuarda tekniğin oturtulması hem de tezimin yazım aşamasında hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen sayın hocam Doç.Dr. Sevilhan ARTAN'a, çalışmalarım süresince maddi ve manevi her türlü yardımını gördüğüm sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e, bilim dalımız DNA laboratuvarı ile ilgili çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd.Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na ve Arş.Grv Dr. Oğuz ÇİLİNGİR ile Dr.Caner ATAMAN'a, bilim dalımız FISH ve Sitogenetik laboratuvar çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı sayın Uzm.Dr. Beyhan DURAK'a ve Arş.Grv.Dr. Işın KAYA'ya,

Bütün çalışmalarım boyunca maddi ve manevi yardımını yanımda bulduğum sevgili eşime teşekkürü bir borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Prenatal Tanı	5
2.1.1. Prenatal Tanının Tarihçesi	5
2.1.2. Prenatal Tanı Endikasyonları	6
2.1.3. Prenatal Tanı Teknikleri	7
2.1.3.1. İnvaziv Teknikler	7
a) Amniyosentez	7
b) Koryon Villus Örnekleme (CVS)	9
c) Kordosentez	10
d) Fetal Deri ve Karaciğer Biyopsisi	10
2.1.3.2. Noninvaziv Teknikler	10
a) Ultrasonografi	10
b) Maternal Serumda AFP Tayini ve Üçlü Testi	10
c) Maternal Dolaşımda Fetal Hücreler	11
2.2. Kromozom Düzensizlikleri	11
2.2.1. Sayısal Düzensizlikler	12
2.2.1.1. Poliploidi	12
2.2.1.2. Anöploidi	12
2.2.2. Yapısal Düzensizlikler	13
2.3. Genetik Analizler	13
2.3.1. Enzim Analizleri	13
2.3.2. DNA Analizleri (PCR; DOP-PCR)	13
2.3.3. Sitogenetik Analizler	18
2.3.3.1. Klasik Sitogenetik Analizler	18
2.3.3.2. Moleküler Sitogenetik Analizler (ISH; FISH)	18
2.3.3.3. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH)	20
2.3.3.3.1. CGH in Uygulama Alanları	26
2.3.3.3.2. CGH de ekipman	28
2.3.3.3.3. CGH de Görüntüleme	29
2.3.3.3.4. CGH de Değerlendirme	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1. Gereç	31
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri	31
3.1.2. Araç ve Gereçler	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Materyal Alımı	31
3.2.2. Amniyositlerde/CVS de Direkt Analizler (CGH Analizleri)	32

İÇİNDEKİLER DİZİNİ'nin devamı

	<u>Sayfa</u>
3.2.2.1. CGH için AS ve CVS den DNA Ekstraksiyonu	32
3.2.2.2. Normal Erkekten Kontrol DNA İzolasyonu	34
3.2.2.2.1. Fenol/Kloroform Kullanarak Kontrol DNA İzolasyonu	34
3.2.2.2.2. İzole Edilen DNA Miktarının Ölçümü	36
3.2.2.2.3. CGH İçin Normal Metafaz Prepatlarının Hazırlanması	36
3.2.2.4. CGH Tekniğinin Uygulanması	39
3.2.2.4.1. İzole Edilen DNA Örneklerinin DOP-PCR ile Amplifikasyonu	39
3.2.2.4.2. DOP-PCR I İçin Kullanılan Amplifikasyon Şartları	40
3.2.2.4.3. Elde Edilen PCR Ürününün Jelde Görüntülenmesi	40
3.2.2.4.4. Elde Edilen DNA ların PCR İşaretleme İle İşaretlenmesi	40
3.2.2.4.5. DOP-PCR II (PCR Labelling) Amplifikasyon Şartları	41
3.2.2.4.6. PCR Labelling İle Elde Edilen PCR Ürününün Jelde Görüntülenmesi	41
3.2.2.4.7. DOP-PCR I için Kullanılan Primer Dizisi	41
3.2.2.4.8. DOP-PCR II İçin Kullanılan Primer Dizisi	41
3.2.2.4.9. Elde Edilen İşaretli DNA ların Çöktürülmesi	41
3.2.2.4.10. Denatürasyon	42
3.2.2.4.11. Hibridizasyon	43
3.2.2.4.12. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	43
3.2.2.4.13. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi	43
3.2.2.4.14. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	44
3.2.3. Amniyon Sıvısından Elde Edile Hücrelerin Uzun Süreli Kültürü (Kontrol)	44
3.2.4. Metafaz Plaklarının Bantlanması	46
3.2.4.1. GTG Bantlama	46
3.2.4.2. C-Bant (Sentromer Bantlama)	46
4. BULGULAR	54
4.1. DNA Ekstraksiyonu ve DOP-PCR Arasındaki İlişki	54
4.2. Normal Metafaz Plaklarının Morfolojik Özellikleri ve Doğru Denatürasyon Arasındaki İlişki	56
4.3. CGH in Optimizasyonu	57
4.4. Test DNA larında CGH Analiz Bulguları	58
4.5. Kültüre Edilmemiş Amniyositlerden/ CVS den Elde Edilen CGH Bulgularının Rutin Sitogenetik Analizlerle Karşılaştırılması	59
5. TARTIŞMA	71
5.1. DNA Ekstraksiyonu ve DOP-PCR Arasındaki İlişki	72
5.2. Normal Metafaz Plaklarının Morfolojik Özellikleri ve Doğru Denatürasyon Arasındaki İlişki	73
5.3. CGH in Optimizasyonu	73
5.4. CGH in Duyarlılığı	74
5.5. CGH in Uygulama Alanları	74

İÇİNDEKİLER DİZİNİ'nin devamı

	<u>Sayfa</u>
5.6 CGH in Sınırlamaları	74
6. SONUÇ	76
KAYNAKLAR DİZİNİ	79
ÖZGEÇMİŞ	90



ÖZET

Bilindiği gibi, yenidoğanlarda gözlenen kromozom anomalilerinin çoğunluğu 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ilişkin anöploidilerdir. Bu düzensizlikler prenatal olarak tanısı konan kromozom anomalilerinin % 95 ini oluştururlar. Amniyosentez ya da CVS den gerçekleştirilen tam karyotip analizi, kromozom sendromları bakımından risk altında olan gebelerde uygulanan bir yöntemdir. Ancak bu teknik hem zaman alıcı hem de emek yoğunudur. CGH tekniğinin kültüre edilmemiş hücrelerin DNA ları ile kullanılabilmesi, kromozom anöploidilerinin araştırılmasında yeni bir çağ başlatmıştır.

Bu çalışmada, kültüre edilmeyen amniositler ve/veya CVS örneklerinde bu örneklerle CGH uygulanarak fetal cinsiyet ve anöploidi tayini amaçlanmıştır. Amniyosentez/ CVS için endike olan 40 gebeden alınan amniyotik sıvı örneği CGH ile değerlendirilmiştir ve elde edilen bulgular standart sitogenetik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Toplam 40 örneğin 38 inde başarılı sonuç alınmış (% 95) olup bu 38 örneğin hepsinde fetal cinsiyet ve anöploidik fetus tanısı, sitogenetik bulgular ile paralellik göstermiştir. Yanlış pozitif ve yanlış negatif bulgulara rastlanmamıştır. Ayrıca her örnek için metafazlardaki sinyal yoğunlukları değerlendirilmiştir.

Bu araştırma, kültüre edilmemiş amniyotik sıvı hücrelerinde ve/veya trofoblastlarda CGH tekniğinin güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini ve özellikle ileri gebelik dönemlerinde fetal tanıya ulaşabilmek için tercih edilebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler : Prenatal tanı, amniyosentez, kültüre edilmemiş amniyotik sıvı hücreleri, CVS, kromozom anomalileri, anöploidi, trizomi, cinsiyet kromozomları, komperatif genomik hibridizasyon, sitogenetik.

SUMMARY

As it is known, the majority of chromosome abnormalities in newborn related aneuploidies of chromosomes 13, 18, 21, X and Y, are nearly 95 percent of all the chromosome abnormalities diagnosed prenatally. Full karyotype analysis from amniocentesis and/or CVS have been performed to the pregnancies at risk for chromosomal syndromes. However it is time consuming and labour-intensive. Comparative Genomic Hybridization (CGH) employed to uncultured cells has a new to investigate chromosome aneuploidies.

In this study, we report the results of the first study evaluated the DNA of these samples for CGH analysis of uncultured amniocytes/CVS. The results of 40 amniotic fluid samples/CVS were analysed by CGH and the results were compared with the ones from standart cytogenetics were compared to each other. CGH allowed accurate sex and chromosome enumeration in 38 uncultured amniocytes/ trophoblasts (95%), consistent with the result obtained by traditional cytogenetic analysis. Neither false positive nor false negative results were obtained. Moreover, the signals/nucleus for each probe was also evaluated.

This experience demonstrates that CGH can provide a rapid and accurate clinical method for prenatal idendification of chromosome aneuploidies and sexes.

Key words : Prenatal diagnosis, amniosentesis, uncultured amniotic fluid cells, CVS, chromosome aberrations, aneuploidy, trisomy, sex chromosomes, comparative genomic hybridization, cytogenetics.

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) ana basamakları.	17
Şekil 2.2	CGH protokolü.	22
Şekil 2.3	CGH in şematik gösterimi.	23
Şekil 2.4	Prostat kanserli bir olgudan elde edilen test DNA nın kontrol DNA ile hibridizasyondan sonra ortaya çıkan yeşil/kırmızı floresan oranını gösterir şekil.	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Prenatal tanı endikasyonlarına göre uygulanması gereken Analizler	2
Çizelge 2.1 Prenatal tanı endikasyonları	6
Çizelge 2.2 Prenatal tanı teknikleri	7
Çizelge 2.3 DNA analizleri ile prenatal tanı	14
Çizelge 3.1 Fenol/Kloroform ve İzamilalkol/Kloroform yöntemi ile DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar	47
Çizelge 3.2 CGH analizi normal metafaz plakları için preparat hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar	48
Çizelge 3.3 Preparatların ön yıkamasında kullanılan solüsyonlar	49
Çizelge 3.4 Denatürasyonda kullanılan solüsyonlar	49
Çizelge 3.5 Hibridizasyon sonrası yıkamalarda kullanılan solüsyonlar	49
Çizelge 3.6 Görüntüleme sistemlerinde kullanılan solüsyonlar	50
Çizelge 3.7 Amniyosit kültüründe kullanılan besi yerlerinin hazırlanışı	50
Çizelge 3.8 GTG de kullanılan tamponlar	50
Çizelge 3.9 GTG bantlamada kullanılan solüsyonlar	51
Çizelge 3.10 Uzun süreli amniyon kültürü yönteminde kullanılan solüsyonlar	51
Çizelge 3.11 Kimyasal maddeler	51
Çizelge 3.12 Aygıtlar	52
Çizelge 4.1 Normal metafaz yaymalarının %70 formamid solüsyonunda değişik ısı ve süre ile denatürasyonları ve etkileri.	57
Çizelge 4.2 Olguların yaş, PT endikasyonu, gestasyonel yaş ve CGH ile sitogenetik tanıları içeren çizelge	60

GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Grafik 4.1 Erkek olguda X e ait CGH oran profili.	62
Grafik 4.2 Dişi olguda X e ait CGH oran profili.	62
Grafik 4.3 Erkek olguda Y ye ait CGH oran Profili.	62
Grafik 4.4 Dişi olguda Y ye ait CGH oran Profili.	62
Grafik 4.5 Normal erkek bir olguda tüm kromozomlara ait birden fazla metafazın CGH oran profilleri	63
Grafik 4.6 Normal bir olguda 21 numaralı kromozomun CGH oran profili.	65
Grafik 4.7 Trizomik olguda 21 numaralı kromozoma ait CGH oran profili.	65
Grafik 4.8 1 numaralı kromozomun q42.11-q44 bölgesinde artışı ifade eden CGH oran profili	67
Grafik 4.9 Normal olguda 1 numaralı kromozoma ait CGH oran profili	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ACHE	Asetil Choline Esteras
AFP	Alfa-feto protein
C	Sitozin
CCD	Cooled Charged
cDNA	Komplementer DNA
CGH	Comperative Genomic Hybridization
CVS	Chorionic Villus Sampling
dATP	deoxy Adenosine Tri Phosphate
dCTP	deoxy Ciytidine Tri Phosphate
dGTP	deoxy Guanosine Tri Phosphate
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
dTTP	deoxy Thymidine Tri Phosphate
dUTP	deoxy Uridin Tri Phosphate
ddUTP	di deoxy Uridine Tri Phosphate
Dig.	Digoxigenin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetat
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FITC	Fluoresance Iso-tiocyanate
G	Guanin
GTG	Giemsa Tripsin Giemsa Bantlama
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HCL	Hidroklorik asit

ISH	In Situ Hibridizasyon
KCl	Potassium Chlorur
lt	Litre
M	Molarite
mg	miligram
µg	mikrogram
ml	mililitre
µl	mikrolitre
mRNA	Ulak RNA
mM	mili Molar
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH ₄ Ac	Amonyum asetat
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NT	Nick Translation
NTP	Nükleotid Tri Phosphate
OD	Optik dansimetre
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PI	Propidium Iodide
PT	Prenatal Tanı
Q-band	Quinacrin Boyama
RNA	Ribonükleik asit
RP	Random Priming

Rpm	Rotation Per minute
SAb	Spontan Abortus
SDS	Sodyumdodesil sülfat
SF	Serum Fizyolojik
SSC	NaCl Trisodium Citrate
T	Timin
TAE	Trisasetikasit EDTA
TN	Tris NaCl
TNT	Tris NaCl Tween 20
u	Unit
uE3	unconjugated Euostriol
US	Ultrasound
UV	Ultraviyole
UTP	Uridin Tri Phosphate
V	Volt

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 4.1.1 DOP-PCR I sonrasında DNA ların %1.2 lik jeldeki görüntüleri.	55
Resim 4.1.2 DOP-PCR II sonrasında işaretli DNA ların %1.2 lik jeldeki görüntüleri.	55
Resim 4.2 DOP-PCR sonrası sonuç alınamayan bir olguda jel görüntüsü.	56
Resim 4.3 Normal Dişi bir olguda CGH de karyotip görüntüsü.	63
Resim 4.4 Normal bir olguda aynı metafazın multicolor, FITC, Texas RED ve DAPI görüntüsü.	64
Resim 4.5 Trizomik bir olgunun CGH te metafaz ve karyotip görüntüsü.	66
Resim 4.6 1 numaralı kromozomun q kolunda terminal bölgede artış saptanan olgunun CGH metafaz ve karyotip görüntüsü	68
Resim 4.7 Normal dişi olguda karyotip.	69
Resim 4.8 Normal erkek olguda karyotip.	69
Resim 4.9 CGH te trizomi 21 olduğuna karar verilen olgunun karyotipi.	70
Resim 4.10 CGH te 1q+ olarak değerlendirilen olgunun karyotip sonucu.	70

1. GİRİŞ

Gelişmiş ülkelerde çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar kontrol altına alındıktan sonra anomalili doğumlarda ve erken yaş çocuk ölümlerinde kalıtsal hastalıkların ne kadar etkisi olduğu daha iyi anlaşılmış durumdadır. Ebeveynlerden çocuklarına aktarılan yada sporadik olarak ortaya çıkan, fakat daha sonraki jenerasyonlara aktarılan kalıtsal veya genetik dediğimiz hastalıklarda prognoz, çok ağır fiziksel ve/veya mental handikabı da kapsayan çok kötü bir seyir izlemektedir (41).

Genetik hastalıkların bazı tipleri yaşamla bağdaşmadığından gebelik sırasında atılırken bir bölümü doğumdan sonra erken dönem çocuk ölümleriyle sonuçlanmaktadır. Bu gerçekleri sayılarla ifade edersek, tüm konsepsiyonların % 20 kadarında ve tüm spontan abortusların % 50-60 kadarında yaşamla bağdaşmayan kromozom düzensizlikleri, özellikle de trizomiler mevcuttur. Perinatal dönem bebek ölümleri arasında ise bu oran % 5.8 dir. Yaşamla bağdaşabilen genetik düzensizliklerde ise çok ağır fiziksel/mental yetersizlik öyküsü söz konusudur ki bu klinik öyküye sahip bireyler arasında kromozom anomali oranı % 5.8 dolaylarındadır (41).

Kalıtsal hastalıklı doğan bir bireyin yaşadığı sürece tedavi ve eğitimi için harcanan paraların özellikle aileyi büyük bir yük altına soktuğu aşikardır. Diğer yandan genetik hastalıklı kişiler toplum bazında değerlendirildiğinde ise bunların tedavi/eğitim ve rehabilitasyonu için harcanan miktarlar ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir (41).

Tüm bu verilerin ışığı altında, bu hastalıkların ortaya çıkmasını önlemek ve sağlıklı bireylerin yetişmesini sağlamak amacıyla doğacak çocuğun doğmadan önce anne karnında incelenmesi fikri doğmuştur. İlk olarak 1970 lerde fetal cinsiyet tayini ile başlayan uygulama günümüze kadar çok hızlı bir gelişme göstermiş olup bugün moleküler patolojisi bilinen genetik düzensizliklerin büyük bir bölümünün fetal tanısı konabilmekte ve hatta birkaç gen dizisindeki mutasyonlardan kaynaklanan hastalıkların tedavisi yapılabilmektedir (92).

Yukarıda da ifade edildiği gibi, prenatal tanı doğum öncesi dönemde fetusun incelenmesidir. Ancak bu ifade anomalili fetusun yaşamının sonlandırılması, sağlıklı olanların yaşatılması şeklinde anlaşılmamalıdır. Prenatal tanı ile genetik hastalıklar bakımından risk altında olan ailelere sağlıklı çocuklara sahip olma şansının tanınması amaçlanmaktadır (6).

Bugün gebeliğin her döneminde gerçekleştirilebilen ve fetusu direkt yada indirekt olarak incelemeyi olanaklı kılan birçok prenatal tanı yöntemi vardır. Bu yöntemler Çizelge 1.1 de verilmiştir (5, 23).

Çizelge 1.1 Prenatal tanı endikasyonlarına göre uygulanması gereken analizler

Endikasyon	Analiz
<i>İleri maternal yaş</i>	<i>Kromozom</i>
<i>Eşlerden biri dengeli translokasyon taşıyıcısı</i>	<i>Kromozom</i>
<i>Önceki çocuklarda kromozom anomalisi</i>	<i>Kromozom</i>
<i>Ailede kalıtsal metabolik hastalık öyküsü</i>	<i>Enzim./DNA</i>
<i>Ailede hemoglobinopati öyküsü</i>	<i>DNA</i>
<i>Ebeveynlerde gen mutasyonu bakımından taşıyıcılık</i>	<i>DNA</i>
<i>İki yada daha fazla abortus öyküsü</i>	<i>Kromozom</i>
<i>Maternal serumda patolojik üçlü test sonucu</i>	<i>Kromozom</i>
<i>Patolojik ultrason bulgusu</i>	<i>Kromozom</i>

Yukarıda ifade edilen doğum öncesi tanı yöntemleri fetusun incelenme amacına göre değişiklik gösterir. Gebeliğin kromozom yada gen aberrasyonlarından kaynaklanan bir hastalık bakımından risk altında olması veya ultrason ile incelemede fetusta malformasyonların saptanması gibi durumlarda, fetusun direkt olarak incelenmesi kaçınılmazdır ki bu analizlerde gestasyonel döneme, plasental lokalizasyona göre çeşitlilik gösterir(5, 23, 41).

Bugün rutinde kullanılan invaziv prenatal tanı teknikleri; koryon villus örnekleme (gestasyonun 8-12 nci haftaları) , amniyosentez (gestasyonun 14-20 nci haftaları) ve fetal kan örnekleme=kordosentez (gebeliğin 17 nci haftasından sonra) dir. Bu yöntemlerle alınan örneklerde kromozom, DNA ve enzimatik analizler gerçekleştirilebilmektedir (4, 7, 8).

Genetik hastalıkların kesin tanısını koyabilmek için geliştirilen sitogenetik ve moleküler analizler çok büyük bir ivme ile ilerlemekte olup geliştirilen yeni yöntemler doğum öncesi analizlere de yansımaktadır (23).

Doğum öncesi tanı yöntemlerindeki ana yaklaşım, gestasyonun mümkün olabilecek en erken döneminde doğru ve güvenilir tanıyı en kısa süre içerisinde koyabilecek tekniklerin uygulanmasıdır. İnvaziv tekniklerin herhangi biri aracılığı ile alınan fetal örneklerde sitogenetik analiz için her zaman fetal hücrelerin kültüre edilmesi gerekmektedir. Yukarıda ifade edilen gelişmeler sayesinde sitogenetik ve moleküler analizlerin birlikte kullanılabildiği teknik olan *floresan in situ hibridizasyon* (FISH) bu problemin bir miktar çözümlenmesini sağlamıştır. FISH tekniğinde interfaz nükleuslarında bir kromozomun ve/veya genin kopya sayısı çok kısa süre içerisinde yüksek doğrulukla belirlenebilmektedir. İnterfaz nükleuslarında analizin yapılabiliyor

olması, fetal hücre kültürü zorunluluğunu ortadan kaldırması nedeniyle çok kısa bir süre içerisinde geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Ancak prenatal FISH analizinde tüm fetal genom değil, sadece hücrelerin hibridizasyona sokulduğu problemlerin spesifik olduğu kromozomlar ve/veya kromozom bölgeleri incelenebilmektedir. Çok sık görülen 13, 18, 21 ile X ve Y kromozomlarının sayısal değerlendirilmelerinde efektif olarak kullanılabilmeyle birlikte fetal kromozom kuruluşunun değerlendirilmesinde konvensiyonel sitogenetik analizlerin uygulanması gereklidir (5, 6, 22).

Kanser sitogenetiğinde, kromozomlardaki yapısal anomalilerin doğru olarak tanımlanması için yetersiz olması, büyük güçlüklerle karşılaşılması yeni yöntem arayışlarını beraberinde getirmiştir. Bu arayışlar bünyesinde geliştirilen sitogenetik ve moleküler analizlerin birlikte kullanıldığı Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (=“*Comperative Genomic Hybridization*”; CGH) kanser genetiğinde bu sorunun çözülmesini sağlamıştır. Kallioniemi ve arkadaşları tarafından (1992) uygulamaya sokulan CGH tekniğinde amaç, olgu DNA sının normal DNA ile hibridizasyonu aracılığı ile olgu DNA sındaki kopya sayısı artış ve eksilmelerin tek bir deney ile ortaya konmasının sağlanmasıdır. Konvensiyonel sitogenetik analizler ile standart FISH analizlerine göre hücre kültürünün gerekmiyor oluşu ve tek bir deneyde tüm genomun değerlendirilebilmesi açısından avantajları olan bu tekniğin uygulama alanlarının yakın gelecekte çok daha yaygınlaşacağı görüşü hakimdir (4, 7, 8, 14, 73).

Bu çalışmada henüz çok yeni bir yöntem olan Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) tekniğinin prenatal tanıdaki kullanımı ve doğruluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Fetal örneklerin CGH tekniği ile değerlendirilmesinde,

- a) Fetal cinsiyetin doğru belirlenmesi,
- b) Varsa kromozom anöplodilerinin saptanması,
- c) Yapısal kromozom aberasyonlarının değerlendirilmesindeki duyarlılığı incelenmiştir.

Çalışmanın kontrolü ise CGH uygulanan örneklerin uzun süreli kültüre tabi tutulması sonucu rutin sitogenetik incelemelerinin gerçekleştirilmesiyle sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Genetik hastalıklar tüm insanlığı etkileyen ve yaşamın varolduğu tarih öncesi dönemlerden beri fiziksel/mental yetersizliklerle morbiditede etkili olan hastalıklar arasındadır. Ancak kalıtsal hastalıkların çocukluk dönemi yetersizlikler ile mortalitede ne kadar etkili olduğu çevresel faktörlerle oluşan hastalıkların kontrol altına alınmasıyla ortaya çıkmıştır. İnfant mortalite oranına ilişkin veriler bu gerçeği gayet güzel açıklamaktadır. 1900 lü yıllarda her 1000 canlı doğumdan 154 ü yaşamlarının birinci yılında ölmüşlerdir ki bu dönemlerde genetik bir hastalıktan kaynaklanan ölüm oranı 4.5/1000 dir. Bu oranlar 1986 da incelendiğinde infant ölüm oranı 9.6/1000 lere düşmüş ancak genetik kaynaklı ölümlerdeki oranlarda bir düşüşe rastlanmamış olup aksine, infant ölüm oranında genetik katılımın payı % 3 lerden %50 lere yükselmiştir. Bununla birlikte aynı durum fetal kayıplar ve ileri çocukluk dönemleri ile erişkinlikte ortaya çıkan ölümlerde de gözlenmiştir (21).

Tüm konsepsiyonların en az % 20 kadarında bir kromozom anomalisi söz konusudur. Kromozom düzensizliklerinin büyük bölümü yaşamla bağdaşmadığından, özellikle gebeliğin ilk trimesterinde spontan abortlarla (SAb) atılırlar. Bu nedenledir ki ilk trimester SAb ların %50-60 kadarında bir kromozom aberasyonu söz konusudur. Aynı zamanda bu erken dönem kayıplarda gözlenen majör konjenital anomali oranı (%10-15) yenidoğanlarda gözlenen orandan (% 3) fazladır (5, 7).

Ölü doğumların hemen hemen yarısı, erken neonatal ölümlerin % 20 kadarında majör konjenital anomali söz konusudur. Genetik hastalıklar, çocuk ölümlerinin % 50 si ve pediatri servisinde tedavi gören çocukların 1/3 kadarından sorumludur. Çocukların % 3-4 kadarında ağır, % 0.4 kadarında orta düzeyde mental retardasyon, % 1-2 kadarında ise fizik yetmezlik durumu söz konusu olup bu handikapların büyük bölümündeki etyoloji genetik kökenlidir (31).

Genetik komponenti ağır basan kronik hastalıklar erişkin popülasyonunun %10-20 kadarını, kanser gibi somatik hücre düzensizliği ise %25 kadarını etkiler (5).

Yukarıda ifade edilen tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde 25 yaş temel alınırsa her 20 kişiden 1 inde genetik orijinli bir hastalık öyküsü bulunmaktadır.

Çok ağır fiziksel ve mental handikaplar nedeniyle kötü prognoza sahip genetik hastalıkların ortaya çıkmasının önlenmesi kuşkusuz gerek aileler gerekse toplum için son derece önemlidir. Zira bu hastalıkların tedavi-eğitim ve rehabilitasyonu için harcanan paralar çok büyük miktarlardadır. Ayrıca fiziksel ve mental yetmezlikleri nedeniyle bu bireyler üretici duruma geçememektedir. Bu nedenle tüm hastalıklarda olduğu gibi genetik hastalıkların da ortaya çıkmasını önlemek çok önemlidir (5,7).

Hastalık ve tedavi arasındaki ilişki aşıkardır. Bireylerin gerekli önlemler alınıp tedavi edilerek hastalıktan kurtulma şansı yüksektir. Ancak genetik hastalıklarda durum biraz daha

komplekstir. Birkaç konjenital malformasyon (kardiyak defektler,yarık dudak/damak gibi) ile bazı kalıtsal metabolik hastalıklar dışında genetik orijinli hastalıkların tedavisi bugün için mümkün değildir. Dolayısıyla anomalili genotipin ortaya çıkmasını önlemek için, ya konsepsiyon dışında bazı işlemlerin yapılmasını engellemek yada gebelik durumunda fetusun incelenerek genotip tayininin yapılmasını (sekonder önlem) gerektirir. İşte burada karşımıza prenatal tanı çıkmaktadır (5,7).

2.1. Prenatal Tanı

Genel anlamıyla prenatal tanı (PT) embriyo/fetusun kendi bulunduğu ortam içerisinde değişik özellikler bakımından değerlendirilmesi, sağlık durumunun incelenmesidir (23, 31, 37).

PT embriyonik ve fetal tanının tüm yönlerini kapsamaktadır (23, 37). Bugün genetik hastalıklarda prenatal tanının amacı, tedavisi olanaksız kalıtsal hastalık ve malformasyonları gebeliğin erken dönemlerinde tanımak ve ailenin vereceği karar doğrultusunda yasal süre içerisinde gebeliği sonlandırmak yada tedavi edilebilenleri tedavi etmektir. Ancak burada vurgulanması gereken nokta ; prenatal tanının esas amacının anomalili bir fetusun doğumunun engellenmesi değil, tedavisi olanaksız, yaşam boyunca kısıtlı ağır bedensel ve zihinsel özürlere neden olan hastalıklar bakımından yüksek risk altında bulunan çiftlere, sağlıklı çocuklara sahip olma şansının verilmesi olduğudur (22, 23, 30, 31, 37).

2.1.1. Prenatal Tanının Tarihçesi

Prenatal Tanının tarihi 19 uncu yüzyıla kadar uzanmaktadır. İlk kez 1882 yılında Schatz tarafından hidroamnioslu bir vakada amniyosentezin uygulanması doğum öncesi tanı kavramının gelişmesine öncülük etmiştir. Ancak bu alandaki uygulamalar 1950 li yıllardan itibaren rutine girmeye başlamıştır. Bevis,1950 ve 1952 yıllarında eritroblastosis fetalisin teşhisi için üçüncü trimesterde amniyosenteze başvurarak ilk gerçek anlamdaki doğum öncesi tanı olgusunu bildirmiştir. Bu alandaki uygulamalar devam etmiş, anne-fetus kan uyumsuzluğunun doğum öncesi tanısı pek çok araştırmacı tarafından başarıyla uygulanmıştır. Bu hastalığın PT sına ilişkin uygulamalar devam ederken, 1963 yılında Liley ve arkadaşları fetal abdomenden kan transfüzyonu ile gerçek anlamda ilk prenatal tedaviyi gerçekleştirmiş ve bunu diğerleri izlemiştir (23, 92).

Genetik orijinli analizler, 1956 yılında Tijo ve Levan ın insan lenfositlerinde yaptıkları çalışmalarda diploid kromozom sayısının 46 olduğunu bildirmeleri ile başlamış, 1959 yılında ilk kromozomal hastalığın tanısı (trizomi 21) konmuştur. Bu arada 1949 yılında Barr ve Bertram ın, erkek hücrelerinde olmayıp sadece dişi hücrelerinde bulunan ve oldukça koyu boyanan bir kromatinin olduğunu bildirmeleri, gebelik döneminde fetal cinsiyet tayinine temel oluşturmuş ve 1960 yılında Riis ve Fuchs tarafından amniyotik sıvıdan fetal cinsiyet tayini gerçekleştirilmiştir (5, 92).

Fetal cinsiyetin doğru olarak tanımlanması ile atılan ilk büyük adım genetik amaçlı PT analizlerine ilişkin çalışmalara bir ivme kazandırmıştır. Amniyotik sıvı hücrelerinin kültüre edilmesi ile kromozom elde etme yöntemlerinin geliştirilmesi PT alanında yoğun çalışmalara önderlik etmiştir. Kromozom analizi amaçlı amniyosentez ilk olarak 1966 yılında başarıyla uygulanmış, bunu 1967 de translokasyon taşıyıcısı bir fetus ve trizomi 21 li bir fetusun tanısı izlemiştir (92).

Amniyosentezin gebeliğin ikinci trimesterinden itibaren yapılıyor olması ve fetal genotipin belirlenmesi için 3-4 haftalık bir sürenin gerekliliği, araştırmacıları ay olarak gebeliğin daha erken dönemlerinde uygulanabilecek bir invaziv PT tekniği arayışına yöneltmiştir. Bu arayış 1983 yılında Simoni ve arkadaşlarının gebeliğin ilk trimeseterinde başarıyla uygulanabilen koryon villus örneklemesinin (CVS) doğmasına yol açmıştır. Bu yöntem PT ile ilgilenen tüm merkezlere bir heyecan getirmiştir (31, 67, 92).

2.1.2. Prenatal Tanı Endikasyonları

Prenatal tanı denilince akla ilk olarak fetus hangi durumlarda yüksek risk altındadır ve PT nın mutlaka yapılması gerekliliği ? sorusu gelmektedir. PT endikasyonları gebelik öncesinde belirlenen ve gebelik esnasında ortaya çıkan endikasyonlar olmak üzere iki ana grup altında toplanırlar :

Çizelge 2.1 Prenatal tanı endikasyonları (22, 23, 35, 86).

<i>Gebelik öncesinde belirlenen endikasyonlar</i>	<i>Gebelik sırasında ortaya çıkan endikasyonlar</i>
<i>İleri maternal yaş</i>	<i>Maternal serumda üçlü testin riskli durum ifade etmesi (AFP, uE3, hCG)</i>
<i>Önceki çocuklarda kromozom düzensizliğinin bulunması</i>	<i>Ultrasonografik değerlendirmede patolojik bir bulgu ile karşılaşılması</i>
<i>Ebeveynlerin dengeli translokasyon taşıyıcısı olması</i>	<i>Ailede yakın akrabalık yada önceki çocuklarında nöral tüp defektinin bulunması</i>
<i>Ailede kalıtsal metabolik hastalık öyküsünün bulunması</i>	<i>Ankisyete</i>
<i>Ailede hemoglobinopati öyküsünün bulunması</i>	
<i>iki yada daha fazla spontan abortus öyküsünün bulunması</i>	

Yukarıda da ifade edildiği gibi görülme olasılığı yüksek olan genetik hastalıklar çok çeşitlidir ve bu çeşitliliğe paralel olarak doğum öncesi ve sonrası endikasyonları da değişkendir. Bu nedenle prenatal tanı kararı almadan önce fetusun risk altında bulunduğu

düzensizlik kesin olarak belirlenmelidir. Çünkü her genetik düzensizlik için farklı bir analiz ile tanıya gidilmektedir (Bkz. çizelge 1.1).

2.1.3. Prenatal Tanı Teknikleri

Risk altındaki gebeliklerde fetusun direkt yada indirekt olarak gebeliğin her döneminde incelenbilmesini olanaklı kılan bir doğum öncesi tanı tekniği mevcuttur. Fetusun direkt yada indirekt olarak değerlendirilmesine göre bu teknikler invaziv ve noninvaziv olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır (23, 86) .

Çizelge 2.2 Prenatal Tanı Teknikleri (4, 8, 22, 23, 30, 31, 76, 86).

İnvaziv teknikler	Noninvaziv teknikler
<i>Amniyosentez</i>	<i>Ultrason</i>
<i>CVS</i>	<i>Dopler</i>
<i>Fetal kan örneklemesi</i>	<i>Maternal serumda AFP/ACH E tayini</i>
<i>Fetal deri biyopsisi</i>	<i>Maternal kanda fetal hücrelerin incelenmesi</i>
<i>Fetal karaciğer biyopsisi</i>	

2.1.3.1.İnvaziv Teknikler

a) Amniyosentez

Amniyosentez transabdominal olarak ultrasonografi eşliğinde amniyon boşluğuna girilerek her hamilelik haftası için 1 ml olacak şekilde amniyon sıvısının aspire edilmesidir (22, 23, 30, 67).

Steele ve Breg' in 1966 yılında amniyotik sıvıdaki fetal hücreleri başarılı bir şekilde kültüre etmeleri ile tüm dünyada gün geçtikçe daha yaygın bir halde kullanılan bu yöntemin esası, fetusun deri ve boşaltım organlarından amniyotik sıvıya dökülen hücreleri elde ederek hücre kültüründe üretilmesi ve bu hücrelerde fetal cinsiyet, kromozom, DNA ve enzimatik analizlerin yapılmasına dayanır.

Gestasyonun 17-18 inci haftalarına kadar amniyotik sıvıdaki hücrelerin %60-70 kadarı embriyonik ve trofoblast kökenlidir. 17 nci hafta dolaylarında fetal deri matür epitel halini almaya başlar, bu arada fetal yutkunma ve idrar üretimi idrarın üriner kanaldan akışı

başlamıştır. Bu faaliyetler ile fetal deri, üst solunum ve ürogenital yollara ait hücreler sıvıda serbest duruma geçerler. Bu hücrelerin çoğunluğu ölü hücrelerdir. Ancak aralarında canlılığını koruyan hücreler de vardır ki gestasyonun 16 ncı haftası civarında canlı/ölü hücre oranı maksimumdur. Bu nedenle amniyosentezin uygulanması için optimal dönem 15-16 ncı hafta dolaylarında başlar. Sıvıda serbest halde dolaşan bu canlı hücrelerin mitotik aktiviteleri düşük olduğu için kültüre edilmeleri, uygulanacak analiz için yeterli olacak miktarda hücre elde edilmesi zorunluluğu vardır. Son yıllarda fetus hakkında daha erken bilgi sahibi olunabilmesi amacıyla gebeliğin 12-14. Haftalarında erken amniyosenteze kayma söz konusudur. 16. Haftada uygulanan rutin amniyosenteze göre daha az hücre olmasına rağmen oturmuş laboratuvarlarda hücrelerin henüz çok yaşlanmamış olması nedeniyle daha hızlı sonuçlar alınabilmektedir (4, 22, 23, 30, 34, 35, 41, 86).

Amniyotik sıvı hücreleri :

Heterojen olan amniyotik sıvı hücrelerinin kültürü sırasında üremenin gerçekleşmesi halinde farklı büyüklükte ve morfolojide hücreler gözlenir. Primer olarak gözlenen hücreler uzun ve ince yapıda olan fibroblastik ve daha yuvarlak olan epiteloid hücrelerdir. Bazen geniş, poliploid hücrelere de rastlanır ki bunlar amniyon kökenli hücrelerdir. Deneyimli laboratuvarlarda amniyotik sıvı hücre kültüründeki başarı oranı % 80-90 dolaylarındadır, ancak aşağıdaki nedenlere bağlı olarak başarı elde edilemeyebilir.

-örnekte canlı hücre olmayabilir ki bu ileri dönem gebeliklerde (20 hafta ve sonrası) karşılaşılan büyük bir problemdir.

-örnekte yeterli miktarda canlı hücre bulunmayabilir. Bu da erken amniyosentezlerde karşılaşılan bir durumdur.

-uygun hücre tipi bulunmayabilir. Örneğin, granüllü hücre çok ise bu hücreler aktif bölünmeye girmedikinden sonuç elde edilemez.

-örnek çok kanlı olabilir. Bu durum katater plesentaya girmiş ise ortaya çıkar. Başarısız sonuç, çok sayıda eritrosit varlığında amniyotik hücrelerin ürememesine bağlı olarak gerçekleşir.

-örneğin kahverengi renkte olması ki bu durumda gebeliğin erken döneminde ortaya çıkan kanlanmadan dolayıdır. Bu tür örneklerde hücreler tamamıyla ölü durumdadır (23, 30, 42, 76).

Amniyosentezin Riskleri :

Amniyosentez, normal koşullarda her gebelik için geçerli olan % 2-5 abortus riskini küçük bir oranda (%1) arttıran bir tekniktir. Ancak fetusta bir konjenital malformasyon, kromozom düzensizliği gibi defektlerin bulunması beraberinde yüksek SAb riskine neden olur. Bu durumlarda amniyosentezin uygulanması, riski artırır ancak bu artış varolan riskle karşılaştırıldığında anlamlı değildir. Örneğin maternal serumdaki AFP düzeyinin yüksek olması nedeniyle amniyosentez yapılan gebelerde SAb oranı % 7 dolaylarındadır, ancak yaşama yeteneği olmayan fetuslarda AFP düzeyinin yüksek olduğu unutulmamalıdır. Düşük

tehdi amniosentez için kontrendikasyon değildir, hatta gerekliliğini arttırır. Trizomi 21 li bebeği olan annelerin % 28 inde ilk trimester kanama öyküsü vardır ki bu oran kontrollerde % 1 dir (8, 17, 22, 31, 49, 84).

b) Koryonik Villus Örneklemesi (CVS)

Gebeliğin ilk trimesterinde uygulanabilen prenatal tanı yöntemi olarak 1980 lerin ilk dönemlerinde rutin olarak uygulanmaya başlanan koryon villus örneklemesi, koryon dokusundan bir miktar örneğin aspire edilmesi ve fetal genotipin saptanması esasına dayanır (4, 91).

Koryon villusları, erken gebelik döneminde embriyonik keseyi saran uzantılardır ve plesentayı oluşturmakla yükümlüdürler. Gestasyonun 7 nci haftasından sonra koryon leave ve koryon frondosuma ayrılırlar. Koryon frondosumdan plesenta gelişirken koryon leavedeki hücreler dejenere olurlar. Koryon frondosumdaki villuslar 8 inci haftaya kadar desidua ile kontamine dirler, endometriyal guddelerden zorlukla ayrılırlar. Bu nedenle hem ultrasonografik olarak lokalizasyonu tam olarak belirleyebilmek hem de desiduidan ayrılmış villusları aspire edebilmek için 8 inci gebelik haftasından sonra koryon villus biyopsisinin yapılması uygundur (4, 70, 78, 91).

Koryon villus aspirasyonu için optimal dönem gestasyonun 8-10 uncu haftalarıdır. Biyopsi ultrason eşliğinde transabdominal veya transservikal olarak gerçekleştirilir. Biyopsi ve endikasyona göre 5-30 mg kadar doku aspire edilerek endikasyona göre fetal cinsiyet, karyotip, DNA veya enzimatik analizler uygulanabilir (4, 8, 23).

Bir kalıtsal defekt açısından risk altında olan fetusa ilişkin bilgi, aspirasyondan sonraki 24 saat-3 hafta içerisinde alınabilir ve gebeliğin sonlanmasını gerektiren durumlarda ilk trimesterde terapötik abort uygulanabilir. Simoni ve ark. nın uygulamaya soktuğu bu invaziv tekniğin kısa süre içerisinde geniş uygulama alanı bulmasındaki etkenlerden biri erken gebelik dönemlerinde analizin yapılabiliyor olmasıdır. Diğer nedenler ise aspire edilen koryon villuslarındaki trofoblast hücrelerinin yüksek mitotik aktiviteye sahip olmalarıdır. Trofoblastların bu aktiviteleri, direkt sitogenetik analizlerin yapılmasını sağlamaktadır. Aspirasyondan sonraki 24 saat içerisinde fetal karyotip değerlendirilebilmektedir. Ancak direkt kromozom analiziyle sadece fetal cinsiyet ile kromozom anöploidileri açısından değerlendirmede doğruluk oranı yüksektir. Mitotik indeksin düşük olması, kromozom morfolojilerinin bozuk oluşu yapısal kromozom anomalileri ile mozaik olguların tanısında güçlüklerle yol açmaktadır. Ayrıca embriyonik olarak değerlendirildiğinde trofoblastların fetal hücreleri tam olarak yansıtmaması erken embriyonal dönemde meydana gelen mitotik hataların trofoblastlarda gözlenmemesi nedeniyle yanlış-pozitif ve yanlış-negatif sonuçlara yol açması CVS tekniğinin prenatal tanıdaki güvenilirliğini etkilemiştir.(23, 49, 76).

c) Kordosentez (Fetal kan örnekleme)

İlk kez 1973 yılında uygulandığı bildirilen bu teknik 1974 yılında Kan ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Ultrason eşliğinde gerçekleştirilen girişimde fetal korda plenta ile birleştiği yerden girilerek 2-3 ml kadar kan aspire edilir. Gestasyonun 18 inci haftasından sonra uygulanan bu girişimde fetal kayıp oranı % 1 dolaylarındadır. Özellikle kromozom ve DNA düzensizliklerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılır. Rh isoimmunizasyonunun ortaya çıkmasına yada artmasına neden olan fetomaternal hemoraji riski de mevcuttur. Kordosentez ile genetik hastalıkların prenatal tanısının yanında fetal enfeksiyonların teşhisi, intrauterin gelişme geriliğinin tespiti, otoimmun trombositopeninin teşhisi gibi diğer bozukluklar da tanımlanabilir (4, 8, 23, 30, 71, 72, 76, 86).

d) Fetal Deri ve Karaciğer Biyopsisi

Fetal deri biyopsisi genellikle aşağıdaki hastalıklarda endikedir :

Epidermolizis bulloza letalis, Epidermolizis bulloza distrofi, Epidermolitik hiperkeratoz, Harlequin ichtiyozis, Oculocutaneous albinizm, Sjögren-Larsson sendromu ve Nöroaksonal dejenerasyon hastalıklarının tanısında endikedir (23, 86) .

Fetal karaciğer biyopsisi bazı nadir durumlarda teşhise yardımcı olmaktadır. İlk kez 1982 yılında Rodeck ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. Fetal deri biyopsisinde olduğu gibi fetoskop veya ultrason yardımı ile gerçekleştirilmektedir. Fetal karaciğer biyopsisinden, ornitin karbamil transferaz eksikliği ve alanin gloksalat amino transferaz eksikliği gibi durumlarda yararlanılmaktadır (4, 22, 23, 30, 72).

2.1.3.2. Noninvaziv Yöntemler

a) Ultrasonografi

Ultrason ile fetusun gözlenmesi anne ya da fetus için bir risk teşkil etmez. Deneyimli bir ultrason uzmanı çok sayıda (280 nin üzerinde) farklı konjenital malformasyona tanı koyabilir. Ultrason bu hastalıkların herhangi biri için yüksek risk taşıyan gebeliklerde endikedir. Anensefali ultrason ile 10-12 haftalık gebelikte tanınabilir. Ancak pek çok anomali için en uygun tanı zamanı 16-18 inci haftalardır (23, 26, 82, 86).

Fetal genital organların 16 ncı gebelik haftasından sonra görülebilmelerine rağmen ciddi genetik durumlarda fetal cinsiyetin belirlenmesi için yeterli değildir.

b) Maternal Serumda AFP Tayini ve Üçlü Test

Günümüzde genetik hastalıkların PT sı ancak invaziv girişimlerle elde edilen fetal dokularda yapılmaktadır. Bu invaziv girişimlerin mortalite ve morbiditesinin yüksek oluşu,

geniş popülasyonda kullanılabilecek güvenilir noninvaziv tarama yöntemlerine olan gereksinimi gündemde tutmuştur. Maternal serumda bakılan alfa-fetoprotein (MSAFP) gerek nöral tüp defektlerinin tanısında, gerekse üçlü testin bir parçası olarak Down sendromu için riskli gebelerin taranmasında en yaygın şekilde kullanılmakta olan noninvaziv testlerin başında gelmektedir (17, 23, 35).

Maternal serumda üçlü test, alfa-fetoprotein (AFP), insan koryonik gonadotropin (hCG) ve konjuge olmamış estriol₃ (uE₃) proteinlerinin düzeylerinin birlikte değerlendirilmesiyle trizomi açısından fetusun riskini belirleyen noninvaziv bir yöntemdir. Maternal serumdaki düzeyleri dikkate alınarak gestasyonun 16-20 nci haftaları arasında uygulanan bu tarama testi fetusu kesin olarak yansıtmamakla birlikte, herhangi bir endikasyonu olmayıp invaziv PT uygulanmayan ancak anomalili fetusun olduğu gebeliklerin belirlenmesi açısından önemli olup günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (17,23, 35, 82).

c) Maternal Dolaşımında Fetal Hücreler

Prenatal tanıdaki son gelişmelerden biri de maternal kandaki fetal hücrelerin analizidir. Doğum öncesi tanı amacıyla fetal doku elde etmek için uygulanan yöntemlerin hepsi invaziv tekniklerdir ve çok küçük de olsa hepsinin fetal ve maternal riskleri vardır. Bu nedenle fetal-maternal riski olmayan, güvenilir, fetusun genotipini tam olarak yansıtabilecek bir noninvaziv teknik arayışı hep medikal genetiğin gündeminde kalmıştır. Bu arayış maternal kandaki fetal hücreler üzerindeki çalışmaları yoğunlaştırmıştır (1, 4, 6).

Uzun süreden beri fetal lenfosit, eritrosit ve sinsisyotrofoblastların maternal kandaki varlığı bilinmektedir. PCR ve FISH tekniklerinin geliştirilmesi maternal kandaki bu hücrelerden yararlanmayı gündeme getirmiştir. Maternal kandan morfolojik kriterler, monoklonal antikor ve flow sitometri gibi yöntemlerle ayrılan fetal hücrelerden elde edilen DNA da gen düzensizlikleri, interfaz nükleuslarında da kromozom düzensizlikleri saptanabilmektedir. Ancak çok yeni bir uygulama olup geniş popülasyonlarda değerlendirilerek, güvenilirliğinin kesin olarak saptanması için bir sürece ihtiyaç vardır (1, 4, 6).

2.2. Kromozom Düzensizlikleri

Normal insan kromozom sayısı, ovum aracılığı ile anneden, sperm aracılığıyla babadan gelmek üzere 23 çift yani 46 tanedir. İnsan somatik hücrelerinde 46 kromozom bulunur yani diploid ($2n=46$) dir. Gametler ise haploid ($n=23$) dir, yani 23 tane kromozom bulunur. Bu 23 kromozomun 22 tanesi otozomal, bir tanesi de gonozomal (X veya Y) kromozomdur. İnsan somatik hücrelerinde bulunan 46 kromozomdan 22 çifti otozomal, 1 çifti de gonozomal (XX yada XY) kromozomlardır (5, 7, 23).

Her kromozom çiftinin kendine özgü bir büyüklüğü, morfolojisi ve boya alma özelliği vardır. İşte gerek kromozom sayısı gerekse kromozomun yapısında ortaya çıkan değişiklikler bireylerde konjenital anomali ve/veya mental retardasyon ile sonuçlanır (5).

Kromozom düzensizlikleri, sayısal ve yapısal olmak üzere, iki ana gruba ayrılır (5, 7, 23, 86).

2.2.1. Sayısal Düzensizlikler

Kromozomların sayısal sapmalarını ifade eder ve iki alt gruptan oluşur :

- Poliploidi
- Anöploidi

2.2.1.1. Poliploidi

Kromozom sayısının, haploid sayının tam katları şeklinde artmasını ifade eder. Yani normalde $2n$ olan kromozom sayısının $3n=69$, $4n=92$ olmasıdır (5, 7, 23, 25, 37, 86).

İnsanlarda iki çeşit poliploidi görülür, XXX,XXY yada XYY seks kromozomlarının olduğu 69 kromozomlu triploidi ve her biri XXXX veya XXYY seks kromozomlarının olduğu 92 kromozomlu tetraploidi. Triploidi germ hücresindeki mayoz yetersizliğinden veya daha sık olarak da çift spermle döllenme gibi fertilizasyon hatasından kaynaklanır. Tetraploidi ise ilk zigotik bölünmenin yetersizliği sonucunda olur ve fertilizasyondan hemen sonra kromozom sayısının iki kat artmasıyla sonuçlanır (5, 7, 23, 25, 37, 86).

2.2.1.2. Anöploidi

Kromozom sayısının katları kadar olmayan artma yada eksilmeleri ifade eder. $45,X$ ($2n-1$) Turner sendromu, $47,+21$ ($2n+1$) Down sendromu gibi düzensizlikler anöploidik durumlardır (5, 7, 23, 25, 37, 86).

Anöploidi çift kromozomların veya kardeş kromatidlerin anafaza katılmayıışındaki hatadan (non-disjunction) dolayı artar yada kromozomların anafazda gecikmesinden (Anafaz lagging) dolayı oluşabilir. Böylece her iki mekanizmayla da iki hücre üretilebilir ve birinde fazladan bir kromozom varken (trizomi) diğerinde kromozomun birisi kayıptır (monozomi) (5, 7, 23, 25, 37, 86).

Trizomide bir kromozomun iki kopyası yerine üç kopyası vardır. Birinci kromozom dışında otozomların her birinde trizomiler rapor edilmiştir. Ama genellikle trizomik embriyoların çoğu erken gebelik dönemlerinde kaybedilir (5, 7, 23, 25, 37, 86).

Spesifik trizomili embriyoların canlılığı, tutulan spesifik kromozomların genetik içeriği ve genetik düzensizliğin büyüklüğüne bağlıdır. Nadir durumlar dışında yalnız, 13, 18 ve 21 inci otozomal trizomiler terme kadar yaşar ve canlı doğum görülür (5, 7, 23, 25, 37, 86).

2.2.2. Yapısal Düzensizlikler

Kromozom kırıklarının tümü yapısal düzensizliklerle sonuçlanır. Bir kromozom kırıldığında iki yapışkan uç DNA tamir mekanizmaları sayesinde bir araya getirilir. Ancak ortamda birden fazla kırık varsa, tamir mekanizmaları, kromozom fragmentlerini birbirlerinden ayıramadıkları için yanlış eşleşme meydana gelir. Bu da kromozomların yapılarının bozulmasına, kırık noktalarında bulunan genlerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Tüm bu normalden sapmalar da fenotipte kendini ifade ederler. Yapısal kromozom anomali çeşitleri şunlardır :

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| * Translokasyon, | * İnversiyon, |
| * Delesyon, | * İzokromozom, |
| * Halka (Ring=yüzük) kromozom, | * Sentrik fragment (5, 7, 23, 37, 76, |
| * Duplikasyon, | 86). |

2.3. GENETİK ANALİZLER

Genetik analizleri uygulamalarına göre üç büyük grup içerisinde toplayabiliriz. Bunlar :

- * Enzim analizleri
- * DNA analizleri ve
- * Sitogenetik analizlerdir.

2.3.1.Enzim Analizleri

Günümüzde PT ile 100 den fazla kalıtsal metabolik hastalığı tespit etmek mümkündür ve riskli gebeliklerde endikedir. Biyokimyasal defektin bilinmesi halinde, PT enzimin yada proteinin analizi ile konur. Bazı olgularda ise hücreden arınmış amniyotik sıvı veya fetal plazmada metabolitlerin ya da proteinlerin artması veya eksikliği tanıya götürür. PT için direkt ya da kültüre edilmiş doku ki bu koryon dokusu, amniyotik sıvı hücreleri, amniyotik sıvı süpernatantı, fetal kan örneği ya da fetal karaciğer biyopsileri kullanılabilir. Kontrol için en ideali taze doku kullanmaktır (8, 11, 30, 91).

2.3.2. DNA Analizleri (PCR,Polimerase Chain Reaction; DOP PCR, Degenere Oligonükleotid Primer Polimerase Chain Rection)

DNA mutasyonları sonucu ortaya çıkan ve farklı kalıtım kalıbına sahip 8000 üzerinde kalıtsal hastalık olup bu hastalıkların bir bölümünün PT sı direkt veya indirekt DNA analiz yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Önceki bölümlerde de ifade edildiği gibi moleküler

analiz yöntemlerinin hızla gelişmesi ile her gün sayısı artan mendeliyen ve mitokondrial düzensizliklerin tanısı gebeliğin 8-10 uncu haftası gibi çok erken dönemden itibaren kolaylıkla konabilmektedir (23, 45, 61, 86).

DNA direkt ve/veya uzun süreli kültürden sonra elde edilebilir. Fetusun risk altında olduğu hastalığa yol açan mutasyon ve genin bilinmesi durumunda direkt yöntemler ile tanı konabilirken, hastalığa neden olan mutasyon yada genin tanımlanamadığı durumlarda ise gen içinde yada gen yakınında bulunan ve hastalık ile birlikte kalıtılan DNA markerları kullanılarak indirekt yöntemlerle tanı konmaktadır (23, 45, 61, 86). DNA analizleri ile prenatal tanı metotları özet olarak çizelge 2.3 de verilmiştir (86).

Çizelge 2.3 DNA analizleri ile prenatal tanı

Direkt Metotlar	İndirekt Metotlar
Southern Blotting ile gen delesyonlarının veya yeniden düzenlenmelerin taranması; ör.: DMD mutasyonlarının % 60 delesyonludur	Belli gendeki mutasyonları belirlemek için hastalığın yanındaki loküs ile DNA polimorfizmleri ör.:Fenilketonüriinin PTsında fenilalanin hidroksilaz geninde polimorfizm tanısı
Southern Blotting ve Restriksiyon enzim analizleri nokta mutasyonlarını taramada kullanılır; ör.: orak hücreli anemideki MstII bölgesinin saptanması	Belli gendeki (genetik haritadaki pozisyonu bilinen) bilinmeyen mutasyonların tanınabilmesi için hasta loküse bağlanmış DNA polimorfizmleri; ör.: Aile bağlantı çalışmaları ile kromozoma lokalize edilmiş fakat henüz klonlanmamış bazı hastalıkların tanısı
Allel-spesifik oligonükleotidler karakterize mutasyonları taramada kullanılır; ör.: Kistik Fibrozisdeki 3bp lik delesyon tanısı	
Polimeraz Zincir Reaksiyonu amplifikasyon, delesyon ve karakterize edilmiş mutasyonların tanısında kullanılır; ör.: DMD deki delesyon tanısı	

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA ve RNA analizi için kullanılan tüm teknikler değerlendirildiğinde, 1985'te Salki ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve kavramsal olarak basit bir prosedür olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) en fazla potansiyele sahip ve DNA analizlerinde yeni bir çağı başlatan tek yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonunda birkaç saat içerisinde tek bir DNA ya da RNA molekülü birkaç milyon katına amplifiye edilebilmektedir. Bu yeteneği nedeniyle saç kökünden, ağız çalkantısındaki birkaç hücreden, kurumuş bir kan damlasından elde edilen tek bir hücreden izole edilen DNA materyalinden gerekli tüm analizlerin gerçekleştirilmesi mümkün olmaktadır (5,7,61,76,86).

Polimeraz zincir reaksiyonu incelenmek istenen DNA fragmentinin laboratuarda tüp içerisinde 5' ve 3' uçlarına özgü bu bölgelerdeki baz dizilerine komplementer bir çift primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan DNA parçasının enzimatik olarak 1 milyon

çoğaltılmasıdır. Bu yöntemin uygulamaya konması ile geniş kullanım alanı bulmasındaki ana neden, tek bir hücreden izole edilen DNA'nın amplifikasyonu sonrası farklı analizlerde kullanılmasını olanaklı kılmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonu denatürasyon-bağlanma (annealing)-uzama (extension) basamaklarından oluşan bir döngünün 25-30 kez tekrarlanması ile gerçekleşir. İlk basamakta DNA'nın çift dalı yüksek ısı ile birbirinden ayrılır. İkinci aşamada sıcaklık düşürülerek primerlerin DNA üzerinde kendilerine komplementer olan nükleotit dizileri ile hibridizasyonu sağlanır. Son aşamada ise ortamda bulunan DNA polimeraz enzimi ve Deoksinükleotitler aracılığıyla primerler arasında kalan DNA zincirlerinin sentezlenmesi gerçekleşir (Şekil 2.1). Polimeraz zincir reaksiyonu bir olgudaki spesifik gen sekanslarını klonlamadan genin ve/veya baz dizilerinin bilinmesi durumunda southern blot tekniğine gerek duymadan ilgili mutasyonları analiz etme imkanı sağlar. Spesifik sekansların amplifikasyonunun yanı sıra, direkt mutasyon analizlerinde rutin olarak kullanılmakta olup delesyonların, nokta mutasyonlarının tanımlanması örnek olarak verilebilir. DNA veya RNA'dan genomik ya da cDNA kütüphanesinin oluşturulması, genomik DNA veya mRNA'dan genlerin ve gen ailelerinin klonlanması da PCR'ın kullanım alanlarına verilebilecek örnekler arasındadır (5,7,61,76,86).

Özet olarak PCR, DNA ve RNA örneklerinin analizi için hem araştırma laboratuvarlarında hem de klinik moleküler tanı laboratuvarlarında kullanılan standart bir metot haline gelmiştir. PCR, diğer nükleik asit analiz metotlarından daha hızlı, daha ucuz, daha çok duyarlı ve daha az hasta materyali gerektiren bir metodur. Geniş uygulama alanı bulduğu ifade edilen bu yöntemin her geçen gün kullanım alanı gelişmekte olup bu alanlarda uygulanan PCR çeşitlerinin sayısı da her geçen gün artmaktadır. PCR çeşitleri arasında nested PCR, inverse PCR, DOP-PCR sayılabilir. Her PCR çeşidinin farklı uygulamaları, kullanımları söz konusu olup bu çalışmada kullanılması nedeniyle DOP-PCR üzerinde durulacaktır (5,7,61,76,86).

DOP-PCR (Dejenere Oligonükleotid-primed –PCR)

Moleküler analizlerde yeni bir çağın başlamasına neden olan PCR, ilk olarak hedef DNA'daki tek bir lokusun amplifikasyonunun yapılması yönündeydi. Ancak gelişmelere bağlı olarak mutipl lokusun birlikte amplifiye edilmesi de artık mümkün olmaktadır. Bu DNA'nın "genel" amplifikasyonu hibridlerin, genomların parmak izi (fingerprinting) analizlerini de içeren pek çok alanda uygulanmıştır. Bununla beraber temel uygulama belirli genomik bölgelerden yeni klonların oluşturulmasıdır. Bu genel uygulamalarda kullanılan primerler genomdaki tekrarlayan sekanslardır. Interspersed repetitif sekans PCR (IRS-PCR) bu amaçla kullanılarak insan kromozomuna veya belirli bir bölgeye spesifik kütüphaneler oluşturulmaktadır (46, 47, 63, 83, 90, 93).

İnsanda en sık rastlanan tekrar ailesi Alu ailesidir, haploid genomda 900.000 elemandan oluşur ve yaklaşık olarak 3-4 kb lık uzunluğa sahiptir. IRS-PCR, türlere spesifik amplifikasyonlarda belirgin bir avantaj sağlar. Ancak bu tekrarlar genomda üniform olarak bulunmazlar. Örneğin Alu elemanları insan kromozomlarında daha çok GTG bantlamadaki açık bant bölgelerinde yoğunlaşmaktadırlar. Klonlamada, bu bölgelerde bir yoğunlaşma

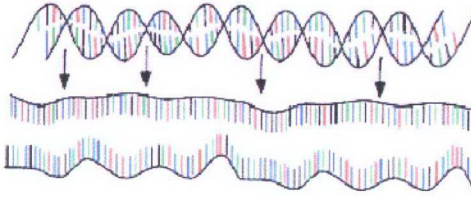
olmaktadır. Ayrıca IRS-PCR sadece tekrar ailelerinin yoğunlaştığı bölgelerin bulunduğu türlerde kullanılabilir. IRS-PCR’da karşılaşılan bu sorunlar diğer bir teknik olan bağlayıcı adaptör tekniği (Linker adapter technique=LA-PCR) ile bir miktar çözümlenebilmektedir. Bu yöntemde, az sayıda mikrodisekte edilen kromozom bantları bir arada toplanarak çok sık aralıklarla DNA’yı kesen bir restriksiyon enzimi (örneğin Rsa-I) ile kesilir. Kesme sonucu oluşan fragmentler küçük oligonükleotitler olarak yani primerler olarak kullanılabilirler. Amplifikasyon sonrasında da fragmentler klonlanırlar. Rsa-I bölgeleri herhangi bir genomun tümüne eşit olarak yayıldığı için IRS-PCR problemlerine benzer problemlerle karşılaşmamaktadır. Ancak LA-PCR teknik olarak uygulaması çok zor ve küçük miktarlarda çalışmayı gerektiren bir yöntemdir (46, 47,63, 64, 83,90, 93).

Ancak Telenius ve arkadaşları (1992) tarafından geliştirilen DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR) genomun IRS-PCR’a göre daha genel amplifikasyonunu sağlamaktadır. Hızlı etkin ve türe özgü özelliklerden etkilenmeyen bir tekniktir (46, 47,63, 64, 83,90, 93).

DOP-PCR ın özelliği hedef DNA ların sıkça gözlenen bağlanma bölgelerinde DNA nın yapısına ya da elde edildiği türden bağımsız olarak sınırsız genel amplifikasyonunu sağlamasıdır. Kullanılan oligonükleotitlerin, 3’ ucuna spesifik kısa sekansların düşük bağlanma ısısı esnasında bağlanmaları tekniğin temel prensibidir. Bu kısa sekanslar sıkça bulunduğu için hedef DNA nın amplifikasyonu birçok loküste aynı anda gerçekleşmektedir. Spesifik 3’ primer sekansların bağlanması dejenere sekansların komşu altı adet nükleotidi tarafından stabilize edilir. Primerin 5’ ucunda klonlama çalışmalarında kullanılabilecek restriksiyon bölgesi içeren daha spesifik nükleotid dizisi bulunur. Bu teknik, genom haritalamasında, tüm kromozom DNA sının amplifikasyonunda, kromozoma spesifik marker oluşturulmasında güvenilir olarak kullanılmaktadır. Bu 5’ sekans aynı zamanda önceden amplifiye edilmiş DNA ya yeterli miktarda primerin de bağlanmasına imkan tanır ve daha sonraki PCR sikluslarında kullanılmak üzere daha yüksek bağlanma ısılarına imkan verir (46, 47,52, 63, 83, 79, 93).

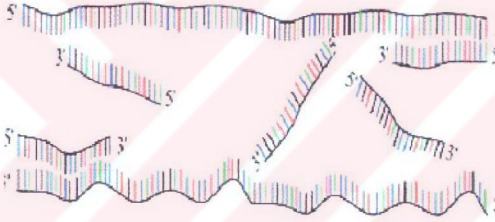
PCR : POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

3 döngü 30-40 siklus



1. Döngü : Denatürasyon

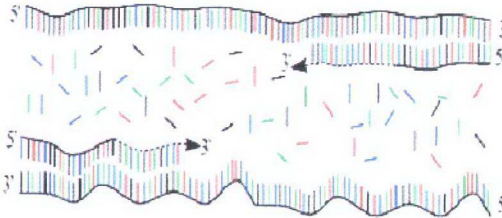
94°C da 1 dakika



2. Döngü : Bağlanma

54°C da 45 saniye

İleri ve ters istikametteki primerler



3. Döngü : Uzama

72oC da 2 dakika

Sadecce dNTP ler

Şekil 2.1 Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) ana basamakları.

Not : Bu şekil <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html> den modifiye edilerek alınmıştır

2.3.3. Sitogenetik Analizler

Sitogenetik analizler son yıllardaki gelişmelere paralel olarak iki farklı alt gruba ayrılabilir :

Klasik Sitogenetik Analizler

Moleküler Sitogenetik Analizler

2.3.3.1. Klasik Sitogenetik Analizler

Prenatal/postnatal kromozom düzensizliklerinin incelendiği bu analizlerde mikroskopik olarak gözlenebilecek her türlü kromozom aberasyonlarının değişik kromozom boyama yöntemleriyle tanısının konmasıdır.

Prenatal tanı amaçlı sitogenetik analizler için daha önce anlatılan amniyosentez, CVS ve fetal kan örnekleme gibi invaziv yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Bu yöntemler ile elde edilen materyaller, konvensiyonel kromozom hazırlama protokolleri ile preparat haline getirildikten sonra uygun bantlama teknikleri ile boyanır, metafazlar bant özelliklerine göre mikroskopta incelenerek fetal karyotip saptanır. Sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin saptanmasında kullanılan bantlama teknikleri çok çeşitlidir. Bunlar :

- | | |
|---|--------------------------------------|
| -Solid boyama | -Quinacrine (Q) bantlama |
| -GTG bantlama | -DA/DAPI bantlama |
| -Reverse (R) bantlama | -Yüksek rezolusyonlu bantlama |
| -Sentromer (C) bantlama | -Kardeş kromatid değişimidir (5, 8). |
| -Nucleolus Organiser Region bantlama (NOR bantlama) | |

2.3.3.2. Moleküler Sitogenetik Analizler (In Situ Hibridizasyon, FISH)

Nükleik asit moleküllerinin komplementer dizileri ile eşleşme eğiliminde olmaları çeşitli hibridizasyon yöntemlerinin gelişmesini sağlamıştır. İmmünohistokimyasal ve Western blotting tekniklerinin araştırma ve tanı alanlarında kullanılır hale gelmesi hücre ve tümör biyolojisini daha iyi anlama olanağı sunmuştur. Genel olarak hibridizasyon, solüsyon içerisindeki (in vitro) veya doku kesitleri yada hücre preparasyonlarındaki (in situ) solid yapılarda gerçekleştirilir. Solid yapılardaki hibridizasyon teknikleri ekstre edilen veya elektroforetik olarak ayrılan DNA fragmentlerinin bir filtrede sabit hale getirilmesi ve bunu takiben spesifik DNA grubu ile hibridizasyonunu gerektirir ki bu teknik Southern blotting olarak adlandırılır. Belirli bir hücre popülasyonu veya dokudan elde edilen farklı RNA grupları da aynı şekilde elektroforetik ayırma, bir membranda sabitleştirme ve prob ile

hibridizasyon aşamalarını gerektirir. Bu tekniğe de Northern blotting adı verilir (23, 45, 61, 86).

Belirli bir hücre popülasyonu veya dokudan izole edilen nükleik asitlerin in vitro hibridizasyonu farklı DNA ve RNA gruplarının belirlenmesini sağlamaktadır. Ancak incelenen spesifik sekansların hücreler arasındaki dağılımı yada kromozomlar üzerindeki lokalizasyonu hakkında bilgi vermemektedir. Bu konularda bize gerekli bilgiyi veren teknik moleküler sitogenetik bir yöntem olan in situ hibridizasyon yada kısa adı ile ISH tekniğidir. ISH tekniği, normal DNA fragmenti (prob) ile olgu DNA sının kendi ortamında, kromozom yapısı bozulmadan hibridizasyonu temeline dayanır (14, 18).

FISH tekniğinin kolay uygulanabilirliği, duyarlılığı ve etkinliği bu yöntemin hem temel araştırma hem de diagnostik alanda aranılan primer yöntem haline gelmesine neden olmuştur. Tüm ISH yöntemlerindeki temel prensip aynıdır. Prob olarak kullanılan DNA molekülü işaretlenir yani eksojen olarak reaksiyona sokulan işaretli nükleotid, prob DNA sındaki uygun nükleotid ile yer değiştirir ve florokromla işaretli sentetik DNA veya prob elde edilir. Çift sarmal halde bulunan gerek prob gerekse hedef DNA lar denatüre edilerek tek dal haline getirilir. Önceden işaretlenmiş prob ile spesifik eşleşmenin olacağı uygun koşullarda genomik DNA hibridize edilir. Daha sonra oluşan hibrid spesifik görüntüleme sitemleri ile belirgin hale getirilir (6, 12, 14, 19, 50).

Nick Translation (NT)

Bu işaretleme sistemi ilk olarak 1977 yılında Rigby ve arkadaşları tarafından radyoaktif molekül (^3H) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben NT sistemini kullanarak, Langer ve arkadaşları (1981) non-radyoaktif olarak biotinlenmiş nükleotidi (Biotin-dNTP) ve daha sonra Höeltke ve arkadaşları digoxigeninlenmiş nükleotidi (Digoxigenin-dNTP) nükleotid dizilerine sokarak bu dizileri işaretlemişlerdir (2, 3, 6, 14, 20, 21).

Bu enzimatik işaretleme sisteminde DNase I ve DNA polimeraz I olmak üzere iki tip enzim rol alır. DNase I endonükleaz aktiviteye sahiptir. In vitro koşullarda Mg^{+2} iyonunun varlığında çift zincirli DNA nın fosfodiester bağları üzerinde rasgele çentikler oluşturarak 3'-OH ve 5'-P gruplarını serbest hale getirir. DNA polimeraz I ise 5'→3' ve 3'→5' yönlerinde ekzonükleaz, 5'→3' yönünde de polimeraz aktivitelere sahiptir. DNA üzerinde DNase I tarafından çentik oluşturulmaz, DNA polimeraz 5'→3' yönünde ekzonükleaz aktivitesini göstererek açılan çentiklerden 5'-P grubu tarafındaki nükleotidi uzaklaştırır. Bu uzaklaştırmayı takiben aynı enzimin polimeraz aktivitesi ile aynı yönde 3'-OH ucuna, karşı DNA zincirindeki nükleotid dizisine komplementer olacak şekilde nükleotidler eklenir. Böylece çentik 5'→3' yönünde kayarak orijinal nükleotidlerin yerine peş peşe ortamdaki nükleotidler ilave edilerek mevcut nükleotid dizileri yenilenmiş olur. Böylece orijinal nükleotidin yerine normal yapıdaki işaretli nükleotidler (biotinlenmiş veya digoxigeninlenmiş) yerleştirilerek prob işaretlenir (2, 3, 6, 14, 20, 21).

Random Priming (RP)

Bu işaretleme sistemi 1984 yılında Feinberg ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Random priming işaretleme sisteminin nick transasyon sisteminden farklılığı tek bir enzimin (DNA polimeraz) kullanılıyor olmasıdır. Bunun yanı sıra normal DNA sentezi için gerekli olan moleküllerin (Mg^{+2} iyonu, dATP, dCTP, dGTP ve dTTP nükleotidleri ile Bio-NTP ya da Dig-NTP) yanısıra primer vazifesi görecekle kısa oligonükleotidler kullanılmaktadır (2, 3, 6, 14, 20, 21).

Random priming işaretleme sisteminde işaretlenecek olan nükleotid dizisi (DNA probu) ilk önce yüksek ısıda denatüre edilerek nükleotid dizilerinin tek dal haline gelmesi sağlanır. Bunu takiben, her bir zincir kısa uzunluktaki oligonükleotidlerin bağlanması için kalıp görevi görür. Böylece ortamın ısısı belirli bir dereceye düşürüldüğünde oligonükleotidler, tek zincirli nükleotid dizisine komplementer olduğu bölgelerden bağlanarak serbest 3'-OH uçları meydana getirir. Nükleik asit dizisinin işaretlenmesinde, DNA polimeraz yapıya bağlanan oligonükleotidlerin 3'-OH ucundan başlamak üzere ortamdaki işaretli ve normal nükleotidleri 5'--->3' yönünde yeni sentezlenen zincire sokar. Böylece yeni sentezlenen zincir, istenilen işaretli nükleotid ile işaretlenmiş olur. Burada yeni sentezlenen nükleotid dizisinin uzunluğu (prob fragmentlerinin) ortama konan oligonükleotid oranı ile ters orantılıdır (2, 3, 6, 14, 20, 21).

PCR Labelling

Geniş uygulama alanı olan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile de DNA yı işaretlemek mümkündür. Bu amaçla dNTP lerin yerine florokrom haptenlerle bağlanmış olan dUTP ler PCR reaksiyonuna katılmaktadır. dUTP ler hem biotin, digoksinin gibi indirekt haptenlerle işaretli olabileceği gibi hem de spectrum green , spectrum orange, spectrum red yada fluoro red gibi direkt florokromlar da taşıyabilirler. Böylece PCR ın siklusları süresince işaretli nükleotidler yeni sentezlenen dallarda yerlerini alarak DNA molekülünün işaretlenmesi sağlanır. Son yıllarda birçok laboratuarda tercih edilmekte olan PCR işaretleme yöntemi diğer sistemlere oranla daha sağlıklı sonuçlar vermektedir (46, 47).

2.3.3.3 Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH)

Floresan in situ hibridizasyon, hedef kromozomları ya da daha spesifik olarak kromozomal alt bölgeleri tanımlayabilmektedir. Metafaz yaymalarında ve interfaz nükleuslarında kromozomal düzensizliklerin ortaya konması için bu tekniğin yararlı şekilde kullanılması uygulanan spesifik nükleik asit problemlerine bağlıdır. Bu nedenle, kullanılan teknik genel olarak sınırlı sayıdaki kromozomal bölgeleri kapsamaktadır. Ayrıca, tanısal amaçlar için belirli bazı hastalıkları tutan kromozomal bölgeler hakkında ön bilgilerin edinilmiş olması zorunludur (89).

Özel bir hücre popülasyonunda daha ayrıntılı kromozomal aberasyon analizi yapmak için çok renkli in situ hibridizasyon protokolleri geliştirilmiş ve daha büyük sayıda hedef bölgeleri inceleme olanağı ortaya çıkmıştır. 24 kromozomun tümünün farklı farklı boyanmasına izin veren çok renkli prob seti ile (Multiplex FISH=FISH) karyotip analizi yapılabilmektedir. Bununla beraber, kromozom takımlarının ayrıntılı analizi için böyle bir prob setinin kullanılmasının bazı sınırlamaları vardır:

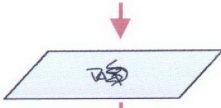
- 1) Transloke olmuş küçük materyaller gibi küçük kromozomal bölgeleri içeren aberasyonların ortaya konmasında çoğunlukla tüm kromozoma spesifik (painting) problemler yetersiz kalmaktadır.
- 2) Analiz için hücrelerden metafaz yaymalarına gereksinim gösterir, fakat pek çok durumda böyle yaymalar elde edilemez ve analiz interfaz nükleusunda yapılabilir.

3) İnterfaz nükleusunda aberasyonların ortaya konması sayım ve/veya hibridizasyon sinyallerinin yoğunluğuna dayanır ve bir nükleusta 46 kromozoma ait sinyallerin değerlendirilmesi güçlükler yaratır (87,89).

Son zamanlarda, tüm genomun dengesiz kromozomal materyalinin incelenmesine olanak sağlayan alternatif bir yaklaşım ortaya konmuştur (Kallioniemi et al 1992). Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ("*comparative genomic hybridization*", CGH) adı verilen bu prosedür, kontrol ve test DNA ların metafaz üzerinde hibridize edilmesi prensibine dayanan bir moleküler sitogenetik yöntemidir ve yalnızca DNA ya ihtiyaç gösterir (Şekil 2.2). Böylece, tümör dokularındaki genetik değişmelere ilişkin çalışmalar büyük oranda hızlanmıştır. Ayrıca bu yöntem, üniversal polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kombine edilerek çok az sayıdaki hücreden çok küçük miktarda DNA elde edilse bile araştırmaya imkan vermektedir (16, 24, 27, 33, 55, 56,57,60, 89).

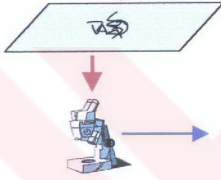
Tüm genomdaki dengesiz kromozomal materyallerin daha ayrıntılı ve doğru analizi için, özellikle dengeli bir genomda yalnızca belirgin olmayan sapmaların varlığında (hücrelerin küçük bir bölümünde küçük kromozomal bölgelerin dengesizlikleri ya da kromozomal kazanç-kayıplar gibi) CGH gerekir. CGH için analiz edilecek DNA (bundan sonra *test DNA* denecek) ile normal DNA farklı florokromlarla işaretlenir (bundan sonra *kontrol DNA* denecek) ve normal hücrelerden elde edilen metafaz kromozom yaymalarına hibridize edilir (Şekil 2.3). Farklı floresan fenotipi gösteren (test DNA yeşil/kontrol DNA kırmızı) DNA lar normal metafaz kromozomlarına tam olarak hibridize oldukları zaman birbirleri ile örtüştüklerinden mavi-turuncu bir renk ifade ederler. Ancak test DNA sındaki bir delesyon durumunda o bölgede hibridizasyon olmayacaktır ve test DNA rengi (yeşil) kendini gösteremeyecektir. Buna karşılık test DNA daki amplifikasyon, kendini parlak yeşil floresan renk ile ifade edecektir. Bu renk fenotipleri aynı zamanda hibridizasyon oranlarına göre hesaplanan profillerde de ortaya çıkacaktır (27, 33, 55, 56, 57, 59, 75, 77, 89).

**Metafazların
Hazırlanması**



**Preparatların ön
vıkaması**

DENATÜRASYON



DNA nın incelemeıı



Görüntü alma



Görüntü Analizi



**Test ve Kontrol DNA
Ekstraksiyonu**



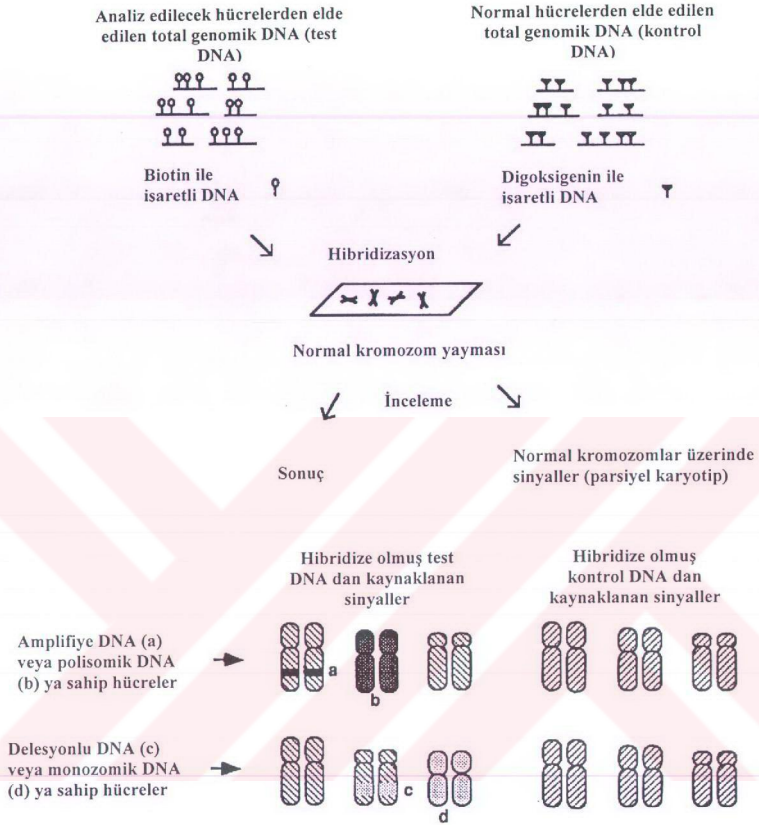
DNA ların İıaretlenmesi

**Test DNA
Bio.
DENATÜRASYON**

**Kontrol
DNA Dig.**

Hibridizasyon

Şekil 2.2 CGH Protokolü



Şekil 2.3 CGH in şematik gösterimi. Analiz edilecek örnekten elde edilen ve işaretlenen DNA, normal bir örnekten elde edilen DNA ile normal metafaz yaymalarına birlikte hibridize edilir. Sonuç olarak bütün kromozomlarda bir background boyanma olarak gözlenirler. Kontrol DNA ile karşılaştırıldığında, amplifiye yada polisomik test DNA kromozom sekansları daha fazla boyanmış (siyah boyanmış bölgeler olarak gösterilmiştir) şekilde gözlenir. Kromozomal sekansların kaybında ise (delesyon ya da monozomi) hedef kromozomlarda daha açık olarak boyanmış kromozom bölgeleri olarak gözlenir (açık boyanmış bölgeler olarak gösterilmiştir)(89).

Not: Bu şekil Human Chromosomes, principles and techniques ,1995,sh 195 den modifiye edilerek alınmıştır

Sinyallerdeki farklılıklar DNA dizisindeki kopya sayılarının farklılığından ortaya çıkar ve bu eksperimental parametrelere bağlanabilir. Kromozomal dengesizliklerin ayrıntılı olarak araştırılması için, bu standardizasyon çok önemlidir, çünkü eksperimental parametrelerle kromozomlar boyunca sinyal yoğunluklarının değişimi farklılaşabilir. Bunun nedeni farklı baz kompozisyonlu (yani GC-karşıılığında, AT-zengin bölgeler) kromozomal bölgelerin farklı denatürasyonu ya da baz kompozisyonu ve hedefe girilebilirlik nedeniyle prob dizilerinin farklı hibridizasyonu kadar farklı kromozom paketlenmesi sonucu da olabilir (55, 56, 57, 89).

Farklı olarak işaretlenmiş kontrol DNA'nın CGH'e katılması, aynı kromozomal hedefler için spesifik olan prob dizileri oluşturur ve böylece test ve kontrol DNA'nın sabit oranı için araç olur. Her iki DNA'nın hibridizasyonu birlikte yapıldığı için stokastik kurallar izler, bu oran kromozomal hedef bölge prob dizileriyle saturasyona kapalı bile olsa sabit kalmalıdır. Böylece, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, total genomik DNA ile reverse painting yapılmak suretiyle kromozomal dengesizliklerin ortaya konması için güçlü bir protokol olarak görünmektedir (33, 55, 56, 57, 60, 89).

CGH için test ve kontrol DNA problemleri ya direkt olarak florokromlarla, florokrom-bağlı nükleotidlerin DNA yapısına alınması suretiyle ya da indirekt olarak biotin ve digoxigenin gibi reporter gruplarına fluorokrom moleküllerin eklenmesi suretiyle işaretlenebilir. Direkt olarak işaretlenen problemlerin kromozomlarda daha yumuşak sinyaller oluşturması ve prensip olarak bir kromozomdaki sinyal yoğunluklarının fark edilmesi amacıyla daha tercih edilir olmasına karşın indirekt işaretleme/görüntüleme prosedürleri daha iyi kaliteye ulaşma olanağı sağlamaktadır. Böylece protokollerde direkt işaretleme kadar indirekt işaretleme prosedürleri de tanımlanmaktadır (33, 55, 56, 57, 69, 73, 89).

CGH'deki sinyal yoğunluklarının diyagnostik varyasyonları, yalnızca yaygın olarak görülen DNA içindeki "*interspersed repetitive sequences (IRS)*" sinyal porsiyonu etkili olarak süprese edildiği zaman elde edilebilir. Floresan yoğunluklarının doğru ölçümler vermesi için süpresyonun mümkün olduğunca tamamlanması gerekir. Genomik DNA problemleri için standart in situ süpresyon hibridizasyon protokolleri genel olarak gen haritalaması ya da klinik tanıda kullanılmaktadır ve IRS'lerin bir oranda yüzey boyanması verir. Bunun tersine, CGH analizi IRS sinyallerinin belirli oranda tam süpresyonunu gerektirir. Bunun için büyük miktarda insan Cot I DNA kullanılması gerekir. Böylece süpresyon hibridizasyon protokolünde "*highly repetitive genomic DNA sequences*" fraksiyonu ile hızlı bir asosiasyon ortaya konur (55, 56, 57, 60, 77, 80, 89).

Diyagnostik değeri olan sinyal yoğunluklarındaki farklılıklar, kromozomlar üzerindeki farklı renkler dikkate alınarak iki genomdan elde edilen sinyallerin mukayesesi ile başarılmaktadır. Görüntü incelemesi belli oranda bir değerlendirme ölçüsü verirken floresan yoğunlukların kantitatif ölçümleri dijital imaj analizi uygulanmak suretiyle önemli derecede daha yüksek doğruluk ve çözünürlükte CGH analizine izin verir. Floresan yoğunluklarının normalizasyonundan sonra, test genomundan beklenen sinyalin kontrol genomundan beklenen sinyale oranı eğer kromozomal bölge dengeli (dizomik) ise 1.0; delesyon, monozomi ya da

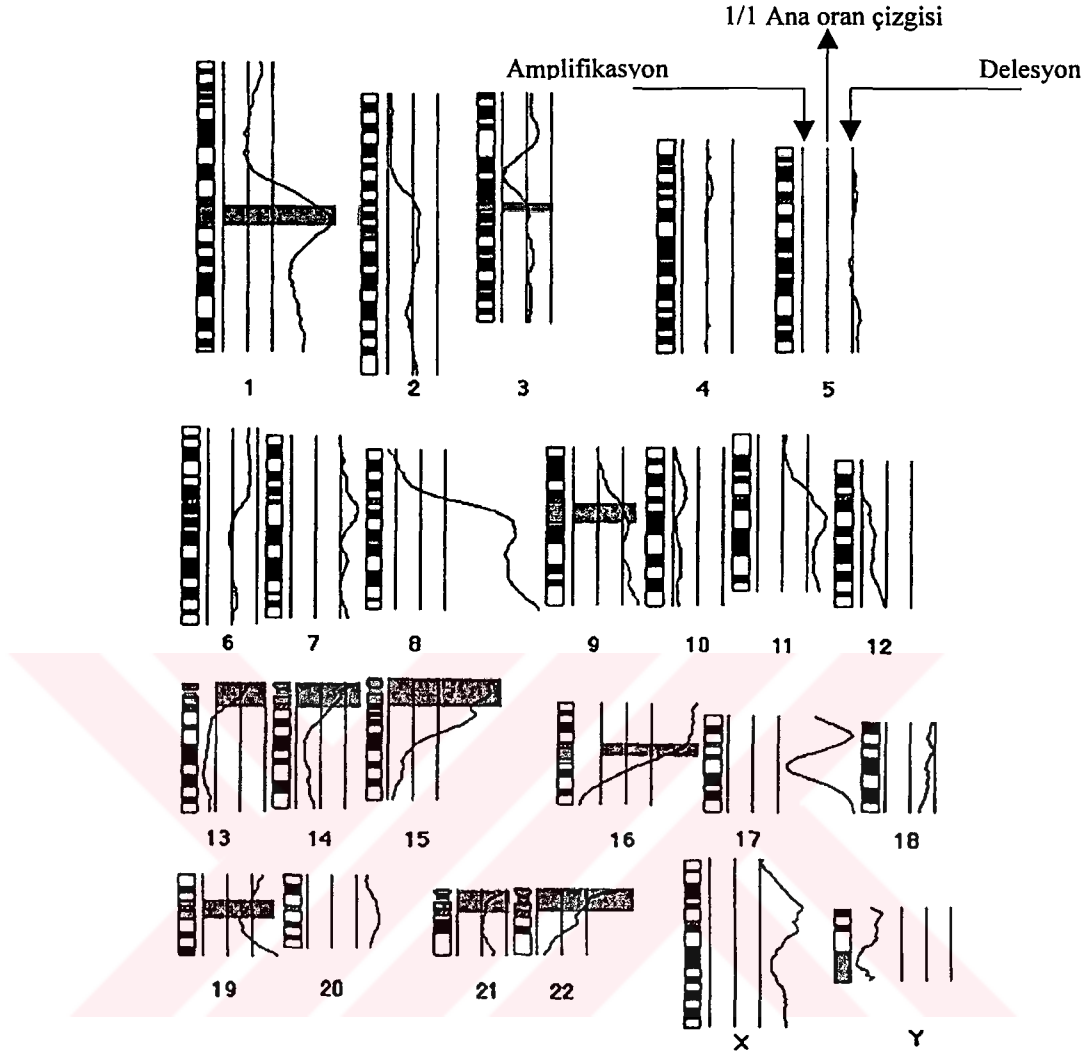
hemizigozite varsa 0.5: parsiyel ya da tam trizomi varsa 1,5 ve böyle devam eder. Benzer şekilde, yüksek dereceli amplifikasyonlar için çok daha yüksek oranlar beklenir. Böyle oranların hesaplanması floresan yoğunlukların kantitatif değerlendirmesinin güvenilirliğine bağlıdır ve bu büyük oranda görüntü analizi ile çözülmektedir. Bu amaç için yeterli fluorokrom imajları elde etmek için görüntü sağlama prosedürünün standardizasyonu çok önemlidir (55, 56, 57, 60, 77, 80, 89).

Hibridize test ve kontrol DNA larından elde edilen dijitalize görüntüler elektronik olarak da elde edilebilir ve böylece ya karışık renkler ya da yalnızca çok koyu iki renk elde edilir. Bu, sinyal varyasyonlarının diğer bir gösterim şekli olmakla birlikte görsel incelemeyle elde edilen dengesizliklerin düzeyine genellikle ulaşmaz. Küçük kopya değişimlerinin doğru bir CGH analizi için floresan yoğunlukların kantitatif ölçümleri gerekir. Eğer özellikle hücrelerin büyük çoğunluğunda bu değişiklikler yoksa, ölçümlere daha fazla gerek duyulur. Ayrıca multipl DNA kayıp ya da kazançlarının barındığı kompleks olgularda bu tip analizler kesinlikle gereklidir. Kantitatif CGH değerlendirmesi için bazı bilgisayar programı uygulamaları değişik informatif stratejiler kullanarak halen gelişme halindedir. Bununla beraber, güvenilir bir değerlendirme için aşağıdakileri de kapsayan bazı gereksinimler vardır :

1. Kantitatif analizde CGH preparatlarının seleksiyonu için objektif kriterlerin tanımı.
2. Kromozom segmentasyonu,
3. Floresans background hesaplaması,
4. Spesifik bir kromozomal bölgenin dengelenmiş gösterimi için standart değer göstergesinin tanımında kriter,
5. Yüksek ya da düşük kopya sayılarında dengesiz segmentlerin varlığına ilişkin sınırların tanımı.

Uygun görüntüler ve segmentler seçildikten sonra, kromozomlar ve değişimleri indirekt olarak ortaya konur . FITC ve rhodamine görüntüleri için bireysel kromozomun aksisi boyunca piksel piksel floresan yoğunluklar ölçülür; elde edilen her değer kromozom aksisine dikey değerlerin ortalamasını gösterir. Floresan yoğunluklarının oranı hesaplanır ve böylece bireysel kromozomların "oran profili" ortaya çıkarılır. Böyle bir oran bir üç- renk inceleme tablosu haline getirilebilir ve burada farklı renkler daha fazla ya da daha az olduğu kadar dengeli şekilde paylaştırılmıştır. Farklı metafaz yaymaları arasında hibridizasyon kalitesinde hafif varyasyonlar olduğu için, birkaç metafaz yaymasından daha fazla (genellikle 7-10) yarıya ilişkin bu oran profillerinin ortalanmasına ihtiyaç vardır ve böylece daha küçük kromozomal dengesizlikler güvenilir şekilde ortaya konur (Şekil 2.4). Böyle dengesizlikleri ortaya koymak için yüksek bir duyarlılık çok önemlidir. Bu parametre büyük oranda seçilen eşik kriterlere bağlıdır: sabit oran değerleri çok belirgin olmayı (örneğin 1.25) ve az belirgin olmayı (0.75) tanımlamaktadır. Tanımlanan bu eşiklerle, aberasyonlar eğer % 50 hücreden daha fazla hücrede varsa aberasyonlar mutlaka belirlenecektir. Daha düşük sayıdaki hücrelerde bulunan kopya sayı değişimleri, oran değerleri belirlenen eşiklere ulaşamayacağı için saptanamayacaktır. Bir başka alternatif de, dengeli kromozomlar için ortalama oran

değişkenliğinin hesaplanması esasına dayanan istatistiksel eşiklerdir. Bu eşikleri kullanarak, yüksek kaliteli CGH preparatlarında normal aralık çok dar olacağı için sensivitede dikkate değer bir artış elde edilecektir (33, 55, 56, 57, 60, 77, 80, 89).



Şekil 2.4 Prostat kanserli bir olgudan elde edilen test DNA'nın kontrol DNA ile hibridizasyondan sonra ortaya çıkan yeşil/kırmızı floresan oranını gösterir şekil.

10 adet metafaz yaymasının incelenmesi sonucu her bir kromozom için oranlar kendi idiogramlarında gösterilmiştir. Ana oran çizgisi ortada, amplifikasyon sınırını gösteren çizgi sağda ve delesyon sınırını belirleyen çizgi solda yer almaktadır (89).

Not: Bu şekil Human Chromosomes, principles and techniques ,1995,sh 275 den modifiye edilerek alınmıştır

2.3.3.3.1. CGH in Uygulama Alanları

Tür karşılaştırmalarını içeren evrime ilişkin araştırmalarda CGH kullanılabileceği gibi, günümüzde tümör sitogenetiği için yararlı bir araç olarak düşünülmektedir. Bu özellikle kromozom bandlamanın çok zor olduğu ya da hiç mümkün olmadığı solid tümör analizleri

için geçerli bir uygulamadır. Yayınlanan tüm CGH makalelerinde pek çok yeni kromozomal dengesizlik tanımlanmıştır. Bu nedenle CGH çalışmaları tümör sitogenetiğine girdikçe, solid tümörlerdeki kromozomal dengesizliklere ilişkin pek çok yeni bilgiler sağlanmış olacaktır. Bununla beraber, CGH yalnızca kromozomal bölgelerin aşırı(over-) ya da az (under-) reprezentasyonunu ortaya koyabildiği için, belirli hematolojik malignansiler için spesifik olan translokasyon ve inversiyonlar gibi dengeli yenidendüzenlenmeler analiz edilemeyecektir. CGH ile ortaya konabilen tekrarlayan genomik değişiklikler muhtemelen, tümör oluşması ve gelişmesiyle ilişkili genlerin lokalize olduğu kromozomal bölgeleri göstermektedir. Bu anlamda, CGH iki tip genin ortaya konmasında muhtemelen çok önemli bir metot haline gelecektir : Belirli tümörlerde amplifiye olan proto-onkogenler, bir kopyası çoğunlukla kaybolan tümör supressör, genler. Bunun tersine, genlerin füzyonu ile oluşan çoğunlukla dengeli yenidendüzenlenmeler pek çok tümör hücresinde görülür, fakat bunlar CGH ile çok az ihtimalle ortaya konabilir (55, 56, 57, 60, 77, 80, 89).

Lösemilerde CGH ve G-bantlama analizlerinin mukayesesi yapıldığı zaman olguların büyük çoğunluğunda farklılık ortaya çıkar ve bu durum G-bantlama analizinin in vivo olarak lösemi hücrelerinin klonal dağılımını yansıtmadığı anlamına gelir. O nedenle CGH yalnız solid tümörlerde değil hematolojik malignansilerde de kromozomal dengesizlikleri ortaya çıkarmada çok güçlü ve hızlı bir metod olarak belirlemektedir (24, 27, 33,89).

Günümüzde, CGH daha pek çok tümörün sitogenetik analizine olanak sağlayan bir araştırma aracı olarak kullanılmaktadır. Belirli tümör tiplerinde çoğunlukla dengesiz genomik bölgelerin ortaya konmasında kullanılacağı için DNA problemleri ve interfaz sitogenetik gibi diğer yöntemlerle karşılık tümör analizinde kullanılan prob setlerine ihtiyaç göstermektedir. Ayrıca, amplifikasyon bakımından tümör genomunun taranması ve bunun kromozomal lokalizasyonu için çok hızlı bir yaklaşımdır. Diğer metotlar yalnızca ilgili kromozomal loküslere genlerin yerleştirilmesindeki test amacıyla kullanılabilir. Bu yaklaşım konvensiyonel yöntemlerde büyük gelişmeler yapmış ve çok sayıda prob analizi yapılmıştır, fakat bunun başarısı uygun aday problemlerin bulunmasına bağlıdır (55, 56, 57, 60, 77, 80, 89).

Bununla beraber, rutin diyagnostik amaçla CGH in kullanılıp kullanılmayacağı hala belirgin değildir. Teknik açıdan bakıldığı zaman, sadece belirli bazı uygulamalarda belirgin üstünlük göstermektedir ve bunlarda rutin olarak kullanılabilecek durumdadır. Fakat rutin diyagnostik amaçla kullanılabileceği zaman büyük avantajlar sağladığı da unutulmamalıdır. CGH ile universal PCR prosedürünü kombine etmek mümkündür. Böylece, rutin patoloji laboratuvarından elde edildiği şekilde çok az hücre ihtiva eden küçük örneklerde bile kromozomal dengesizlikleri göstermek mümkün olabilmektedir. Böyle küçük doku örnekleri tam bir konvensiyonel interfaz sitogenetik analizi için yeterli olmadığından dolayı CGH rutin analizi bakımından uygun bir işlem olur(89).

CGH ve universal PCR protokollerinin kombine edilmesi, Hodgkin lenfomadaki Sternberg-Reed hücreleri gibi tekli hücreleri bile analiz etme olanağı sağlayacaktır. Bundan başka, aynı örnekten hücrelerin fiziksel ayırımının ötesinde örneğin hücrelerin morfoloji ve

immünofenotipine bakarak aynı doku içindeki tümörlerin erken ve geç evrelerini karşılaştırma, hatta aynı tümör içindeki farklı klonları ayırtetme olanağı bize sunulmaktadır(89).

2.3.3.3.2.CGH de Ekipman

Mikroskop

CGH analizi için, araştırma amaçlı uygun bir epifloresan mikroskop gerekir. Stabil bir obje tablasının uygunluğuna özel özen gösterilmelidir, çünkü aynı metafaz yaymasından daha sonra görüntü alınması için bu esastır. Bütün büyük firmalar CGH uygulamalarına uygun iyi kalitede aletler üretmektedir. Mikroskop tipine bağlı olarak, küçük bir düzlemin homojen aydınlanması ve uygun yoğunlukta olması için 100 watt'lık bir mercury lamba yeterli olmaktadır. Görüntüdeki bulanıklığı azaltmak ve kontrastı arttırmak için büyütme yolunda bir diyaframın kullanılması arzu edilir. 100x (ultraviyole-transparent, plan) bir objektif CGH de gözle değerlendirme ve görüntü elde etmek için çok kullanışlıdır. Küçük kromozomal alt-bölgelerin analizi için metafaz yaymalarının yeterli büyüklükte olması gerekir ve çoğu bilgisayar programlarıyla analiz için 512-pixel x 512-pixel aralığı içerisinde yeterli olmaktadır. Kullanılan florokromlar için seçilmiş dar bandpass filtreler kullanılarak görüntü elde edilir. Arka arkaya birkaç görüntü alınır, fakat minimal pixel değişim amaçlanmış olmalıdır. Bu pixel dichroic ve hareketli büyütme filtresiyle kombine edilmiş triple emission filtre kullanılarak elde edilebilir(15, 28, 29).

Kamera

Genel olarak, yüksek kaliteli, siyah-beyaz cooled CCD kameralar, CGH geliştiren farklı gruplar tarafından kullanılmaktadır. Renkli CCD kameralarının, yalnızca floresansın yoğunluğunu ölçmek için gerekli olmasının dışında, bu uygulamaya sağlayacağı avantaj açık değildir. Herhangi bir renkli CCD kamera tipinde spektral ayırım optimal olmadığı için, CGH analizinde siyah-beyaz sisteme üstünlüğü bile olmayabilir. Hedef cevabı veren ve minimal gölgelenme yapan çok homojen bir kamera temel gereksinimdir. CGH için yalnızca yüksek duyarlılıkta, fakat yüksek dinamik aralığı olmayan düşük kaliteli bir kamera bile yeterli olabilir (66, 74, 89).

Bilgisayar Programı

Kantitatif CGH analizi için hazırlanan bilgisayar programlarının arkasındaki temel hedef yukarıda özetlenmiştir. Bazı gereksinimlerin bu bilgisayar programlarında yerine getirilmiş olması gerekir. Görüntü seçimi için kalite kriterinin yanında istenmeyen görüntülerin kabul edilmemesini de kapsamı çok önemlidir. Ayrıca, bilgisayar programı, metafaz yaymalarındaki kromozomların segmentasyonunu yapma kapasitesinde olmalıdır. Bu metafazlardaki üst üste bilinmeyen kromozomların büyük çoğunluğu kantitatif değerlendirme için dikkate alınmalıdır. Küçük genomik bölgelerdeki kromozomal materyalin fazla ya da az

bulunmasını tam olarak ortaya koymak için birkaç metafaz yaymasından elde edilen ortalama değerler için olasılıklar programa eklenmiş olmalıdır. Kolay taşınma, minimal kullanıcı müdahalesi ve kromozom identifikasyonlu yardım arzu edilecektir. Böyle bilgisayar programları ticari olarak temin edilebilir duruma gelmiştir (28, 89).

2.3.3.3.3. CGH de Görüntüleme

CGH protokolleri standart FISH protokollerinin çoğuna benzerlik gösterir. Bununla beraber, iyi CGH sonuçları elde edebilmek için pek çok noktaya özel önem gösterilmesi gerekmektedir.

Floresan sinyaller konvensiyonel epifloresan mikroskoplar kullanılarak görüntülenir ve uygun bir kamera sistemi kullanılır. Optimum aydınlatma için mercury lambası lamba ayna görüntüsü odaklanan lamba görüntüsü tek çizgiye getirilmek suretiyle tam olarak ayarlanmalıdır. Homojen aydınlatma sağlamak için ışık merkezlenmelidir. Görüntü içindeki kontrast, imaj toplama sahasının sınırında alan diyaframı kapatılarak yükseltilir. DAPI, FITC ve rhodamine görüntüleri, her bir florokrom için seçici filtre setleri (tekli band pass filtreler) kullanılarak görüntülenir (15, 29, 74, 89).

Bu basamakta, pek çok örnekte, örneğin tümör hücresinin büyük genomik dengesizlikleri (örneğin büyük amplifikasyonları ya da bütün bir kromozomun kaybı veya kazancı) görüntüleme incelemesiyle kolayca ortaya konabilir. Bundan başka hibridizasyon deneyinin kabaca kalitesi aşağıdaki kriterlere göre belirlenebilir :

Test DNA bir erkekten alındığı zaman X kromozomunun daha zayıf boyanması görülmelidir.

Kromozom ya da nükleuslarca işgal edilen alanların dışındaki yüzey boyanma minimal olmalıdır.

Test genomunda mevcut tüm kromozomal dengesizliklerin tam olarak değerlendirilmesi için kantitatif ölçü ve floresan yoğunlukların analizi gerekir. Bu amaçla cooled CCD (charged-coupled device) kamera gibi duyarlı bir kamera kullanmak suretiyle dijitalize görüntü elde edilir. Her florokrom için pozlama süreleri, dinamik oranının yarısına maksimum pixel değerlerini eşitlenmesiyle seçilmelidir. Tüm optik ayarlar ve pozlama süreleri, tek bir olgudan elde edilen metafaz yayma serilerinde görüntü elde etmek için sabit tutulmalıdır. Kantitatif değerlendirme için, kromozomların hiç üst üste gelmediği ya da çok az olduğu metafaz yaymalarına özel dikkat edilmelidir (74, 88, 89).

2.3.3.3.4. CGH de Değerlendirme

CGH oldukça yeni bir prosedür olduğu için, değerlendirme ilkeleri halen yoğun bir tartışma konusudur. Standardize edilmiş değerlendirme prosedürleri için genel olarak kabul edilmiş kriterleri elde etmek üzere daha bilimsel toplantıların yapılmasına gerek vardır. Değerlendirme, genelde elde edilen bilgilerin karar düzeyiyle ilişkilendirilerek verilebilir. Araştırmacı görüntüleme ve kantitatif ölçümlerle elde ettiği değerlendirmelerde farklılıklar olduğunu bilmelidir. Bir tümörde muhtemel amplifiye olmuş DNA dizilerinin taramasında olduğu gibi bazı uygulamalar için görüntüleme yeterli olurken diğer uygulamalar kromozomal dengesizliklerin analizini gerektirir (89).

İyi bir CGH preparatında, büyük kromozomal materyal değişimlerinden oluşan dengesizlikler floresan mikroskop altında kolayca görünür. Örneğin, amplifikasyonlar koyu lekeler halinde görülür ve komple kromozomal bölge kaybı hemen fark edilir, çünkü normal metafaz yaymasındaki karşılığı segment boyanmayacaktır. Uzun incelemeler sonucunda floresan sinyaller solacağı için, FITC ve rhodamine floresansın dijitalize görüntüleri çok daha uygundur ve bu görüntülerin mukayesesi monitörde yapılır. Karşılaştırmalı araştırmada, görüntülerin böyle incelenmesiyle kompleks kromozomal dengesizliklerin analizi mümkün olmaktadır. Bununla beraber, prosedür çok zaman kaybettirir ve karmaşık dengesizlikler tanımlanmamış olarak kalabilir (55, 56, 57, 89).

Görüntülerin görsel incelemesi, görsel yoğunluk farklılıklarını inceleyiciye göstermek için test DNA görüntüsünde yalancı renklendirmeler ya da değişken sınırlar kullanılmak suretiyle olanaklı hale getirilebilir. Bununla beraber, bu değerlendirmenin gerçek değerlendirmeye eşdeğer olmadığı ve test DNA sı ile kontrol DNA sinyalleri arasındaki oran hesaplamalarıyla kesinlikle mukayese edilemeyeceği bilinmelidir (89).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Gereç

3.1.1.Araştırma Grubu Bireyleri:

Kültüre edilmemiş amniyon hücreleri ve koryon villusu materyalinde Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) tekniği ile fetal cinsiyet ve anöploidi tayinini içeren bu çalışma Kasım 1999-Kasım 2000 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı ve GENTAM laboratuvarlarında Çizelge 4.1 de belirtilen endikasyonlar nedeniyle sitogenetik analiz için gönderilen 35 amniyosentez ve 5 CVS örneğinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma amniyotik sıvı hücrelerinden ve koryon villuslarından elde edilen DNA lar ile CGH tekniğinin uygulanabilirliği ve prenatal tanıdaki güvenilirliğinin değerlendirilmesini ve rutine sokulmasını amaçlayan bir çalışmadır. Çalışmanın araştırma grubunu kültüre edilmemiş amniyositlerden ve koryon villuslarından elde edilen CGH bulguları oluştururken, kontrol grubunu aynı örneklerin kültüre edilmesi sonrası gerçekleştirilen standart sitogenetik analizler oluşturmaktadır. Kültüre edilmemiş materyallerde CGH ile saptanan cinsiyet ve kromozom düzensizliklerine ilişkin bulgular standart sitogenetik analiz verileri ile karşılaştırılmıştır.

3.1.2. Araç ve Gereçler

Bu bölümde yöntem esnasında kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar bulunmaktadır. Kimyasal maddelerin listesi Çizelge 3.11. de, kullanılan cihazların listesi ise Çizelge 3.12 de verilmiştir.

3.2. Yöntem

Endike olgularda gerçekleştirilen amniyosentez ile aspire edilen 15-20 ml amniyotik sıvı örneğinin 3-5 ml si CGH analizi için kullanılırken geri kalan 15-17 ml si uzun süreli kültüre konularak klasik sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde endike olgularda uygulanan girişimle alınan koryon villuslarının 5-10 mg ı CGH analizi için kullanılırken geri kalan 15-20 mg ı uzun süreli kültüre konularak klasik sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Materyal Alımı

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ile diğer bazı üniversite (Samsun, Kocaeli) ve Devlet hastahanelerinin (Eskişehir, SSK,) kadın doğum poliklinikleri tarafından gerçekleştirilen girişimlerde, amniyosentez

için gebeliklerinin 14-20 nci haftaları arasında olan olgularda, ultrason eşliğinde 20 mm lik disposable ponksiyon iğneleri aracılığı ile 15-20 ml amniyon sıvısı steril koşullarda enjektöre çekilerek hemen Bilim Dalımız doku kültürü laboratuvarına ulaştırılmıştır. Diğer kuruluşlarda gerçekleştirilen amniyosentez materyalleri steril koşullarda termos olarak bir gün içerisinde hasta sahipleri tarafından Bilim Dalımıza getirilmiştir. CVS de ise gebeliğin 11-12 nci haftalarında olan olgularda transabdominal girişimle alınan koryon villusları steril koşullarda enjektöre çekilerek en geç bir gün içerisinde Bilim Dalımız doku kültürü laboratuvarına ulaştırılmıştır

Doku kültürü laboratuvarına ulaştırılan örnekler gerek CGH, gerekse uzun süreli kültür analizleri için ayrı ayrı prosedürlerden geçirilmişlerdir.

3.2.2. Amniyositlerde/Trofoblastlarda Direkt Analizler (CGH analizleri)

Doku kültürü laboratuvarına ulaşan amniyotik sıvı örneklerinden 3-5 ml kadarı aseptik koşullarda cam tüpler içerisine alınmışlar ve işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 CGH için AS ve CVS den DNA Ekstraksiyonu

*Medyum içerisinde gelen materyal,

CVS ise 30 saniye ile 1 dakika arası 14.000 rpm de,

AS ise 10 dakika 1200 rpm de santrifüj edilerek; transport medyumuna atılmıştır.

*Pelet çalkalanarak solüsyon haline getirildikten sonra üzerine 1 ml Lyzis Buffer konmuş,

*14.000 rpm de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş

*Süpernatant atılmış, 1 ml Lyzis Buffer konmuş,

*14.000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş,

*Süpernatant atılmış, 1 ml Lyzis Buffer konmuş,

*14.000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş,

*Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pelet tiplenerek süspansiyon haline getirilmiş, üzerine :

35 µl % 10 luk SDS
35 µl Proteinaz K (Taze, 20mg/ml lik)
630 µl WBL konur
700 µl Toplam hacim, eklenmiştir.

*56°C da 3 saat yada 37°C da bir gece bekletilmiş,

*Süre bitiminde tüpe 210 µl 5M lık NaCl koyulmuş,
700µl+210ml=910µl toplam hacim.

*Bu 910µl toplam hacim üzerine de yine 910µl İzamilalkol/Kloroform eklenmiş,

*Elde yavaşça 5 dakika süreyle çalkalanmış,

*14.000 rpm de 5-10 dakika santrifüj edilmiş,

*Başka bir tüpe aktarılan süpernatant üstüne alınan süpernatant miktarı kadar (1/1 oranında) İzamilalkol/Kloroform ilave edilmiş (750 µl süpernatant alınırsa 750 µl de İA/KL konur),

*5 dakika süreyle elde hafifçe çalkalanmış, beyaz süt görünümü elde edilmiş, 14.000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş,

*Yine iki faz oluşmuştur, üstteki fazın süpernatantı yeni bir tüpe aktarılmış üzerine 1/1 İA/KL konmuş, elde 5 dakika süreyle yavaşça çalkalanmış, 14.000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş,

*Yine iki faz oluşmuştur, üstteki fazın süpernatantı yeni bir tüpe aktarılmış üzerine 1/2 oranında izopropanol konmuş (700µl/1400µl:süpernatant/İzopropanol),

*Hafifçe alt üst edilmiş bu aşamada DNA görülmüş (bulut şeklinde), eğer DNA henüz gözlenemiyorsa -20°C da 1-2 saat bekletilmiştir.

*5-10 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilmiş ve DNA çöktürülmüş, üzerine % 70 lik alkol konarak tekrar 5 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilmiş,

*Süpernatant atılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra üzerine 100 µl distile su ilave edilmiş, 37°C da 1 saat süreyle homojenize edilmiş ve +4°C da saklanmıştır (46,47).

3.2.2.2 Normal Erkekten Kontrol DNA İzolasyonu

3.2.2.2.1. Fenol/Kloroform Kullanılarak Kontrol DNA İzolasyonu

*5-10 cc taze kan, Na-EDTA ile 1/10 oranında karıştırılarak alınmıştır. Eğer kan taze ise alınır alınmaz (Na-EDTA ile karıştırılmadan) falkon tüpüne boşaltılmıştır.

*Üzerine retikülosit solüsyonundan 35cc veya 50cc ye kadar doldurup, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Eğer kan bekletilmiş ise, falkon tüpüne aktarıldıktan sonra karışım (kan +Na-EDTA + retikülosit sol.) vortex ile 20-30 saniye karıştırılmıştır.

*Retikülosit solüsyonu kanda bulunan çekirdekli ya da çekirdeksiz hücreler dışındaki bütün elemanlardan kanı temizlemek için kullanılmaktadır.

*Kan taze ise 3 kez, bekletilmiş ise aynı şartlar uygulanarak 4 kez retikülosit solüsyonu ile yıkanmıştır. İyi bir yıkamanın gerçekleştiği, süpernatantın berrak hale gelmesi ile anlaşılmıştır.

*Her santrifüj sonunda süpernatant atılıp üzerine retikülosit solüsyonu eklenip tüp alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Dipteki peleti her yeni koyduğumuz retikülosit solüsyonu ile iyice karıştırılmıştır. Bu dipteki hücre peletinin tüpü alt-üst ederek yerinden ayrılmadığı durumlarda vortex cihazı kullanılmıştır.

*Kan yukarıdaki işlemlerden geçirildikten sonra hücre dışındaki kan komponentlerinden temizlenmiş olmaktadır.

*Eritrosit ve diğer tüm hücrelerin sitoplazmalarını parçalayıp, nükleusunu elde etmek için lizisi sağlayan solüsyondan 35-50cc ye kadar falkon tüpüne eklenmiştir. Hücre metabolizmasını en aza indirip ortaya çıkan enzimlerin etkisini minimize etmek amacıyla falkon tüpü 3 saat buz içerisinde bekletilmiştir.

*Daha sonra, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Süpernatant atıldıktan sonra 1M STE solüsyonundan 25 ml ye kadar konulup, 20 dakika, 4000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Süre sonunda süpernatant atıldıktan sonra tüpte kalan çökelti üzerine

4,5 ml 1M STE
250 µl %20 lik SDS,
50µl Proteinaz K ilave edilmiştir.

*Bu karışım 37.5 °C de yaklaşık olarak 16 saat etüvde bırakılmıştır. %20 lik SDS, hücrelerin yüzey membran gerilimini azaltıp proteinlerin çözünürlüğünü artırmaktadır. Proteinaz K, hücre çekirdeğini parçalayarak DNA nın etrafındaki proteinleri çözünür hale getirmektedir. Çekirdek içerisinde bulunan bütün proteinleri parçalayarak sudaki çözünürlüklerini artırarak DNA yı açığa çıkartmaktadır. Bu nedenle proteinaz K tüpün dibine enjekte edilmelidir.

*Etüvden alınan tüp içerisinde yaklaşık 5cc lik bir materyal bulunmaktadır. Bunun üzerine 5cc fenol (1/1 oranında) ilave edilip, elde karıştırılmış, daha sonra 20 dakika, 4000 rpm de +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Bu adımdan sonra daima süpernatant çalışılmaktadır. Çünkü DNA süpernatantta, diğer şekilli elementler tüpün dibinde toplanmıştır. Fenolün proteinlere karşı afinitesi çok yüksek olduğundan, proteinlerle birleşerek onları çöktürmüştür. Böylece DNA nın saflaşmasını sağlanmıştır.

*Santrifüjden alınan tüp içerisinde iki faz gözlenmiştir. Fazlar arasında bulutvari bir kısım oluşmuştur. Bir pastör pipeti yardımıyla özellikle bulutvari kısımdan çekmemeye özen gösterilerek berrak süpernatanttan 4-5cc alınıp ayrı bir falkon tüpüne aktarılmıştır.

*1/24 lük izoamil-alkol/kloroformdan 1/1 oranında, yani 4-5cc ilave edilmiştir. Elimizdeki tüp hafifçe sallanarak karıştırılmış, 20 dakika, 4000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir.

*Alkol DNA nın kristalize yapı kazanmasına, kloroform ise proteinlerle birleşerek çökmelerine neden olmaktadır.

*Diğer taraftan 500 µl Na asetat 50 ml saf etanol, (1:1000 oranında) küçük bir behere konulmuştur.

*Santrifüj ettiğimiz falkon tüpünün üst kısmından 3-4 ml kadar çekip ufak beherin içine boşaltıldığında DNA saf etanol/Na-asetat karışımına göre daha yoğun olarak görülmüştür. Pastör pipeti ile daha yoğun gözüken kısım çekilerek ependorf tüpüne aktarılmıştır

*Ependrof tüpü, 2 dakika, 12.000 rpm de santrifüj edilmiştir.

*Santrifüjden çıkartılan tüpün içerisinde belli bir noktada DNA beyaz olarak görülmüştür.

*%70 etonolden 1 ml konulup santrifüj edilmiş, böylece ortamdaki Na-asetat ortamdan uzaklaştırılmış, süpernatant atılarak DNA kurutulmuştur.

*Kurumuş DNA 100µl steril distile su ile çözündürülmüş ve 37°C da 1 saat süreyle homojenize edilerek DNA hazır hale getirilmiştir. Bu DNA +4°C de saklanmıştır.

*Ortalama olarak, 10ml kandan 250 µg DNA elde edilmiştir.

Okunan OD değerine göre hesaplama aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

3.2.2.2.2 İzole Edilen DNA Miktarının Ölçümü

*Elde edilen DNA nın miktarı Optik Dansite değeri ölçülerek hesaplanır. Optik Dansite, 1 ml sıvıda belli dalga boyundaki (DNA için 260 nm) ışığa 1 cm yol aldırarak madde miktarına 1 O.D. denir. Çift iplikçik DNA için 50 µg, tek sarmal için 40 µg dir.

*DNA ya spektrofotometrede bakabilmek için 990 µl distile su+10 µl DNA koyup 1 ml ye tamamlanmıştır

50 µg DNA	1 OD.
X	Okunan OD değeri

$$X = \text{Okunan OD değeri} \times 50\mu\text{g DNA}$$

3.2.2.3. CGH için Normal Metafaz Preparatların Hazırlanması

Direkt DNA analizlerinde CGH tekniğinin kullanılabilmesi için preparatların hazırlanması en önemli basamaklardan birisidir. Preparat hazırlarken dikkat edilmesi gereken kriterler; metafaz miktarının yeterli olması ve lamın belirli bir bölgesinde

toplanması, metafazların kontrol ve test DNA sını rahatlıkla bünyesine alabilmesi için protoplazmadan temizlenmesi, metafazların kalitesi, artefaktın ortamda bulunmaması şeklinde sıralanabilir. Bu nedenle normal metafaz yaymalarından preparat hazırlarken aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

- a) Örneğin ekimi
- b) Kültür
- c) Colcemid eklenmesi
- d) Harvest
- e) Preparatların ön yıkaması

a) Örneğin ekimi

*Sağlıklı erkek bireylerden heparinize enjektör içerisine 2-3 ml kan alınmış,

*Lamin air flow içerisinde, kültür tüplerine 5 ml Chang medium MF ve Karyomax besiyeri hazırlanmış,

*Heparinize kan hazırlanan bu kültür tüplerine ekilmiş,

*Üzerine olgunun protokol numarası ve seri numarası yazıldıktan sonra 37°C deki etüvlere kaldırılmıştır.

b) Kültür

*72 saat süreyle kültürler etüvden çıkarılmamıştır.

*72 inci saatin bitmesine 45 dakika kala colcemid ilavesi yapılmıştır.

c)Colcemid eklenmesi

*Her bir kültür tüpüne 10 mg/ml lik colcemid solüsyonunudan 100 µl eklenmiş,

*Ve 45 dakika süreyle kültüre devam edilmiştir.

d) Harvest

*Bu süre sonunda tüpler etüvden alınmış,

*Tüpte bulunan besiyeri+hücre süspansiyonu 800 rpm de 8-10 dakika santrifüj edilmiş,

- *Süre sonunda süpernatant pastör pipeti ile atılmış,
- *Dipte kalan çökelti üzerine önceden 37°C ye getirilmiş 0.075 M KCl den 5ml eklenerek 37°C de 25-35 dakika etüvde bekletilmiş,
- *Tüpler süre sonunda 800 rpm de 8-10 dakika sanrifüj edilmiş,
- *Süpernatant atıldıktan sonra taze hazırlanmış tespit solüsyonundan 5 ml damla damla ilave edilmiş ve 30 dakika + 4°C deki buzdolabında bekletilmiş,
- *Süre sonunda tekrar 800 rpm de 8-10 dakika santrifüj edilmiş süpernatant atıldıktan sonra taze fiksatif ilave edilmiş,
- *Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-1 cc fiksatif kalacak şekilde süpernatant atılmış,
- *Dipte kalan çökeltinin hafifçe pipetajından sonra daha önceden protokol ve seri numaraları yazılmış ve alkolde bekletilerek temizlenmiş lamalar üzerine ıslak veya kuru olarak 45° lik açı ile damlatılmış,
- *Hemen kullanılmayacaksa son fiksatif boşaltılmadan -20C° da muhafaza edilmiştir (76).

e) Preparatların ön yıkaması

CGH analizlerinde yukarıda da ifade edildiği gibi metafazların çevresindeki protoplazmanın tamamen ortamdaki uzaklaştırılması, sonuç alınabilmesi için bir zorunluluktur. CGH analizlerinde test ve kontrol genomu, küçük parçalar halinde (500bp-2kbp) kullanıldığından test ve kontrol DNA sının protoplazmadan geçip normal metafaz yaymaları ile hibridize olması çok zordur. Bu da sonuç alınmasını engeller. Bu nedenle bu çalışmada da preparatlar ön yıkamadan geçirilmiştir. Ön yıkama aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir :

- *İlk olarak preparatlar ortamdaki asiti uzaklaştırmak için 15 dakika 2XSSC (Çizelge 3.3) solüsyonunda yıkanmışlardır.
- *Süre sonunda taze hazırlanmış RNase A (10 mg/ml) / 2XSSC (Çizelge 3.3) solüsyonundan 100 µl/lam damlatılarak lamel (24x60 mm) kapatılmış ve 37°C de 1 saat inkübe edilmişlerdir.

*Süre sonunda lameller uzaklaştırılarak preparatlar 3 er dakika süreyle 2 defa 2xSSC solüsyonunda yıkanmışlardır.

*2xSSC den çıkarılan preparatlar 3 dakika süreyle 1 defa 1xPBS solüsyonunda yıkanmışlardır.

*Süre sonunda preparatlar 10 dakika süreyle 1 defa 37°C da önceden hazırlanan 60µl Pepsin+1 ml HCl solüsyonunda yıkanmışlardır.

*Pepsin uygulamasının sonunda preparatlar 3 dakika süreyle 1 defa 1xPBS solüsyonunda yıkanmışlardır.

*Süre sonunda preparatlar 3 er dakika süreyle 2 defa 1xPBS+1 M MgCl₂ solüsyonunda yıkanmışlardır.

*Bu aşamayı takiben preparatlar 10 dakika süreyle oda ısısında 1 defa 1xPBS+1 M MgCl₂ +%1 Formaldehit solüsyonunda bekletilerek fikse edilmişlerdir.

*Daha sonra preparatlar %70, %90 ve %100 lük alkol serisinden geçirilerek dehidre edilmişler ve havada kurumaya bırakılmışlardır.

3.2.2.4. CGH Tekniğinin Uygulanması

3.2.2.4.1. İzole Edilen DNA Örneklerinin DOP-PCR ile Amplikasyonu

Prenatal tanı amacı ile gelen materyallerden elde edilmiş DNA örneklerinin DOP-PCR I ile amplifikasyonu için 50 µl lik karışım hazırlanmıştır.

ddH ₂ O	18.8 µl
10xPCR buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP mix	2 µl
primer	3 µl
Taq polimeraz	0.8 µl
DNA	8 µl

	50 µl

3.2.2.4.2. DOP-PCR 1 İçin Kullanılan Amplifikasyon Şartları

93°C de 8 dakika	}	1 döngü
93°C de 1 dakika	}	5 döngü
30°C da 1 dakika		
72°C da 5 dakika		
72°C de 1 dakika		
93°C da 1 dakika	}	35 döngü
56°C da 1 dakika		
72°C da 2 dakika		

En sonunda ise 72°C de 7 dakika tutularak ürünün artırılması sağlanmıştır.

3.2.2.4.3 Elde Edilen PCR Ürününün Jelde Görüntülenmesi

*%1.2 lik agaros jel hazırlanmış,

*Hazırlanan jel elektroforez tankı içindeki TAE Buffer içine yatırılmış,

*10µl PCR ürünü 2.5 µl loading buffer ile iyice karıştırılmış ve kuyucuklara yüklenmiş,

*30 dakika süreyle 120 V da yürütülmüş,

*Süre sonunda UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek resimleri çekilmiştir.

3.2.2.4.4 Elde Edilen DNA ların PCR İşaretleme ile İşaretlenmesi

Prenatal tanı amacı ile gelen materyallerden elde edilmiş DNA örneklerinin DOP PCR II/PCR Labelling ile işaretlenmesi için 50 µl lik karışım hazırlanmıştır.

ddH ₂ O	29.875	µl
10xPCR buffer	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
dACG mix	3	µl
dTTP	0.2	µl
dUTP (Bio/Dig)	3.3	µl
primer	1	µl
Taq pol	0.125	µl
DNA	4	µl

		50 µl

3.2.2.4.5. DOP PCR II (PCR Labelling) Amplifikasyon Şartları

93°C de 8 dakika	} 1 döngü,
93°C de 1 dakika denatürasyon	} 25 döngü
56°C de 1 dakika bağlanma	
72°C de 2 dakika uzama	

Son olarak 72°C de 7 dakika PCR ürününün arttırılması sağlanmıştır.

3.2.2.4.6. PCR Labelling İle Elde Edilen PCR Ürününün Jelde Görüntülenmesi

*%1.2 lik agaros jel hazırlanmış,

*Hazırlanan jel elektroforez tankı içindeki TAE Buffer içine yatırılmış,

*10µl PCR ürünü 2.5 µl loading buffer ile iyice karıştırılmış ve kuyucuklara yüklenmiş,

*30 dakika süreyle 120 V da yürütülmüş,

*Süre sonunda UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek resimleri çekilmiştir.

3.2.2.4.7. DOP PCR I için Kullanılan Primer Dizisi

6-MW 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'

3.2.2.4.8. DOP PCR II için Kullanılan Primer Dizisi

6-MW 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'

3.2.2.4.9. Elde edilen İşaretli DNA ların Çöktürülmesi ve Karıştırılması

*Jelde uygun miktarda ve uzunlukta olduğu gözlenen DNA ların çöktürülmesi için aşağıdaki miks hazırlanmıştır :

Test DNA	30 µl
Kontrol DNA	30 µl
Human Cot1 DNA	40 µl
Na-Asetat(%10 luk)	10 µl
Ice Cold Etanol	250 µl

*Na-asetat Test DNA/Kontrol DNA/Human Cot-1 DNA nın toplam hacminin %10 u miktarında, buz soğukluğundaki etanol tüm toplam hacmin %250 si oranında kullanılmıştır.

*Bu miks 14.000 rpm de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş,

*Süre sonunda süpernatant atılmış ve üzerine %70 lik etanolden koyulmuş,

*10 dakika süreyle 14.000 rpm de santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası süpernatant atılmış dipte kalan beyaz çökelti halindeki DNA kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2.4.10. Denatürasyon

Hibridizasyon işleminin gerçekleşebilmesi için çift dal halinde bulunan test ve kontrol DNA sı ile normal metafaz DNA sının tek dal haline getirilmesi yani denatüre edilmesi gereklidir.

a) Test ve kontrol DNA sının denatürasyonu,

Kullanılan test ve kontrol DNA lar Kallioniemi ve ark.nın öngördüğü şekilde denatüre edilmişlerdir. Buna göre;

*Elde edilen test ve kontrol DNA kurutulduktan sonra 5 ml 2xSSC ve 7 ml hibridizasyon buffer ilavesi yapılarak (%70 Formamid/%10 Dekstran Sülfat/2xSSC)(Çizelge 3.4.) solüsyonu içerisinde çözündürülmüş,

*Prob karıştırılıp bir kaç saniye santrifüj edilmiş,

*73°C de 3 dakika denatüre edilmiş,

*Süre sonunda tüpler hemen -20°C a alınmış ve 2 dakika süreyle bekletilmiş,

*Süre sonunda tüpler 45°C lık su banyosuna alınarak 30 dakika süreyle pre-annelinge tabii tutulmuş,

*Sürenin bitiminde -20°C a alınmış ve kullanılıncaya kadar burada bekletilmiş, kullanımdan önce buradan çıkarılarak 37°C da 2 dakika süreyle bekletilmiş hafifçe vortekslenip spin atılarak preparatlara damlatılmıştır.

b) Preparat denatürasyonu,

CGH de kullanılacak preparatlar denatürasyon solüsyonu içerisinde denatüre edilmişlerdir. Buna göre;

*%70 Formamid/2xSSC (Çizelge 3.4.) içeren karışım hazırlanıp su banyosuna konulan dikey şale içerisinde 73°C ye getirilmiş,

*Preparatlar ısısı 73°C olan solüsyon içerisinde 3 dakika bekletilmişler,

*Süre sonunda preparatlar hemen soğuk (-20°C) %70, %90 ve %100 lük alkol serilerinden geçirilip kurumaya bırakılmışlardır.

3.2.2.4.11. Hibridizasyon

*Denatüre edilen preparatlarda, hücrelerin yoğun olduğu bölgeye 12µl Test ve Kontrol DNA dan hazırlanmış prob damlatılmış ve üzerine 22x22 mm lamel kapatılmıştır.

*Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır,

*Preparatlar şale içerisinde 37°C de 3 gece formamidli ortamda hibridizasyona sokulmuşlardır.

3.2.2.4.12. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA larının ortamdan uzaklaştırılması, normal metafaz DNA sına tam komplementer olan (%80-%100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

*Hibridizasyonu tamamlanan praperetlar etüvden çıkarılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiş,

*Oda ısısındaki 2xSSC solüsyonunda 2-3 dakika yıkanmış ve lamellerin düşmesi sağlanmış,

*Preparatlar ısısı 72°C ye getirilmiş 1xSSC solüsyonu içerisinde ilk 3-5 saniye hafice karıştırılarak 5 dakika süreyle yıkanmıştır.

3.2.2.1.13. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi

Bu aşamada test/kontrol DNA sı ve normal metafaz DNA sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Bu aşama immünolojik reaksiyonlardan oluşan bir prosestir. Kullanılan antikorlar ile muamele sonrasında preparatların yıkanmasında kullanılan immünolojik tampon solüsyonları tamamıyla test/kontrol DNA nın işaretli olduğu hapten molekülüne (Biotin, Digoxin) bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan test DNA biotin, kontrol DNA digoksin ile işaretli olduğu için uygulanan immünolojik sistem Avidin- α -Dig.TRITC sistemidir ve immünolojik tampon solüsyonu 4T (4XSSC/Tween20) dir (Çizelge 3.6.).

Test DNA Biotin, Kontrol DNA Digoxin ile işaretlidir. Her iki DNA birlikte hibridize edildiği için bu preparatların görüntülenmesinde kullanılan immünolojik sistemler (Avidin+Antidigoksin) birlikte uygulanmıştır ve immünolojik tampon solüsyonu olarak da 4T solüsyonu (Çizelge 3.6.) kullanılmıştır.

*Preparatlara 100 μ l Avidin (5mg/ml)/ Anti-Dig.TRITC (1mg/ml) karışımında damlatılıp 37°C de 30 dakika inkübe edilmişlerdir.

*Süre sonunda preparatlar yine 4T solüsyonunda yıkanmışlar (3x2 dakika) ve

*DAPI içerisinde 3 dakika süreyle boyamaya tabii tutulmuşlar,

*2 ayrı distile su şalesinde çalkalanmışlar,

*%70, %90 ile %100 lük alkol serisinden geçirilerek havada kurumaya bırakılmışlardır,

*Kuruyan preparatlara yüzey boyasından (Çizelge 3.6.) 30 μ l damlatılarak lamel kapatılmış ve -20°C da karanlıkta en az 30 dakika süreyle bekletilmiştir.

3.2.2.4.14. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Zeiss Axiphot Floresan mikroskobunda uygun filtrelerde incelenmiş, Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (Image Analyser) ile sinyallerin yoğunlukları değerlendirilmiş ve Photometrics Sensy kamera aracılığıyla CGH sinyallerini içeren metafazlar resimlenmişlerdir.

Mikroskobik incelemede preparatlar “FITC”, “RED”, ve “DAPI” filtreleriyle incelenmişlerdir.

3.2.3 Amnion Sıvısından Elde Edilen Hücrelerin Uzun Süreli Kültürü (Kontrol)

Kültüre edilmemiş amniyositlerde yapılan anöploidi taramasının doğruluğunu saptamak amacıyla normal amniyosit kültürü uygulanmıştır. Bu uygulamada şu adımlar izlenmiştir :

- a) Örneğin ekimi
- b) Kültür
- c) Colcemid eklenmesi
- d) Harvest
- e) Preparat haline getirme.

a) Örneğin ekimi

*Laboratuara getirilen 15-17 ml amniyon sıvısı 800 rpm de 8-10 dakika santrifüj edilmiş,

*Tüpler lamin air flow içerisine alınarak süpernatant atılmış,

*Kalan hücreler hücre miktarına bağlı olarak 2-4 flask ile 1-2 petri kabına ekilmiş,

*Üzerine olgunun protokol numarası ve seri numarası yazıldıktan sonra besiyerleri ilave edilerek 37°C deki CO₂ li etüvlere kaldırılmıştır.

b) Kültür

*İlk 5 gün süreyle kültürler (eğer kontaminasyon riski yüksek değilse) etüvden çıkarılmamıştır.

*5 inci gün ilk kontrolleri yapılarak üremeler tespit edilmiştir, Kültür süresi genellikle 8 ile 14 gün arasında sürmüştür.

c)Colcemid eklenmesi

*Yeterli üremeye ve mitozaya sahip flasklardaki besi yerleri alınmış,

*Yerine 4 cc yeni besiyeri ilave edilmiş,

*Ertesi gün 0.04 mg colcemid eklenmiş ve 4 saat süreyle kültüre devam edilmiştir.

d) Harvest

*Bu süre sonunda flasklar etüvden alınarak besi yerleri steril tüplere aktarılmıştır,

*Her flaska 1 ml Tripsin-EDTA solüsyonundan konularak 15-30 saniye içerisinde bu solüsyon alınmış ve tüpe ilave edilmiş,

*İkinci kez 1ml lik Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek hücrelerin kalkışı inverted mikroskopta incelenmiş,

*3 dakika etüvde bekletilen flasklara 3 ml besiyeri ilavesiyle tripsinin etkisi nötralize edilmiş ve tüpe aktarılmıştır.

e) Preparat haline getirme

*Tüpte toplanan besiyeri+hücre süspansiyonu 800 rpm de 8-10 dakika santrifüje edilmiş,

*Süre sonunda süpernatant pastör pipeti ile atılmış,

*Dipte kalan çökelti üzerine önceden 37°C ye getirilmiş 0.075 M KCl den 5ml eklenerek 37°C de 25-35 dakika etüvde bekletilmiş,

*Tüpler süre sonunda 800 rpm de 8-10 dakika santrifüje edilmiş,

*Süpernatant atıldıktan sonra taze hazırlanmış tespit solüsyonundan 5 ml damla damla ilave edilmiş ve 30 dakika + 4°C deki buzdolabında bekletilmiş,

*Süre sonunda tekrar 800 rpm de 8-10 dakika santrifüje edilmiş süpernatant atıldıktan sonra taze fiksatif ilave edilmiş,

*Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-1 cc fiksatif kalacak şekilde süpernatant atılmış,

*Dipte kalan çökeltinin hafifçe pipetajından sonra daha önceden protokol ve seri numaraları yazılmış ve alkolde bekletilerek temizlenmiş lamalar üzerine ıslak veya kuru olarak 45° lik açı ile damlatılmış,

*Hazırlanan preparatlar alevden geçirilerek aynı gün; 60°C de bir gece bekletilerek veya oda ısısında üç gün süreyle yaşlandırılarak GTG ve C-Bant teknikleri uygulanmıştır.

3.2.4. Metafaz Plaklarının Bantlanması

Amniyon kültürü yöntemi uygulanarak elde edilen preparatlara yaşlandırma işleminden sonra GTG ve C-Bant teknikleri uygulanmıştır.

3.2.4.1. GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa) Bantlama

Preparatlar Başaran tarafından (1987) modifiye edilen prosedüre göre bantlanmıştır. GTG Bantlama için sırasıyla şu işlemler yapılmıştır :

- *Preparatlar bir gece 2xSSC solüsyonunda bekletilmiş,
- *Ertesi gün sırasıyla 10 dakika % 0.9 luk serum fizyolojik solüsyonunda, 2 şer dakika % 70 lik, % 95 lik ve % 100 lük alkol serisinden geçirilerek preparatlar havada kurutulmuş,
- *Daha önceden 15°C ye getirilen Tripsin solüsyonunda 60-95 saniye süreyle bekletilmiş,
- *Sırasıyla 1 dakika serum fizyolojik, 4 dakika giemsa solüsyonu ve 1 er dakikada buffer solüsyonu bulunan iki şaleden geçirilerek bantlama tamamlanmış,
- *Preparatlar havada kurutulduktan sonra xylolden geçirilerek entellan damlatılmış ve lamelle kapatılarak incelemeye alınmışlardır.

3.2.4.2.C-Bant (Sentromer)

Preparatlar Başaran tarafından (1987) modifiye edilen prosedüre göre bantlanmıştır.

C Bantlama için sırasıyla şu işlemler yapılmıştır,

- *Bir gece önceden BaOH₂ etüve konmuş,
- *Ertesi gün preparatlar 2 M HCl içinde 1 saat oda ısısında bekletilmiş, distile suda çalkalanmış,
- *Önceden ısı 50°C ye getirilmiş BaOH₂ dolu şalede 15 dakika tutulmuş,
- *Süre sonunda iki kez distile sudan geçirilmiş,
- *Isısı su banyosunda 50°C ye getirilmiş 2xSSC solüsyonuna konmuş,
- *1 saat bekletilmiş, süre sonunda distile suda çalkalanmış,
- *98 cc Buffer+2 cc giemsa ile hazırlanan boya şalesine konmuş,
- *1 saat 30 dakika bekletilmiş, süre sonunda distile suda çalkalanmış,
- *Preparatlar havada kurutulduktan sonra xylolden geçirilerek entellan damlatılmış ve lamelle kapatılarak incelemeye alınmışlardır.

Çizelge 3.1 Fenol/Kloroform ve İzamil Alkol/Kloroform Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan çözeltiler

5 x Retikülosit Tuz çözeltisi

Sodyum Klorür	:	686 mM	= 40.0890 g
Potasyum Klorür	:	25 mM	= 1.8640 g
Magnezyum Klorür	:	35 mM	= 7.1155 g

Çözücü çözelti (Lizat Hazırlama çözeltisi)

Amonyum Klorür	:	155.0 mM	= 80.29 g
Potasyum Bikarbonat	:	10.0 mM	= 1.001 g
Disodyum EDTA	:	0.1 mM	= 0.03722 g
ya da			
Amonyum Klorür	:	131.0 mM	= 7.00719 g
Amonyum Bikarbonat	:	0.9 mM	= 0.07110 g

Beyaz Kan Hücrelerini Parçalama Çözeltisi (WBL)

- *NaCl(4M) : 10 ml
- *EDTA(0.5M) : 20 ml
- *Direkt mezür içine konulup, ddH₂O ile 400 ml ye tamamlanmıştır.
- *120°C da 15 dakika otoklavda sterilize edilip oda ısısında saklanmıştır.

STE çözeltisi

Sodyum Klorür	:	100.0 mM	= 6 g
Tris HCl	:	10.0 mM	= 1.2114 g (pH 8.0)
EDTA (Disodyum tuzu)	:	1.0 mM	= 0.3722 g

Doymuş Fenol Hazırlanması

DNA özütlemesinde kullanılan doymuş fenolu hazırlayabilmek için:

- *250 g kristal fenol 50 ml saf suda çözündürülmüştür,
- *Üzerine 500 ml 1M Tris.HCl (pH 8.0) eklenip, karıştırılmıştır,
- *Fazlar ayrıldıktan sonra su fazı alınmış ve bu işlem 2-3 kez tekrarlanmıştır,
- *Su fazının pH sı 8.0 oluncaya kadar bu işlem sürdürülmüştür,
- *Su fazı alınarak koyu renkli şişede saklanmıştır.

%10 SDS çözeltisi

- *SDS : 10 g tartılmıştır.

*Dikkatlice beher içine alınıp SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek Üzerine ddH₂O ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

*56°C de bekletilerek çözündürülmüştür. (Ya da iyice solüsyona geçmesi için uzun bir süre (1-2 saat) manyetik karıştırıcı da çevrilmiştir.)

*0.22 mikron luk filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

*pH sı 7.2 ye ayarlanmış , oda ısısında saklanmıştır .

Proteinaz K çözeltisi

20 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

5M NaCl Çözeltisi

*NaCl : 292.2g tartıldıktan sonra,

*Mezür içine konulup, ddH₂O ile 1 lt ye tamamlanmıştır. Tamamen çözülene kadar manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır.

*120°C de, 15 dakika otoklavda sterilize edilerek, oda ısısında saklanmıştır.

Çizelge 3.2. CGH Analizi Normal Metafaz Plakları İçin Preparat Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

PBS Solüsyonu (Fosfat Tamponu (Buffer pH 6.8)

-Stok Solüsyon :

Solüsyon A

Potasyum Fosfat	4.539 gr.
Distile su	500 ml

Solüsyon B

Sodyum Fosfat	4.740 gr.
Distile su	500 ml.

Kullanma Solüsyonu

Solüsyon A	50.8 ml.
Solüsyon B	49.2 ml.

Hipotonik Solüsyon (70 mM KCl)

Potasyum Klorür	1.3 gr
Distile su	250 ml

Cornoy's Fiksatif Solüsyonu :

Methanol	3 kısım
Glaciel acetic acit	1 kısım

Çizelge 3.3. Preparatların Ön Yıkamasında Kullanılan Solüsyonlar

20xSSC Solüsyonu

3 M NaCl	175.30 gr
0.3 M Na-Sitrat	88.24 gr
Distile su	1000 ml

* HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

2xSSC Solüsyonu

20xSSC	10 ml
Distile su	90 ml

RNase / 2xSSC solüsyonu (5 ml)

RNase	50 mg
20xSSC	500 µl
Distile su	4500 µl

Çizelge 3.4. Denatürasyonda Kullanılan Solüsyonlar

Test ve Kontrol DNA %70 Formamid/%10 Dekstran sülfat/2xSSC Solüsyonu (Hibridizasyon Buffer)

Deiyonize Formamid	70 ml
2xSSC	20 ml
Dekstran Sülfat	10 ml

%70 Preparat Denatürasyon Solüsyonu

Formamid	70 ml
20xSSC	10 ml
Distile su	20 ml

Çizelge 3.5. Hibridizasyon sonrası yıkamalarda kullanılan solüsyonlar

1xSSC solüsyonu

20xSSC	5 ml
Distile su	95 ml

* HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

2xSSC Solüsyonu (pH 7.0)

20xSSC	50 ml
Distile su	450 ml

* HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

Çizelge 3.6. Görüntüleme Sistemlerinde Kullanılan Solüsyonlar

4T (4xSSC / Tween 20) Solüsyonu

20xSSC	200 ml	
Tween 20	5 ml	
Distile su	795 ml	HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

DAPI / Yüzey Boyası (Antifade) Solüsyonu

DAPI	1 mg
Yüzey boyası	10 ml

Çizelge 3.7. Amniyosit Kültüründe Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

A)	Amniomed komplet medium	100 ml
B)	Chang Medium in situ	100 ml
	Penicillin-Streptomycin	1.2 ml
	Gentamicin	0.2 ml
C)	CDM Basal Medium1	100 ml
	CDM supplement	0.8 ml
	Penicillin-Streptomycin	1.2 ml
	Gentamicin	0.2 ml

Çizelge 3.8 GTG'de Kullanılan Tamponlar :

Fosfat Tamponu (Buffer pH 6.8)

-Stok Solüsyon :

Solüsyon A

Potasyum Fosfat	4.539 gr
Distile su	500 ml

Solüsyon B

Sodyum Fosfat	4.740 gr
Distile su	500 ml

-Kullanma Solüsyonu

Solüsyon A	50.8 ml
Solüsyon B	49.2 ml

2xSSC Tamponu (pH 7.2)

Sodyum Klorür (0.3 M)	17.53 gr
Trisodyum Sitrate (0.03M)	8.82 gr
Distile su	1000 ml

Çizelge 3.9. GTG Bantlamada Kullanılan Solüsyonlar :

Trypsin :

Stok solüsyon : 10 ml suda sulandırıldı.

Kullanma solüsyonu :

Stok tripsin	3.5 ml
Serum fizyolojik	80 ml

Serum Fizyolojik (SF.) % 0.9'luk

Giemsa Boya Solüsyonu :

Giemsa solüsyonu	15 ml
Buffer solüsyonu	60 ml

Çizelge 3.10. Uzun Süreli Amniyon Kültürü Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar:

Colcemid Solüsyonu 10mg/ml

Hipotonik Solüsyon (0.075 M) :

Potasyum klorür	1.398 gr
Distile su	250 ml

Fiksatif Solüsyonu :

Methanol	3 kısım
Glaciel acetic acit	1 kısım

Çizelge 3.11. Kimyasal Maddeler

- Agaroz
- Amonyum asetat
- Amonyum klorid
- Asetik asit
- Borik asit
- Bromfenolblue
- dNTP seti
- Biotin-11dUTP(Roche 50 mM)
- Digoxigenin-11dUTP(Roche 50mM)
- EDTA (dihidrat)
- Etanol (95%)
- Ethidium bromid
- Proteinaz K
- HCl
- Potasyum bikarbonat
- Sodyum dodesil sülfat
- Sodyum hidroksit
- Sodyum klorid
- Trisma base
- Fenol
- Kloroform
- Parafilm
- İzoamil alkol
- İzopropanol
- Sodyum sitrat
- Ham's F-10 Medium (Sigma)
- Chang Medium (Sigma)
- CDM (Sigma)
- Penicillin-Streptomycin (Sigma)
- Gentamicin (sigma)
- L-Glutamin (Sigma)
- Trypsin-EDTA (Sigma)
- Pepsin(Sigma)
- RNase (Sigma)
- Glacial asetik asit (Merck)
- Metanol (Merck)
- Alkol (Tekel)
- KCl (Sigma)
- NaCl (Merck)
- Na-sitrat (Merck)
- Tween 20 (Sigma)
- Tris-Cl (Merck)
- Avidin (Oncor)
- Sheep α Digoxin FITC (Boeh. Man.)
- DAPI (Sigma)
- Antifade (Vector)
- Giemsa-Lösing (Merck)
- Xylol (Merck)
- Entellan (Merck)
- İmmersion yağı (Merck)

Çizelge 3.12. Aygıtlar

-Elektroforez için güç kaynağı	-Mikropipet (Eppendorf, Transferpette)
-Hassas terazi	-Mikropipet ucu (Eppendorf)
-Minijel elektroforez aleti	-Laboratvuar saati (Casio)
-MP4 Kamera sistemi	-Steril santrifüj tüpü, cam
-PCR aleti (thermal cycler)	-Steril disposable petri kabı (Nunc)
-Soğutmalı santrifüj	-Steril Doku Kültürü Flaskı (Nunc, Costar)
-Spektrofotometre	-Milipor 0.22 mM (Milipor Cor.)
-Su banyosu	-Steril Disposable enjektörler (1, 2.5, 5, 10, 20 ml)
-UV transilüminatör	-Pastör Pipeti
-Deep-freeze	-Mezür
-Mikrodalga fırın	-Beher
-Falkon tüpü	-Şale (Yatay, dikey)
-Eppendorf tüpü	-Lam
-İnkübatör (Heraeus)	-Lamel
-Kuru hava sterilizatörü (Dedeoğlu)	-Bunsen bek
-Kuru hava etüvü (Wtb-Binder)	-Cam Kalemi
-Zaman ayarlı santrifüj (Hettich- Rotofix-II)	
-Mikrosantrifüj (Ep.Cen. 5415C)	
-Binoküler araştırma mikroskopu (Olympus)	
-İnverted Mikroskop (Olympus)	
-Floresan Mikroskop (Carl- Zeiss)	
-Image Analyser (PSI)	
-Sensy Camera (Photometrics)	
-Lamin Air Flow (Heraeus ELB 2448)	
-Elektronik Terazi (Ainsw.-AA- 250,Set.-M2000L)	
-pH metre (Crison micro pH 2002)	
-Bidistile su cihazı (Barnstead F. II,Glasstill)	
-Buz makinesi (Philips- Whirlpool 20)	
-Ben mari (Heto-DT Hetoterm)	
-Buzdolabı (Arçelik 4080-T)	
-Deep-Freeze (Caravel,Tr.,Denmark)	
-Hot Plate (Dedeoğlu)	
-Hot plate+Vortex (Heidolph Mr 2002)	
-Vortex (Janke and Kunkel,UF- 2)	
-Shaker (Nüve SL 350)	

4. BULGULAR

Kültüre edilmemiş amniyositler ve trofoblastlarda CGH tekniği ile fetal cinsiyet ve sitogenetik analizlerini içeren bu çalışma, değişik nedenlerle prenatal tanı endikasyonu konulan ve gebelik haftası nedeniyle amniyosenteze (35 adet) ve CVS (5 adet) için karar verilen 40 gebe kadından alınan örneklerde gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmanın temel amacını, yüksek sıklıkta gözlenen sayısal, yapısal, gonozomal ve otozomal kromozom anomalilerinin 3-5 gün gibi kısa bir süre içerisinde saptanmasını olanaklı kılan yöntemin uygulanabilirliği ile güvenilirliğinin belirlenmesi ve analizin bilim dalımız laboratuvarlarında rutine sokulması oluşturmaktadır. Bu temel amaç çerçevesinde; alınan amniyon sıvısında/trofoblastta analize olanak sağlayacak hücre miktarı ile gebelik haftası arasındaki ilişki, kültüre edilmeyen amniyosit/trofoblast DNA ları ile kontrol DNA larının tam ve spesifik olarak metafaz plaklarına hibridize olabilmeleri ile bu hibridizasyonun mikroskopta görüntülenmesinde, CGH sinyallerinin gözlenebildiği metafaz oranı, her metafazda saptanan floresan sinyal yoğunluk oranı; doku kültürü yöntemi ile elde edilen karyotip ile karşılaştırılarak yöntemin uygulanabilir, güvenilir ve spesifik olup olmadığı değerlendirilmiş ve bulgular bu amaçlar doğrultusunda verilmiştir.

Bu çalışmada incelenen toplam 35 amniyotik sıvı örneğinden gestasyonel yaşı erken olan 3 amniyon örneğinde amniyosit miktarı, ileri dönemlerdeki gebeliklerden elde edilen hücre miktarına göre daha düşük bulunmuştur. Ancak uygulanan DNA ekstraksiyon yöntemi ve bunu takiben gerçekleştirilen DOP-PCR yönteminde bu bir soruna neden olmamıştır.

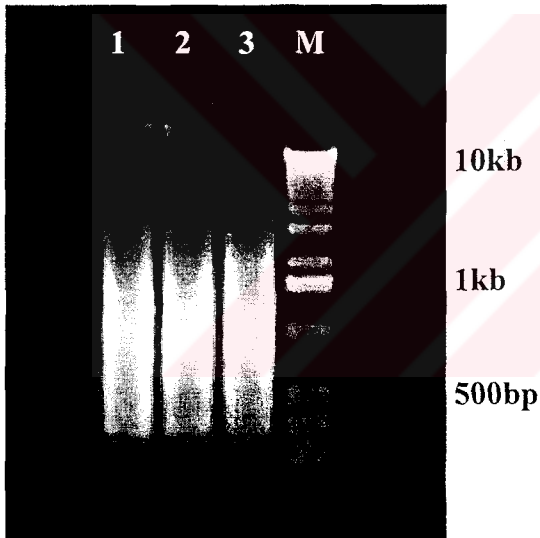
Bu çalışmada çeşitli endikasyonlar nedeniyle (Çizelge 4.2) kromozom düzensizliği bakımından risk altında olan toplam 40 fetusa ilişkin CGH bulguları klasik sitogenetik analiz bulguları ile karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.2 de de görüldüğü gibi, 40 örnekten 38 tanesinde saptanan CGH bulgusu gerek cinsiyet gerek otozomal anöploidi bakımından sitogenetik analizlerle uygunluk göstermektedir. Yanlış pozitif ve yanlış negatif herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

4.1. DNA Ekstraksiyonu ve DOP-PCR Arasındaki İlişki

DNA ekstraksiyonu ile elde edilen DNA nın CGH da kullanımı için DOP-PCR yöntemi uygulanmıştır. DOP-PCR da kullanılacak DNA nın protein ve RNA dan arındırılmış olması ve yeterli miktarda DNA bulunması bu çalışmada en önemli aşamalardan birisidir. Bu nedenle her örnekten DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra spektrofotometre yardımı ile elde edilen DNA ların OD ölçümleri gerçekleştirilmiş ve DOP-PCR da kullanılacak 2-4 µg DNA miktarının örneğe göre kaç µl de yer aldığı tespit edilmiştir.

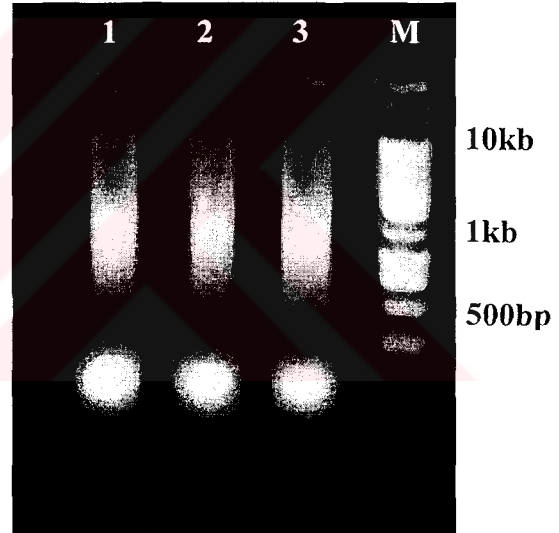
DOP-PCR I ve II den sonra elde edilen jel görüntülerine bakılarak uygun DNA kesiminin ve amplifikasyonunun olup olmadığı kontrol edilmiştir. Prob olarak kullanılacak DNA larda fragmentlerin 300-2000 bp arasında olup olmadıkları araştırılmıştır. Bu amaçla 1 kb lik marker kullanılarak DOP-PCR I ve II sonuçları kontrol edilmiştir(Resim 4.1.1 ve 1.2.). Jelde gözlenen smear değerlendirilerek gerekirse DOP-PCR I ve II tekrarlanmıştır.

Resim 4.1.1 ve 4.1.2’de verilen DOP-PCR ürünlerinin görünümüleri değerlendirildiğinde amplifiye olan DNA miktarı ve amplifiye olan genomik DNA’nın fragment büyüklükleri ile başarılı CGH bulguları arasında yakın ilişki olduğu saptanmıştır. Resim 4.2’de görülen DOP-PCR ürünleri ile yapılan CGH deneylerinde sonuç alınamamıştır. Genomik DNA fragmentlerinin 300-2000 bp arasında olması gerektiği, bu örneklerde tekrarlanan DOP-PCR ve CGH deneyleri sonucu ortaya konmuştur (Resim 4.2).



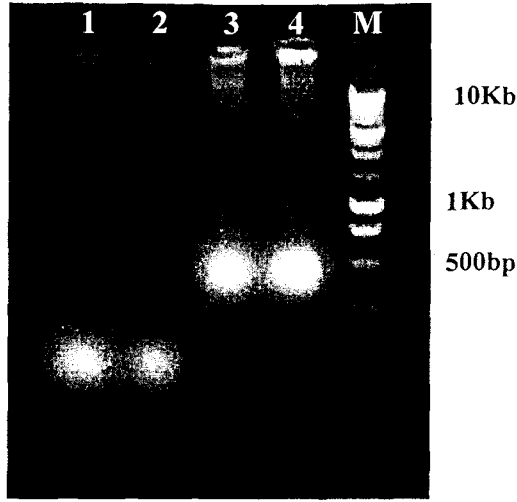
1, 2 : Test DNA
3 : Kontrol DNA
M : Marker(1 kb)

Resim 4.1.1 DOP-PCR I sonrasında DNA ların %1.2 lik jeldeki görüntüleri.



1, 2 : Test DNA
3 : Kontrol DNA
M : Marker(1 kb)

Resim 4.1.2 DOP-PCR II sonrasında işaretli DNA ların %1.2 lik jeldeki görüntüleri.



1, 2 : Kontrol DNA
3,4 : Test DNA
M : Marker

Resim 4.2 DOP-PCR sonrası sonuç alınamayan bir olguda jel görüntüsü

4.2 Normal Metafaz Plaklarının Morfolojik Özellikleri ve Doğru Denatürasyon Arasındaki İlişki

Bu çalışmada kültüre edilmemiş amniyositlerden CGH için preparat hazırlarken Başaran tarafından (1985) modifiye edilen yöntem esas alınmıştır. Çalışmanın ilk dönemlerinde hazırlanan preparatlarda protokol aynen uygulanmış ilk iki olgu hariç diğer olgularda CGH ile başarılı sonuç alınmıştır. Ancak yönteme ilave olarak, zaman zaman oluşan sitoplazma kalıntılarının önüne geçebilmek amacıyla normal metafaz kromozomları preparat haline getirildikten sonra Gereç ve Yöntemler bölümünde de ifade edildiği gibi Cornoy's fiksatif ve %70 asetik asit solüsyonları ile muamele edilmiştir. Bu amaçla preparatlar hazırlandıktan sonra önce 10 saniye süre ile fiksatifte yıkanmış, hafifçe kurutulduktan sonra 20 saniye süre ile %70 asetik asitte bekletilmiştir.

İlk iki denemede test ve kontrol DNA larından hazırlanan prob karışımının uygulanmasından sonra yapılan mikroskopik incelemede prob DNA ların uygun olmayan denatürasyon koşulları nedeniyle metafazlara hibridizasyonunun gerçekleşmediği saptanmıştır. Çizelge 4.1 de görüldüğü üzere formamid konsantrasyonu sabit kalmak şartı ile ısı ve süre değiştirilerek değişik denatürasyon süreleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve en iyi sonucun 3 dakikada ve 73°C da denatüre edilen preparatlardan elde edildiği saptanmıştır. Bu preparatlarda metafazlar koyu siyah renkte gözlenmiş ve protoplazma artefaktına da rastlanmamıştır. Çizelge 4.1 de de gözlendiği gibi denatürasyon süresi 7 dakikaya kadar uzatılmıştır. Ancak bu preparatlarda metafazların morfolojik yapısının bozulmaya başlaması, sonucu olumsuz etkilemektedir. Normal metafaz yaymalarının morfolojik yapısının düzgün olması nedeniyle çalışmanın devamında denatürasyon süresi 3 dakika ve denatürasyon ısı da 73°C olarak uygulanmıştır. Ancak CGH analizinin gerçekleştirildiği her preparat denatürasyon sonrası faz-kontrast mikroskopta değerlendirilmiş ve istenilen nitelikte olmayan preparatlar yerine yenileri tekrar denatüre edilmişlerdir.

Çizelge 4.1 Normal Metafaz Yaymalarının %70 Formamid Solüsyonunda Değişik Isı ve Süre ile Denatürasyonları ve Etkileri :

Denatürasyon Süresi (dk)	Denatürasyon Isısı °C	Metafaz Morfolojisi	Floresan Sinyal Yoğunluk Kalitesi
7	75	Açık gri renkte	Çok zayıf
6	75	Açık gri renkte	Çok zayıf
5	75	Açık gri renkte	Çok zayıf
4	75	Açık gri renkte	Çok zayıf
3	75	Gri renkte	Zayıf
7	73	Koyu gri renkte	Orta
6	73	Koyu gri renkte	Orta
5	73	Siyah renkte	İyi
4	73	Siyah renkte	İyi
3	73	Koyu siyah renkte	Çok iyi

4.3.CGH in Optimizasyonu

Bu çalışmanın genel bilgiler bölümünde belirtildiği gibi CGH analizi kopya sayısı değişimlerini gösteren bir tekniktir. Test ve kontrol DNA hibridizasyonu sonucu oluşan sinyal yoğunluklarının birbirlerine eşit olması gerektiği gibi floresan sinyallerinin anlamsız zemin sinyallerine (background) oranı da çok yüksek olmamalıdır. Çalışmamızda eşik yoğunlukta floresan sinyallerini alabilmek ve normal olarak değerlendirilmesi gereken oranları saptamak için normal kromozom kuruluşuna sahip olduğu bilinen DNA örneklerinde CGH deneyleri gerçekleştirilmiştir. Erkek ve kadın DNA'larının gerek kendi içlerinde (erkek:erkek; dişi:dişi) gerekse birbirleri arasında (erkek:dişi) yapılan hibridizasyonlar sonucu tüm otozomlar ile X ve Y kromozomlarının DNA eşik düzeyleri 0.75-1.25 arasında hesaplanmıştır (Grafik 4.1). Kontrol DNA'lar arasında yapılan hibridizasyonlarda tüm kromozomların standart olan 1.0 bölgesinde yoğunlaştığı, dişi:erkek (test DNA:kontrol DNA) DNA hibridizasyon profillerinin otozomal kromozomlar için 1.0 bölgesinde, ancak X kromozomu için 1.25 bölgesini aştığı gözlenmiştir.

Analiz hassasiyetini arttırmak için yapılan oran daraltmalarında 0.50-1.50, 0.85-1.15 oranları incelenmiş olup her iki aralıkta da yanlış pozitif amplifikasyon-delesyon grafikleri gözlenmiştir. Bu nedenle laboratuvar standardı 0.75-1.25 floresan yoğunluk oranı olarak belirlenmiştir.

Bulguları etkileyen diğer parametre olan floresan sinyal oranının anlamsız sinyallere oranının yüksek olması tamamıyla hibridizasyonun yapıldığı metafaz preparatlarının kalitesine bağlı olduğu belirlenmiştir. Yüksek kalitede olan bir preparatta bu oranın en az iki olması gerektiği, yani kromozomların floresan yoğunluklarının yüzey sinyallerine göre en az iki kat olması gerektiği saptanmıştır. Bu oran, preparatların metanol-asetik asit ile daha sonra da % 70 asetik asit muamelesi ile elde edilmiştir.

4.4. Test DNA'larında CGH Analiz Bulguları

Bu çalışmada 40 olguya ilişkin amniyosentez ve CVS örneklerinden elde edilen DNA'lar CGH tekniği ile prospektif olarak incelenmiştir. Analizi yapılan 40 örnekten iki tanesinde tekrarlanan deneylere rağmen sonuç alınamamıştır (Çizelge 4.2). Sonuç alınamayan iki olgudan bir tanesinde tüm metafazlarda homojen olmayan floresan dağılımı saptanmış olup değerlendirmeye alınmamıştır. Diğer örnekte ise hibridizasyon gerçekleşmemiş mikroskopik değerlendirmede hiçbir floresan sinyal elde edilememiştir. Bu örnekte DOP-PCR amplifikasyonu ile oluşan fragmentlerin büyüklüklerinin uygunsuzluğu ve/veya preparasyon kalitesinin yetersizliğinin etken olduğunu düşünmekteyiz. Ancak konvensiyonel sitogenetik analizlerde her iki fetusun da normal karyotipe sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Fetal DNA'ların analizlerinde, tüm preparasyonlarda eşik değer oranlarını 0.75-1.25 aralığında olduğu kontrol grubunda saptanan değerlerin geçerliliğini koruduğu gözlenmiştir (Grafik 4.5). Tüm mikroskopik değerlendirmelerde metafazlardaki floresan sinyal dağılımının eşit olmasına dikkat edilmiş olup bu özellik önemli bir kriter olarak değerlendirilmiştir. Metafazlardaki fetal DNA kopya sayısındaki kayıp ve/veya artışı test DNA/kontrol DNA yani yeşil/kırmızı oranına göre değerlendirilmiştir. Oranı 0.75'ten düşük olan kayıp, 1.25'den büyük olan ise kazanç olarak yorumlanmış olup CGH profillerinde her kromozom tek tek değerlendirilmiştir.

Metafazların %94.5'inde floresan oranları normal sınırlar içerisinde (%89-100) gözlenmiştir (Grafik 4.5). Tekrarlayan dizilerin yoğun olduğu bölgeler olması nedeniyle kromozomların sentromerik ve telomerik bölgeleri ile heterokromatin sınırlarını tutan normalden sapan profiller normal olarak değerlendirilmişlerdir.

Tüm örneklerde fetal cinsiyete kesin olarak tanı konmuştur (Grafik 4.1, 2, 3, 4, Resim 4.3). Başarılı olunan 38 örnekten 22 tanesi kız 16 tanesi de erkektir ve tümü sitogenetik olarak doğrulanmıştır (Resim 4.5 ve 6). Tüm deneylerde erkek bireye ait kontrol DNA'sı kullanılmıştır. Grafik 4.2.'de de görüldüğü üzere XX cinsiyeti fetusun profilinde üst sınır eşik değerini aşan (>1.25) bir profil, XY cinsiyetli fetusun grafiğinde ise her iki gonozomal kromozomun profilleri standart (=1.0) oranda gözlenmiştir.

Fetal örneklerin otozomal kromozomları incelendiğinde ise kromozomların sentromer telomer ve heterokromatin bölgeleri dışındaki pter-qter floresan sinyal renkleri ve grafikleri yorumlanmıştır. Analizi yapılan 38 olgunun 36'sında tüm otozomal kromozomlarda yeşil (test DNA) ve kırmızı (kontrol DNA) floresan sinyallerinin birbirleri ile örtüştüğünü ifade eden mavi-turuncu renk gözlenmiştir (Resim 4.4). Kromozomlardaki floresan sinyallerinin anlamsız yüzey sinyallerine oranının >2 olduğu metafazlar incelenmiş olup, gerek FITC gerekse TRITC sinyal yoğunluklarının birbirlerine yakın olmaları değerlendirmede önemli bir kriter olmuştur. İncelenen 36 örneğin otozomal kromozomlardaki DNA oranları standart aralık içerisinde yer almıştır (Grafik 4.5).

Fetal örneklerden bir tanesinde karyotipin ökromatik bölgelerinde, X ve Y kromozomu normal aralıklarda bir oran sergilerken, 21 numaralı kromozomun grafiğinde sağ tarafa doğru (>1.25) bir kayma gözlenmiştir (Grafik 4.6 ve 7). Olgunun uygulandığı metafazlar bu kromozom çifti açısından değerlendirildiğinde ise 21 numaralı kromozoma ait yeşil floresan sinyallerinin belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır (Resim 4.5). Bu fetusun kromozom kuruluşu trizomi 21 ve erkek olarak yorumlanmıştır.

İncelenen fetal örneklerden bir diğerinde ise kromozomların ökromatik bölgelerinde X ve Y kromozomları normal aralıklarda bir oran sergilemiştir. Bu örnekte otozomal kromozomlardan 1 nolu kromozomun q kolunun terminalinde (1q42.11-q44) yoğun yeşil floresan renk dikkati çekmiş olup oran profilinde de 1q42.11-q44 bölgesinde sağa kayan >1.25 bir oran ile karşılaşılmıştır (Resim 4.6 ve Grafik 4.8 ve 9). Bu fetusun CGH bulgusu 1q42.11-q44'de artan bir DNA materyali olduğu ve cinsiyetinin de XY kuruluşunda olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı olgunun sitogenetik analiz sonucu incelendiğinde kromozom kuruluşunun 46,XY,18q+ olduğu gözlenmiştir (Resim 4.10).

4.5. Kültüre Edilmemiş Amniyositlerden/Trofoblastlardan Elde Edilen CGH Bulgularının Rutin Sitogenetik Analizlerle Karşılaştırılması

Amniyosit ve trofoblast kültürleri yapılan 40 fetal örneğin sitogenetik analizlerinde başarılı olunmuş ve fetal karyotipler saptanmıştır. İncelenen 40 fetusun 22 tanesi kız, 18 tanesi de erkektir (Çizelge 4.2). Sitogenetik analizler ile CGH analiz bulguları saptanan cinsiyetler açısından birbirleriyle karşılaştırıldıkları zaman, iki olgu (CGH ile sonuç alınamayan) dışında CGH bulguları ile sitogenetik analiz bulgularının birbirini destekler nitelikte oldukları gözlenmiştir. Olguların CGH verilerinde farklı bir gonozomal kromozom kuruluşu sonucu ile karşılaşılmamıştır.

Fetusların otozomal kromozomları CGH ve kromozom analiz bulguları değerlendirildiğinde ise aynı başarı elde edilmiştir. Sitogenetik analizlerde incelenen 40 fetusun 38'inde normal karyotip olduğu saptanmıştır ve bu fetusların CGH bulguları da aynı yöndedir. Laboratuvarın standardı olarak belirlenen 0.75-1.25 oran aralığının güvenilir olduğu

ve gerek elde edilen DNA örneklerinin kalitesi gerekse hibridizasyonun yapıldığı metafaz plaklarının yüksek kalitede olması halinde tüm hibridizasyon preparatlarında aynı oranın geçerli ve güvenilir olduğu gözlenmiştir.

Önceki bölümde de ifade edildiği gibi bir fetal örnekte CGH verileri erkek fetusun 21 numaralı kromozomunda kopya sayısında artış olduğunu göstermiştir (Grafik 4.6 ve 7 ve Resim 4.5). Bu fetusun (olgu no:10) kromozom kuruluşu 47,XY+21 olarak saptanmıştır (Resim 4.9). Her iki yöntemin birbirleriyle uyumlu olması CGH tekniğinin güvenilirliğini göstermiştir.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon analizi yapılan 35 numaralı olguda fetal cinsiyet XY olarak yorumlanırken floresan sinyal fenotipi ve profil değerlendirmesine göre bu fetusun 1q42.11-q44 bölgesinde DNA kopya artışı olduğu gözlenmiştir (Grafik4.8, 9 ve Resim 4.6). Bu fetusun kromozom kuruluşu 46,XY 18q+ olarak saptanmıştır (Resim 4.10). Yapılan detaylı sitogenetik analizde 18 numaralı kromozomun q kolunda herhangi bir delesyon bulunmamakta, buna karşılık o bölgede bir artış vardır ve bu artış 1q42.11-q44 bölgesine ilişkin bantları bünyesinde bulundurmaktadır. Yani fetus 1q42.11-q44 parsiyel trizomi karyotipine sahiptir. Sitogenetik analiz CGH bulgusunu desteklemiştir.

Çizelge 4.2 Olguların Yaş, PT Endikasyonu, Gestasyonel Yaş ve CGH ile Sitogenetik Tanılarını içeren çizelge :

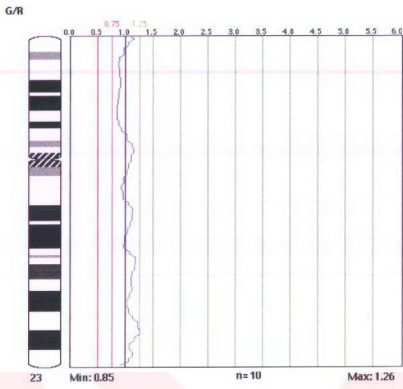
Olgu No	Anne Yaşı	Gebelik haftası	Endikasyonu	Tanı CGH	Tanı Sitogenetik
1	35	16	İleri maternal yaş	-	46,XY
2	38	17	İleri maternal yaş	-	46,XY
3	35	18	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
4	39	17	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
5	38	16	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
6	32	16	Fetal omfalosel	Normal, XX	46,XX
7	37	17	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
8	39	17	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
9	39	17	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
10	38	16	İleri maternal yaş	XY,amp21	47,XY+21
11	36	16	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
12	35	19	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
13	37	16	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
14	37	15	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
15	30	20	Üçlü testte yüksek risk	Normal, XY	46,XY

(Çizelge 4.2 nin devamı)

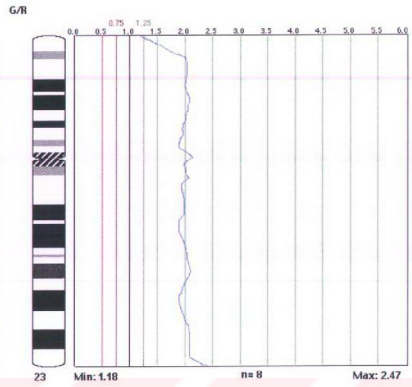
Olgu No	Anne Yaşı	Gebelik haftası	Endikasyonu	Tanı CGH	Tanı Sitogenetik
16	30	17	Koroid pleksus kisti	Normal, XX	46,XX
17	37	19	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
18	37	18	İleri maternal yaş+T.SAb	Normal, XX	46,XX
19	38	20	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
20	28	17	Tekrarlayan SAb	Normal, XX	46,XX
21	36	16	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
22	35	20	İleri maternal yaş+SAb.	Normal, XX	46,XX
23	36	16	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
24	41	20	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
25	27	20	Down Send.Çocuk öyk.	Normal, XY	46,XY
26	27	17	Down Send.çocuk öyk.	Normal, XX	46XX
27	43	17	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
28	34	17	Üçlü testte yüksek risk	Normal, XX	46,XX
29	27	16	Down Send.çocuk öyk.	Normal, XX	46,XX
30	35	18	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
31	25	17	Koroid pleksus Kisti	Normal, XX	46,XX
32	35	20	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
33	38	16	İleri maternal yaş	Normal, XY	46,XY
34	27	20	Trizomi 18 li çocuk öyk.	Normal, XY	46,XY
35**	27	16	Tekrarlayan SAb.	XY,amp,1q42-44	46,XY,18q+
36*	23	12	Üçlü testte yüksek risk	Normal, XX	46,XX
37*	38	10	İleri maternal yaş	Normal, XX	46,XX
38*	25	11	Tekrarlayan SAb	Normal, XX	46,XX
39*	29	12	Down Send.çocuk öyk.	Normal, XY	46,XY
40*	31	11	Kötü obstetrik öykü	Normal XY	46,XY

* CVS

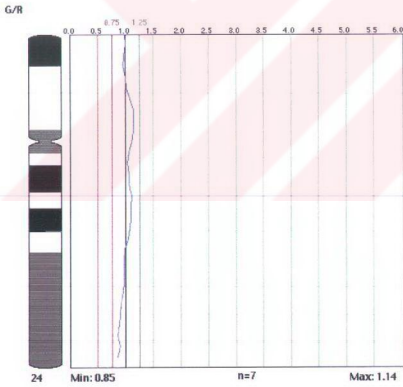
** Düşük materyalinden CVS



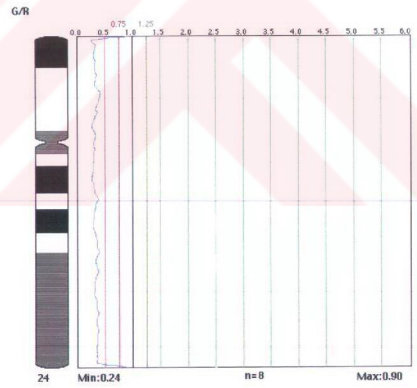
Grafik 4.1. Erkek olguda X e ait CGH oran profili



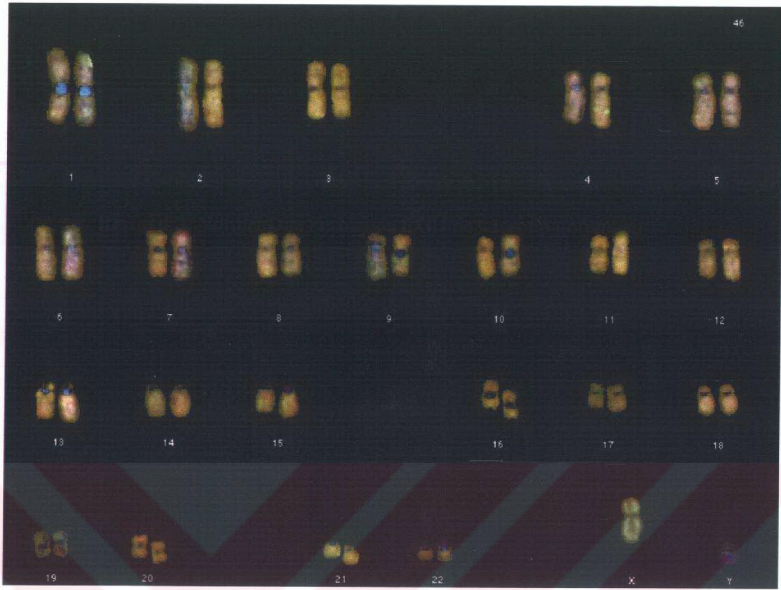
Grafik 4.2. Dişi olguda X e ait CGH oran profili



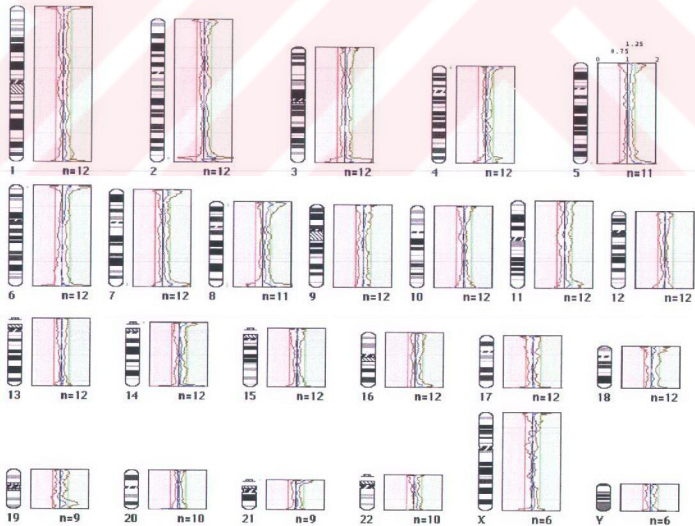
Grafik 4.3. Dişi olguda Y ye ait CGH oran profili



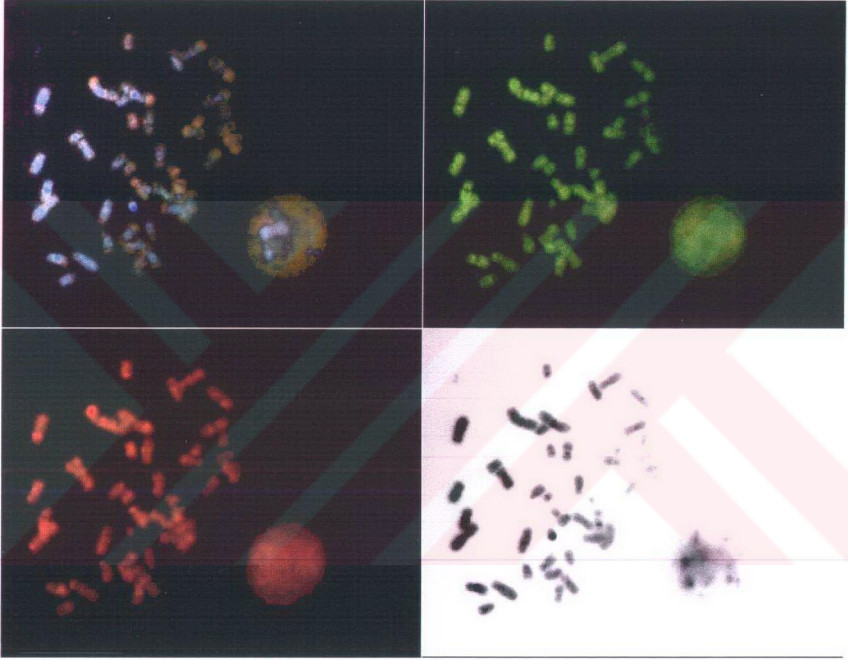
Grafik 4.4. Erkek olguda Y ye ait CGH oran profili



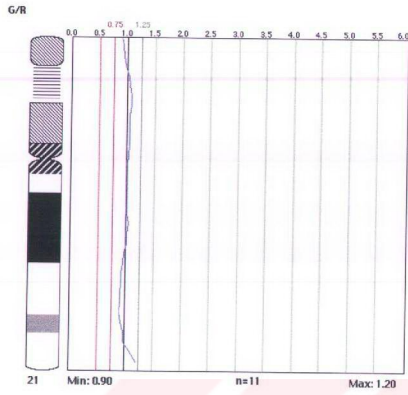
Resim 4.3. Normal Dişi bir olguda CGH de karyotip görüntüsü



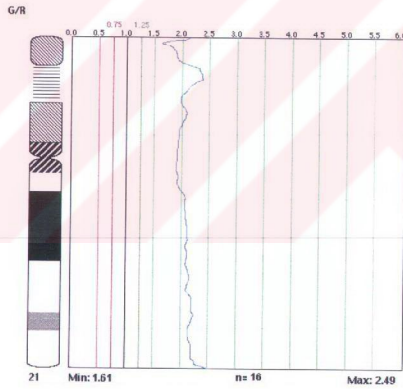
Grafik 4.5. Normal erkek bir olguda tüm kromozomlara ait birden fazla metafazın CGH oran profilleri



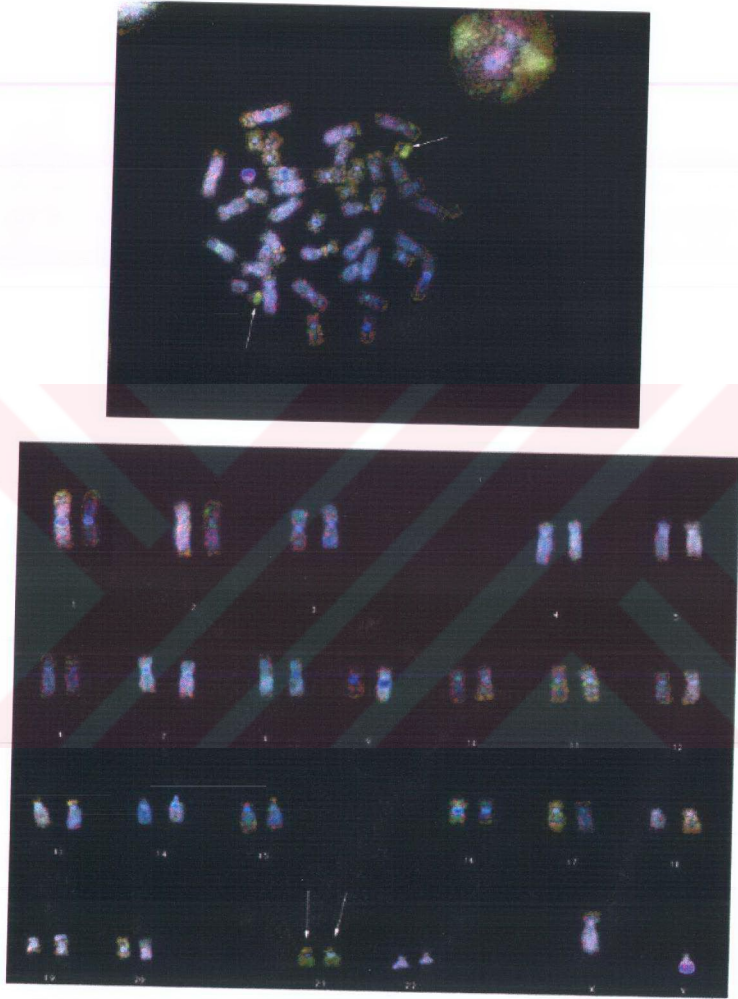
Resim 4.4. Normal bir olguda aynı metafazın multicolor, FITC, TRITC ve DAPI görüntüsü.



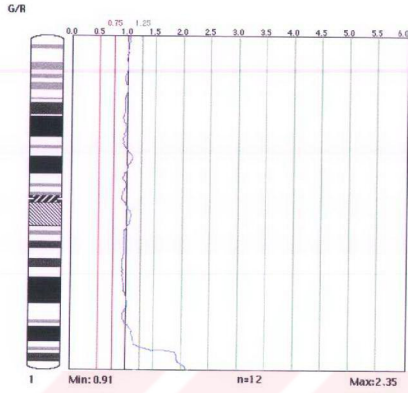
Grafik 4.6. Normal bir olguda 21 numaralı kromozomun CGH oran profili



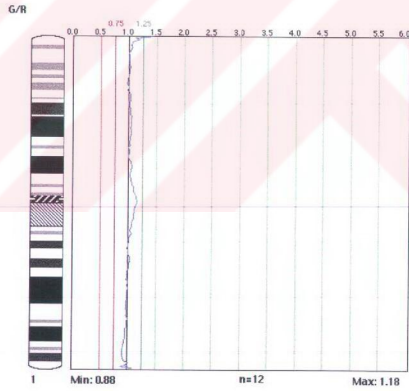
Grafik 4.7. Trizomik bir olguda 21 numaralı kromozomun CGH oran profili



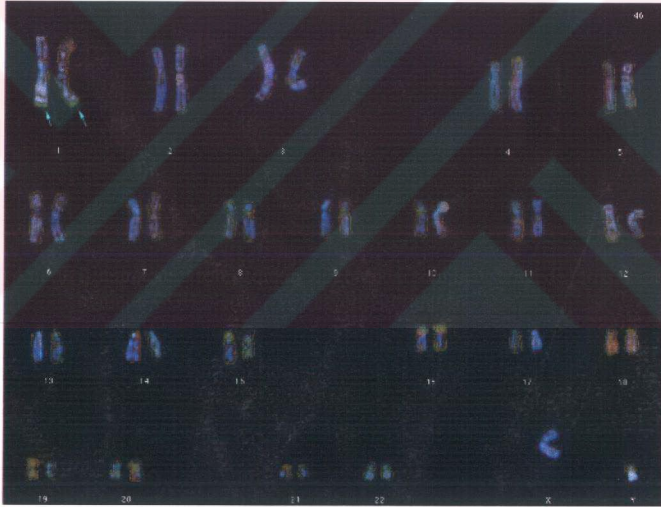
Resim 4.5. Trizomik bir olgunun CGH da metafaz ve karyotip görüntüsü



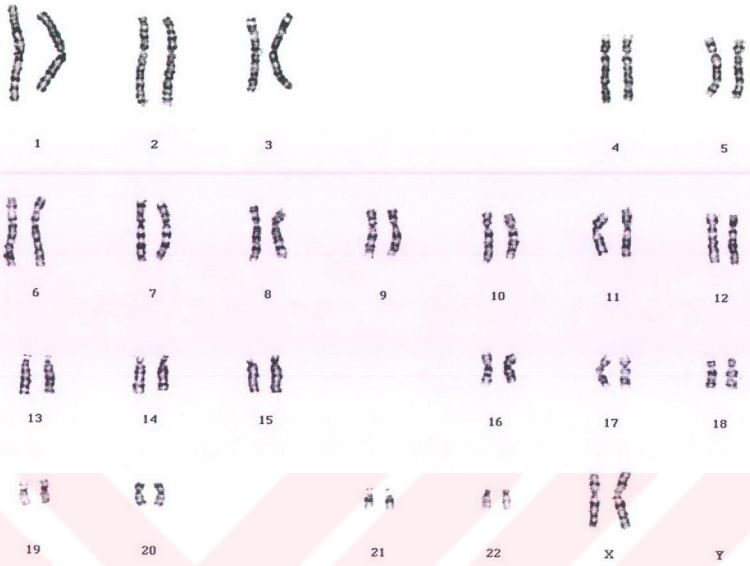
Grafik 4.8. 1 numaralı kromozomun q42.11-q44 bölgesinde artışı ifade eden CGH oran profilini gösteren grafik



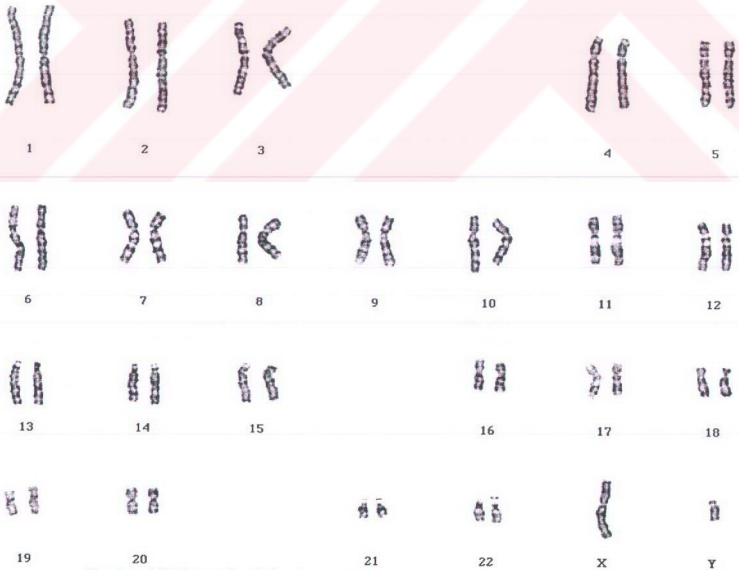
Grafik 4.9. Normal olguda 1 numaralı kromozoma ait CGH oran profilin gösteren grafik



Resim 4.6. 1 numaralı kromozomun q kolunda terminal bölgede artış saptanan olgunun CGH metafaz ve karyotip görüntüsü



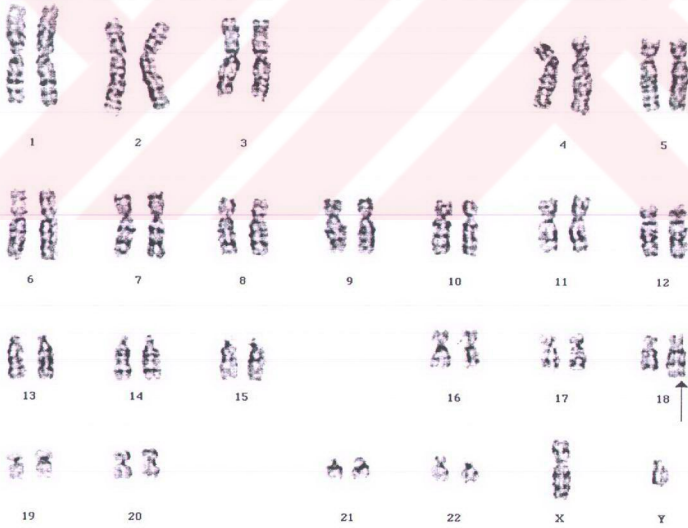
Resim 4.7 Normal dişi olguya ilişkin karyotip.



Resim 4.8 Normal erkek olguya ilişkin karyotip.



Resim 4.9 CGH te trizomi 21 olduğuna karar verilen olguya ait karyotip.



Resim 4.10 CGH te 1q+ olarak değerlendirilen olguya ait karyotip sonucu.

5. TARTIŞMA

Kalıtsal hastalıkların öneminin anlaşılması, mortalite oranlarındaki kalıtımın belirlenmesi bu hastalıkların önlenmesi için yapılması gerekenleri gündeme getirmiştir. Populasyon taramaları ile taşıyıcıların belirlenmesi, bu yaklaşımlardan biridir. Ancak bu hastalıklara sahip bireylerin doğmadan önce saptanması ve ailelere sağlıklı çocuk sahibi olma şansının verilmesi, yani prenatal tanı endike gebeliklerin değerlendirilmesinde etkili bir yaklaşımdır (5, 7, 8, 41).

Prenatal tanı uygulamaları 1970 li yıllardan itibaren uygulanmaya başlanmıştır. Günümüze kadar geçen süreç içerisinde amniyosentez en çok uygulama alanı bulmuş, beraberinde koryon villus biyopsisi ve fetal kan örnekleme gibi invaziv teknikleri uygulanmaya başlanmıştır. Endike olgularda direkt fetal örneğin incelenmesini sağlayan bu invaziv teknikler, anne ve fetusu fizyolojik ve psikolojik açıdan riske sokmayacak en erken gebelik döneminde materyal alımını sağlayabilmek ve fetus genotipine ilişkin bilgilerin en kısa süre içerisinde ortaya konabilmesi hedefleri doğrultusunda uygulamaya sokulmuşlardır (22, 23, 30, 49, 67, 71, 72, 76, 86).

Amniyosenteze alternatif olan ve gestasyonun ilk trimesterinde uygulanabilirliği ile 24-72 saat içerisinde fetusun kalıtsal hastalık açısından değerlendirilmesini olanaklı kılan CVS, çok kısa süre içerisinde geniş uygulama alanı bulmuştur. Ancak bugün CVS ile alınan materyalin fetusu tam olarak yansıtmaması ve direkt trofoblast analizi ile özellikle fetal karyotipin belirlenmesindeki yetersizlikler, klasik invaziv doğum öncesi tanı yöntemi olan amniyosentezin daha yoğun olarak kullanılmasına neden olmuştur (23, 49, 76).

Özellikle kromozom aberasyonları açısından endikasyonu bulunan fetuslardan alınan gerek amniyosit gerekse trofoblast hücrelerinin uzun süreli kültür sonrası sitogenetik analizlerinin yapılması, yoğun bir çaba ve zaman istemektedir (5, 8, 78).

Kesin tanının saptanabileceği sürenin kısaltılmasına ilişkin arayışlar içerisinde FISH tekniği özellikle interfaz-FISH'in etkinliği belirlenmiş ve bugün gerek doğum öncesi tanıda gerekse preimplantasyon genetik tanıda yoğun olarak kullanılmaktadır (12, 18, 22, 25).

Fetal cinsiyet ile en sık gözlenen kromozom sendromlarına yol açan kromozom 21, 13 ve 18'in trizomileri FISH tekniği ile güvenilir şekilde analiz edilmektedir. Ancak kromozom anöploidileri ve mikrodelesyon sendromlarının tanısı dışında fetusda bulunan düzensizliği belirleyebilmek FISH ile mümkün olmamakta, sitogenetik analizin yapılması zorunlu olmaktadır. Yani FISH ve klasik sitogenetik analizlerin birlikte uygulanması gerekmektedir. Çünkü FISH tekniğinde, fetal hücreleri ancak prob olarak kullandığımız DNA bölgesi (leri) açısından değerlendirmek mümkündür. Tüm genomun analizi bugün için bu teknikle olanaklı değildir (5, 6, 8, 12, 18, 22, 25).

İnsan genomunda bulunan kopya artışı ve/veya azalmasının tek bir hibridizasyonla ortaya konmasını olanaklı kılan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) tekniği doğum öncesi tanıda FISH ile karşılaşılan sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Kısa süre içerisinde, özellikle kanser genetiğinde yoğun olarak kullanılmaya başlanan CGH tekniğinin doğum öncesi tanıdaki etkinliği ve güvenilirliğinin değerlendirilmesine ilişkin bilgiler henüz çok yetersizdir. Çeşitli sitogenetik aberasyonların CGH ile tanısı, CGH'in bu aberasyonların ortaya konmasındaki güvenilirliği farklı araştırma grupları tarafından değerlendirilmiş ve rapor edilmiştir (10, 13, 16, 27, 33, 36, 39, 48, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60).

Bu çalışmada 40 fetal örnekte CGH tekniğinin sayısal/yapısal kromozom aberasyonunu saptama etkinliği ile fetal cinsiyet tayinindeki güvenilirliği araştırılmıştır. Klasik sitogenetik analizler ile CGH bulguları karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen veriler bulgular bölümünde verilen sıra ile tartışılacaktır.

5.1. DNA Ekstraksiyonu ve DOP-PCR Arasındaki İlişki

Bulgular bölümünde de ifade edildiği gibi, başarılı CGH bulguları en çok yeterli ve kaliteli DNA ekstraksiyonu DOP-PCR sonrası 300-2000 bp aralığında amplifiye DNA örnekleri ile alınabilmektedir. Voullaire ve ark. (1999) tek bir hücreden elde edilen 6pg DNA'nın CGH analizleri için yeterli olabileceğini DOP-PCR ile genomun multipl kopyasının yapılabileceğini ifade etmiştir. Bu nedenle amniyotik sıvıdan ve trofoblastlardan izole edilen DNA'nın CGH analizleri için uygun olacağı 2-3 ml amniyotik sıvıdan ve 5-10 mg koryon villusundan ekstrakte edilen DNA miktarı CGH için yeterli olmaktadır (60). Ancak elde edilen DNA'nın temiz olması tüm PCR reaksiyonlarında olduğu gibi önemli bir kriterdir (40, 47, 52, 63, 64, 65, 69, 73, 77, 81).

Bizim çalışmamızda test ve kontrol DNA'larının işaretlenmesinde nick translasyon tekniği yerine PCR işaretleme yöntemi tercih edilmiştir. Kallioniemi ve ark. (1994) kromozomların heterokromotik bölgeleri ile akrosentrik kromozomların p kollarına ilişkin profillerde bir deviasyon olduğunu ifade etmişlerdir. Voullaire ve ark. (1999) nick translasyon ve PCR labelling tekniklerini bu tekrarlayan bölgelerdeki profiller açısından karşılaştırdıklarında, DOP-PCR amplifikasyonundan dolayı test ve kontrol DNA'larının her ikisinin de PCR ile işaretlenmesi sayesinde bu problemin kısmen çözümlendiğini, kullanılan DNA örneklerinden herhangi birinin nick translasyon ile işaretlenmesi halinde bu deviasyonların çok daha belirgin hale geldiğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda, DOP-PCR ile DNA işaretleme tekniği kullanılmıştır. Ancak bulgular bölümünde verilen grafiklerden de görüleceği üzere karyotiplerde küçük de olsa deviasyonlar olmaktadır. Bu nedenle CGH'in uygulanabilir hale gelmesi için CGH prosedürünün optimize edilmesi gerekir. Bu düşüncemiz diğer araştırma bulguları ile uygunluk göstermektedir (2, 3, 24, 38, 43, 44, 52, 63, 68, 79, 93).

5.2. Normal Metafaz Plaklarının Morfolojik Özellikleri ve Doğru Denatürasyon Arasındaki İlişki

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) tekniği, diğer moleküler sitogenetik tekniklere göre daha hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Çünkü her metafaz kromozomunda iki florokrom miktarını ölçmeye dayanır. Bulgular bölümünde de ifade edildiği gibi, CGH tekniği daha çok metafaz yaymalarının hibridizasyon özelliklerine dayanır ve bu nedenle CGH tekniğini optimize etmek ve geliştirmek için öncelikle hibridizasyon hedefinin kalitesinin artırılması gerekir. Metafaz kromozomları biyolojik hedeflerdir ve bunların özelliklerini preparat hazırlama sırasında standardize edebilmek son derece zordur. Optimal metafaz yaymalarının tüm kromozomlar boyunca uniform bir hibridizasyon sağlayabilmesi için hedef DNA'nın yeterince denatüre olmasını gerektirir. Ancak bu arada denatürasyon kromozom yapı ve morfolojisine zarar vermemelidir (9, 19, 29, 32, 47, 50, 57, 59, 60, 80, 85, 89, 94).

Bu teknikle yapılan analizlerin başarısında ikinci bir nokta, biyolojik hedefin, yani metafaz preparatlarının sitoplazmik artefaktan temizlenmiş olmasıdır. Bu durum özellikle yanlış-negatif CGH bulgularına yol açar. Örnekteki kopya sayısı artışlarını gözlemleyememek düşük sinyal/anlamsız sinyal oranı ve yüksek standart deviasyondan kaynaklanmaktadır. Bu özellikle de hibridizasyonda partikül sayısını artırır ve aberasyonların görünmesini engeller (28, 29, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63).

Çalışmamızda preparasyon sonrası fiksatif ve %70 asetik asit muamelesi ile kaliteli metafaz preparasyonu sağlanmıştır. Ancak her preparasyon ve denatürasyon sonrası preparatların faz-kontrast mikroskop altında incelenmesi gereklidir (59, 60, 73, 74).

5.3. CGH'in Optimizasyonu

Çalışmamızda CGH tekniğinin optimize edilmesi için normal karyotipe sahip bireylerden elde edilen DNA örneklerinde çalışmalar yapılmıştır. Literatür değerlendirmesinde, optimizasyon için floresan sinyal/anlamsız yüzey sinyalleri oranının >2 olması gerektiği, kromozomlarda uniform hibridizasyonun olması gerektiği ifade edilmiş olup bu kriterlere kendi çalışma materyallerimizde dikkat edilmiştir. Yüksek kalitede 4, düşük kalitede 10 metafaz plağında yapılacak analizlerin, kromozom profillerinin doğruluğunu, %50 standart noktasında (=1.0) yer alıp almamalarına göre ifade edilmiştir. Bu noktalar dikkate alınarak yapılan kontrol çalışmalarımızda diğer araştırmacılar tarafından da benimsenen 0.75-1.25 sinyal hibridizasyon oranı belirlenmiş olup inceleme yapılan tüm preparatlarda bu oran kullanılmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından farklı oran aralıkları (0.50-1.50; 0.85-1.15) kullanılmasına rağmen laboratuvarımız şartları için internal standart olarak 0.75-1.25 oran aralığı tercih edilmiştir (15, 28, 57, 59, 60, 74, 88).

5.4. CGH'in Duyarlılığı

Kallioniemi ve ark. (1992) 10-20 megabaz büyüklüğündeki (400 bant resolüsyonlu karyotipte =1 banda denk gelmektedir) delesyonların CGH ile tanısının konabileceğini, buna karşılık Piper ve ark. (1995) 2-4 megabazın teorik olarak gösterilebileceğini ifade etmişlerdir. Yapılan literatür değerlendirmelerinde; Bryndorf ve ark. (1995) 10 megabazlık, Voullaire ve ark. (1999) 4-5 megabazlık, Kirchhoff ve ark. (2000) ise 3 megabazlık aberasyonların tanısına CGH tekniğinin olanak verdiğini ifade etmişlerdir (16, 27, 29, 55, 56, 58, 59, 60, 73, 89, 94).

Çalışmamızda saptanan iki kromozom anomalili fetusun sitogenetik olarak da doğrulanması CGH'in prenatal tanıda da kullanılabileceğini destekler niteliktedir. Özellikle 35 nolu olguda saptanan anomali için CGH analizinin sağladığı kolaylık dikkat çekicidir. Klasik sitogenetik analizde 18q ter deki ekstra materyalin orjininin kromozom 1q42.11-q44 olduğunun CGH ile ifade edilmesi, marker kromozomların orjinlerinin değerlendirilmesinde mikroskobik olarak saptanamayan ekstra kromozom parçalarının ortaya konmasında CGH'in ne kadar avantajlı olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur ve literatür verileri ile uyum göstermektedir (10, 16, 27, 29, 55, 56, 58, 59, 60, 73, 89, 94).

Bu gün için CGH tekniğinin düşük oranda mozaizizm tanısı ile dengeli translokasyon tanısında yetersiz kaldığı bilinmektedir. İnversiyon, insersiyon gibi diğer yapısal anomalilerdeki durum da inceleme aşamasındadır (27, 55, 56, 58, 59, 60, 73, 89).

5.4. CGH in Uygulama Alanları

CGH uygulamalarının büyük çoğunluğu tümör sitogenetiği alanındadır. Bununla birlikte CGH; amniyotik sıvı hücreleri, CVS yada plösental dokulardan DNA ekstraksiyonu ile trizomi 13, 18, 21 ve monozomi X gibi durumlar ve dengesiz translokasyonlar, standart sitogenetik yöntemlerle tanısı konamayan dengesiz yapısal anomaliler ve supernumara marker kromozomların köken tayini gibi alanlarda da başarıyla uygulanmaktadır (56, 60, 69, 73, 77, 80, 81).

5.5. CGH in Sınırlamaları

CGH için birçok yazarın üzerinde hem fikir olduğu birkaç sınırlama söz konusudur. CGH dengeli yeniden düzenlenmeleri tanımlamada kullanılamaz. Bazı kromozom bölgeleri CGH ile değerlendirilemez. Bunlar arasında kromozomların perisentromerik ve heterokromatik bölgeleri başta gelmektedir. Benzer olarak akrosentrik kromozomların p kolu CGH ile değerlendirilemez: Telomerler gibi bazı kromozom bölgeleri normal kontrollerde bile yanlış floresan oranları verir ve bu nedenle değerlendirme dışı tutulurlar. Teorik olarak CGH in tanımlama alanı 2-4 Mb dır. Fakat pratikte bu alan yaklaşık olarak 5-10 Mb la

sınırlıdır. Metafaz yaymalarındaki kalitenin artırılması ile gelecekte bu durumun üstesinden gelinebilecektir. CGH tekniği, olguda ploidi olduğunu gösterir ancak ploidi derecesini tam olarak veremez. Mozaisizm olduğunda efektif bir metod değildir. DNA kontaminasyonu riski mevcuttur. Oldukça pahalı olan özel görüntüleme ekipmanlarına ihtiyaç duyar (56, 60, 69, 73, 77, 80, 81, 95).



6.SONUÇ

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) tekniğinin prenatal tanı analizlerinde kullanımı, güvenilirliği ve duyarlılığını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada 40 fetal örnekte CGH ve konvansiyonel sitogenetik analizler yapılmış olup her iki yöntemin bulguları birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Prenatal tanıda CGH tekniğinin kullanılabilirliğine ilişkin çalışmamıza başlamadan, sağlıklı, normal kromozom kuruluşuna sahip olduğu bilinen erkek ve kadın örneklerinde yapılan CGH analizleri ile laboratuvarın standartları belirlenmiş olup bu oranlar 0.75 ile 1.25 arasındadır. Yani DNA miktarı 0.75 ile 1.25 arasında olan tüm kromozomlar normal, bu sınırları aşan profiller ise DNA miktarına göre eksilme-artma olarak yorumlanmıştır.

Komperatif genomik hibridizasyon tekniğinin uygulanması sırasında; DNA amplifikasyonu, işaretleme, preparat denatürasyonu, hibridizasyon ve post-hibridizasyon yıkama basamaklarının her birinin kendi bünyesinde önemli olduğu, her aşamada azami dikkatin verilmesi gerektiği gözlenmiştir. Özellikle amplifiye olan DNA miktarı ve DNA fragmentlerinin büyüklükleri ile metafaz denatürasyonunun başarılı bir CGH deneyinde büyük öneme sahip olduğu gözlenmiştir.

Bilindiği üzere, kromozomların hem ökromatik bölgeleri hem de tekrarlayan DNA dizilerinden oluşan bölgeleri bulunmaktadır ve CGH uygulamalarında tekrarlayan bölgelerin analizlerine ilişkin problemlerle karşılaşılmaktadır. Diğer araştırmacıların CGH uygulamalarında, "Nick translation" tekniği ile işaretlenen DNA lar ile yapılan CGH analizlerinde kromozomların telomer ve sentromerlerinde heterojen bir yapı ile karşılaşıldığı ifade edilmiştir. Ancak bu problem, DOP-PCR ile kısmen çözümlenmekte, bu bölgelerin amplifikasyonu ve hibridizasyonu sayesinde bu bölgelerde kısmen homojen bir hibridizasyon sağlanmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda DOP-PCR ve PCR ile işaretleme teknikleri uygulanmıştır.

Çalışmamızda 35 amniyotik sıvı ve 5 adet koryonik villus örneğinde analizler yapılmıştır. İncelenen 40 örnekten iki tanesinde CGH ile sonuca ulaşılamamıştır. Toplam 38 örnekte fetal cinsiyet floresan sinyal fenotipi ve hibridizasyon oranı profillerine göre değerlendirilmiş olup, 22 kız ile 16 erkek fetus tanısı konmuştur. Konvansiyonel sitogenetik analizlerle bu bulgular doğrulanmıştır.

Otozomal kromozomlara ilişkin CGH analizlerinde 38 örnekten 36 sında herhangi bir anomaliye rastlanmamış, tüm otozomlarda hibridizasyon oranları beklenen 0.75-1.25 aralığında, özellikle standart 1.0 bölgesinde yer almıştır. İncelenen olgularda bir tanesinin

hibridizasyonun gerçekleştirildiği metafazlarda 21 numaralı kromozom çiftinde yeşil floresan sinyal fenotipi belirgin bir artış göstermiş, hibridizasyon oran profillerinde de bu kromozom çiftinde 1.25 oranından sağa doğru kayan bir kopya sayısı artışı dikkati çekmiştir. Fetusta 21 numaralı kromozomda amplifikasyon yorumu yapılmış olup bu fetusun konvansiyonel sitogenetik analizlerinde trizomi 21 tanısı konmuştur.

İncelenen örneklerden 35 nolu örnekte de 1 numaralı kromozom çiftinin q42.11>qter bölgesinde belirgin yeşil floresan sinyalinin arttığı, bu kromozom bölgesinin oran profilinde de bu artışın 1.25 bölgesinden sağa doğru kaydığı yani bu bölgede bir amplifikasyonun olduğu sonucuna varılmıştır. Sitogenetik analizlerde fetal karyotipin 18qter bölgesine lokalize 1q42.11>qter parsiyel trizomisi olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, CGH analizinin özellikle marker kromozom identifikasyonu ile sitogenetik analizlerde saptanamayan parsiyel artışların orjinlerinin değerlendirilmesinde etkili olduğunu göstermiştir.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) tekniğinin prenatal tanıdaki duyarlılığının saptanmasında farklı yapısal kromozom aberasyonlarının da değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Literatür incelemelerinde CGH in dengeli translokasyonların tanısında etkili olmadığı (kopya sayısında değişim olmadığından), çok düşük orandaki mozaizmin saptanmasında yetersiz kaldığı bildirilmiş, ancak delesyon ve duplikasyon dışındaki diğer yapısal anomalilerin belirlenmesindeki gücüne ilişkin bir bilgi ile karşılaşılmamıştır.

Yukarıda belirtilenlerin yanı sıra CGH ile saptanabilecek en küçük yapısal anomali büyüklüğü de üzerinde durulması gereken bir durumdur. Bu tekniğin ilk uygulamalarında 10-15 Mb lık anomaliyi saptama yeteneğinde olduğu bildirilirken son yayınlarda bu miktar 3-4 Mb a kadar düşürülebilmektedir. Prenatal tanıda CGH tekniğinden yararlanabilmek için bu büyüklüğün de kesin olarak belirlenmesi gerektiğini savunmaktayız.

Tüm bu bulguların ışığı altında CGH tekniğinin prenatal tanıda uygulanabilmesinin avantajları ile dezavantajları da bulunmaktadır :

Avantajları

1. Hücre kültürü yapılmadan fetal cinsiyet ile total kromozom artış-eksilmelerinin tanısında güvenilirdir. Klasik FISH tekniği ile de bu bilgilere ulaşılabilir, fakat interfaz FISH tekniğinde dahi belirli miktarda hücrenin olması gereklidir. Oysa CGH tekniğinde birkaç hücre ile sonuca ulaşılabilir.

2. Hücre kültürüne gerek olmadığından fetal karyotipin belirlenebilme süresi 3-4 haftadan 4-5 güne indirilmiştir.

3. Marker kromozom, parsiyel kromozom artışlarının orjinlerinin değerlendirilmesinde tek bir hibridizasyon ile sonuca ulaşılabilir. Bu tür aberasyonların tanısında yararlanılabilen diğer bir teknik olan M-FISH yöntemine göre daha ekonomiktir.

4. Yüksek kalitede bantlama ve CGH in aynı anda yapılmasının olanaklı olması hem hız hem de resolüsyon bakımından büyük yarar sağlayacaktır.

Dezavantajları

1. Bilgisayar sistemi ile kullanılması gereken bir tekniktir.

2. Çok aşamalı ve her aşamada optimizasyonun gerektiği bir yöntemdir.

3. Dengeli translokasyonlar ile mozaik yapı tayininde yetersiz kalmaktadır. İnversiyon, halka kromozom gibi diğer yapısal kromozom aberasyonlarındaki durumu hakkında bilgimiz henüz yetersizdir.

4. Saptanabilecek en küçük aberasyon büyüklüğüne ilişkin bilgimiz henüz yetersizdir. Ancak CGH tekniği ile ilgili bilgisayar programlarının geliştirilmesi yoğun olarak devam etmektedir. Gelecekte özel kamera sistemleri ve bilgisayar programları ile CGH in resolüsyonunun arttırılacağına inanıyoruz.

Sonuç olarak, CGH tekniği prenatal tanıda gelecek vaat eden önemli bir tekniktir. Fakat daha çok örnek sayısında analiz ile farklı anomalilerin saptanması ve güvenilirliğinin değerlendirilmesini gerektiren bir yöntemdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adinolfi, M.C.; Fetal nucleated cells in the maternal circulation in “Prenatal Diagnosis and Screening”, (Brock, DJH; Rodeck, CH; Ferguson-Smith,MA, edited) Churchill Livingstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, pp :651-659, 1992.
2. Anderson, M.L.M.; Young, B.D.; Quantitative filter hybridization in “Nucleic Acid Hybridization”; (Hames, B.D.; Higgins, S.J., edited) IRL Press, Oxford-Washington DC; pp : 76-94, 1988.
3. Arrand, J.E., Preparation of nucleic acid probes in “Nucleic Acid Hybridization” (Hames, B.D.; Higgins, S.J., edited) IRL Press, Oxford-Washington DC; pp : 30-42, 1988.
4. Aydınli, K.; Fetal Doku Elde Etme Yöntemleri, “Prenatal Tanı ve Tedavi”, (Aydınli, K. editör) ISBN 975-95654-0-4, İstanbul. sh: 52-65, 1992.
5. Başaran, N.; Tıbbi Genetik, Bilim Teknik Kitabevi, Eskişehir,1994.
6. Başaran, N.; Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon (Başaran, N., ed. Artan, S., Acar, H., Silahtaroglu A.) ETAM, Eskişehir,1996.
7. Başaran, S.; İnsan Kromozomları ve Anomalileri “Prenatal Tanı ve Tedavi”, (Aydınli, K; Editör) ISBN 975-95654-0-4, İstanbul sh:19-23, 1992.
8. Başaran, S.; Prenatal Tanıda sitogenetik yöntemler “Prenatal Tanı ve Tedavi”, (Aydınli, K; Editör) ISBN 975-95654-0-4, İstanbul sh : 24-30, 1992.
9. Becher R, Korn WM, Prescher G. Use of fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization in the cytogenetic analysis of testicular germ cell tumors and uveal melanomas. Cancer Genet Cytogenet Jan;93(1):22-28 1997.
10. Bentz, M., Dohner, H., Werner, C.A., Huck, K., Baudis, M., Joos S., Schlegelberger B., Trumper L.H., Feller A.C.,Pfreundschuh M., et al. Identification of genetic imbalances in malignant lymphoma using comparative genomic hybridization. Stem Cells, 13: 83-87 1995.
11. Besley, G.T.N.; Enzyme analysis in “Prenatal Diagnosis and Screening”, (Brock, D.J.H.; Rodeck, C.H.; Ferguson-Smith,M.A., edited) Churchill

- Livingstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, pp:127-145, 1992.
12. Bhat, B.; McGee, J.O'D.; Chromosomal assignment of genes in "In Situ Hybridization"; (Polak, J.M.; McGee, J.O'D., edited) Oxford Univ.Pr.; Oxford, New York, Tokyo; pp : 157-158, 1990.
 13. Bheen, C.J.; Barton, L.; Carey, A.; Dunldp, A.; Glancy, M.; Hall, K.; Hegarty, A.M.; Khokhar, M.T.; Power, M.; Ryan, K.; Green, A.J.; Stallings R.L. Applications of comparative genomic hybridisation in constituonal chromosome studies. *J.Med.Gen.* 36: 511-517,1999
 14. Boehringer Mannheim, Biochemica Non-radioactive In Situ Hybridization Application manual; 1991.
 15. Bornfleth H., Aldinger K., Hausmann M., Jauch A., Cremer, C. Comparative genomic hybridization imaging by the one-chip true-color CCD camera kappa CF 15 MC. *Cytometry* 24: 1-13, 1996.
 16. Bryndorf, T.; Kirchoff, M.; Rose, H.; Maahr, J.; Gerdes, T.; Karhu, R.; Kallioniemi, A.; Christensen, B.; Lundsteen, C.; Philip, J.; Coomperative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am.J.Hum.Genet.*57:1211-1220, 1995.
 17. Brock, D.J.H.; Alfhafetoprotein and acetylcholinesterase in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, D.J.H.; Rodeck, C.H.; Ferguson-Smith, M.A., edited) Churcill Livngstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, pp : 159-168, 1992.
 18. Buckle, U.J.; Rack, K.A.; Fluorescent in situ hybridization in "Human Genetic Disease Analysis", (Devis, K.E.; Edited) Second Edition; pp : 59-82, 1993.
 19. Cacheux, V.; Tachdjian, G.; Druart, L.; Oury, J.F.; Serero, S.; Blot, P. And Nessmann, C.; Evaluation Of X, Y, 18, And 13/21 Alpha Satellite DNA Probes For Interphase Cytogenetic Analysis Of Uncultured Amniocytes By Fluorescence In Situ Hybridization. *Prenatal Diagnosis*, Vol.14: 79-86 1994.
 20. Chan, V.T.W.; Herrington, C.S.; McGee, J.O'D.; Basic background of moleculer biology in "In Situ Hybridization"; (Polak, J.M.; McGee, J.O'D., edited) Oxford Univ.Pr.; Oxford, New York, Tokyo; pp: 1-14, 1990.

21. Chan, V.T.W.; McGee, J.O'D.; Non-radioactive probes : preparation, characterization, and detection in "In Situ Hybridization"; (Polak, J.M.; McGee, J.O'D., edited) Oxford Univ.Pr.; Oxford, New York, Tokyo; pp : 59-79, 1990.
22. Charrow, J.; Nadler, H.L.; Prenatal Diagnosis in "Principles and Practice of Medical Genetics, Vol II, (Emery A.E.H.; Rimoin, D.L.; edited) Churcill Livingstone-Edinburgh, London, Melburne, New York; pp:1458-1466, 1983.
23. Connor, J.M. ; Ferguson-Smith, M.A.; Essential Medical Genetics. Forth Edition, Four Dragons, Black-Well Scientific Publications 1993.
24. Daniely, M.; Barkai, G.; Goldman, B.; and Aviram-Goldring. Detection of numerical chromosose aberrations by comparative genomic hybridization. Prenatal Diagnosis 19:100-104, 1999.
25. Dill, F.; McGillivray, B.C.; Chromosome Anomalies in "The National Medical Series for Independent Study, GENETICS", (Dill.F.; McGillivray, B.C., Hayden,M.R., Friedman, J.M., ed.) Harwal Publishing Company, Malvern, Pennsylvania; pp.:25-39, 1992.
26. Docker, M.F.; Ultrasound imaging techniques in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, DJH; Rodeck, CH; Ferguson-Smith,MA, edited) Churcill Livngstone-Edinburgh, London, Madrid, Melburne, New York, Tokyo, pp :69-81, 1992.
27. du Manoir, M. R.; Speicher, S.; Joos, E.; Schrock, S.; Popp,H.; Dohner, G.; Kovacs, M.; Robert-Nicoud, Lichter & T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Cremer.Hum Genet 90: 590-610, 1993.
28. du Manoir S, Kallioniemi OP, Lichter P,Piper J, Benedetti PA, Carothers AD, Fantes JA, Garcia-Sagredo JM,Gerdes T, Giollant M, et al. Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19: 4-9, 1995.
29. du Manoir S.; Schrock E.; Bentz M.; Speicher MR.; Joos S.; Ried T.; Lichter P.; Cremer T. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19:27-41, 1995.

30. Emery, H.E.A.; *Amniocentesis, Antenatal Diagnosis of Genetic Disease* Livingstone, Edinburgh and London; pp : 11-39, 1973.
31. Emery, H.E.A.; *Genetics and the physician Elements of Medical Genetics*. Churchill Livingstone/Edinburgh; pp.:251-255, 1983.
32. Feuerstein, B. G. & Mohapatra, G. Molecular cytogenetic quantitation of gains and losses of genetic material from human gliomas. *J Neurooncol* 24: 47-55, 1995.
33. Forozan, F.; Karhu, R.; Kononen, J.; Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends in Genet.* Vol:13 No:10:405-409, oct,1997
34. Fraser, F.C.; Nora, J.J.; *Antenatal diagnosis of genetic disease*; in “Genetics of Man” Lea and Febiger Press; Philadelphi, pp :223, 1975.
35. Friedman, J.M. ; McGillivray, B.; *Clinical Genetics : part I, Prenatal Diagnosis “National Medical Series for Independent study ; GENETICS”*. (Dill.F.; McGillivray, B.C., Hayden,M.R., Friedman, J.M., ed.) Harwal Publishing Company, Malvern, Pennsylvania, pp : 159-166, 1992.
36. Fritz,B.; Greber-Platzer, S.; Frischer, T.; Streubel,B.; Gröblacher,J. Amann,G.; Ventrub, P.; Rehder, H.; Fonatsch,C.; Familial cryptic translocation with del 4q34qter and dup 12pterp13 in sibs with tracheal stenosis: Clinical, classical and molecular cytogenetic studies and CGH analyses from archival placental tissues evidencing tertiary trisomy 4 in one abortion specimen *American Journal of Medical Genetics* Volume: 94, Issue: 4, Date: 2, pp: 271-280, 2000.
37. Galjaard, H.; Sachs, E.S.; Kleijer, W.J.; Niermeijer, M.F.; *Prenatal Diagnosis of Genetic Disease in “Early Diagnosis and Prevention of Genetic Disease”*, (Went, L.Y.; Vermeij-Keers, C.H.R.; Van der Linden, A.G.J.M;. edited) Leiden Univ. Press Leiden; pp : 82-91, 1975.
38. Gray, J. W.; Collins, C.; Henderson, I. C.; Isola, J.; Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P.; Nakamura, H.; Pinkel, D.; Stokke, T.; Tanner, M. Molecular cytogenetics of human breast cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 645-652, 1994.

39. Griffin, D.K.; Sanoudou, D.; Adamski, E.; McGiffert, C.; O'Brien, P.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M.A. Chromosome specific comparative genomic hybridization for determining the origin of intrachromosomal duplications. *J.Med.Genet*, 35:37-41, 1998.
40. Gogusev, J.; Boquet de Joliniere, J.; Telvi, L.; Doussau, M.; du Manoir, S.; Stojkoski, A.; Levardon, M. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. nov; 105(5):444-51, 1999.
41. Gosden, C.; Prenatal diagnosis of chromosome anomalies in "Prenatal Diagnosis and Prognosis" (Lilford, R.J.) Butterworths Publ.Ltd. London, Boston, Singapore, Sydney, Toronto Wellington; pp : 104-158, 1990.
42. Gosden, C.; Cell culture in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, D.J.H.; Rodeck, C.H.; Ferguson-Smith, M.A., edited) Churchill Livingstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, pp : 85-97, 1992.
43. Guan, X-Y.; Fang, Y.; Sham, J.S.T.; Kwong, D.L.W.; Zhang, Y.; Liang, Q.; Li, H.; Zhou, H.; Trent, J.M.; Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer* Volume: 29, Issue: 2, Date: October, pp: 110-116, 2000.
44. Haddad B, Antonacci R, Rizzu P, Lindsay EA, Hughes MR, Smith LC, Knapp RD, Baldini A Mapping segmental imbalances using comparative genomic hybridization and eigenanalysis. *Cytogenet. Cell Genet*. 71: 276-279, 1995.
45. Hayden, M. R.; DNA Diagnosis The National Medical Series for Independent Study, GENETICS. (Dill, F.; McGillivray, B.C., Hayden, M.R., Friedman, J.M., ed.) Harwal Publishing Company, Malvern, Pennsylvania, pp : 69-79, 1992.
46. Henegariu, O.; Bray-Ward, P.; Ward, D.C. Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labelling. *Nature biotechnologie*, vol 18, pp: 345-348, 2000.
47. Henegariu, O.; Heerema, N.A.; Dlouhy, S.R.; Vance and Vogt, P.H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23:504-511, 1997

48. Hermesen, A.; Meijer, G. A.; Baak, J. P. ; Joenje, H. & Walboomers, J. J. Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Hum Pathol* 27:342-349 ,1996.
49. Hook, E.B.; Prevalence, risk and recurrence in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, D.J.H.; Rodeck, C.H.; Ferguson-Smith, M.A., edited) Churchill Livingstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, pp : 351-392, 1992.
50. Hoopman, A.H.N.; Interphase cytogenetics of solid tumours in "In Situ Hybridization"; (Polak, J.M.; McGee, J.O'D., edited)Oxford Univ.Pr.; Oxford, New York, Tokyo; pp : 165-186, 1990.
51. Houldsworth C. & R. S. Chaganti. Comparative genomic hybridization: an overview[comment]. *Am JPathol* 145: 1253-1260, 1994.
52. Huang, Q.; Schantz, S.P.; Rao, P.H. Mo, J.; McCormick, S.A.; Chaganti, R.S.K. Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors *Genes, Chromosomes and Cancer*. Volume: 28, Issue: 4, Pages: 395-403, 2000.
53. Isola J.; DeVries S.; Chu L.; Ghazvini S.; Waldman F.; Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am. J. Pathol.* 145: 1301-1308 1994.
54. James,L.&Varley,J. ; Preparation, labelling and detection of DNAfrom archival tissue sections suitable for comparative genomic hybridization. *ChromosomeRes* 4: 163-164, 1996.
55. Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J. W.; Waldman F.; & Pinkel, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-21, 1992.
56. Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J. W.; Waldman F.; & Pinkel, D. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4: 41-6, 1993 .

57. Kallioniemi, O-P.; Kallioniemi, A.; Piper, J.; Isola, J.; Waldman, F.M.; Gray, J. W. & Pinkel, D.; Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes ChromosomCancer* 10: 231-243, 1994.
58. Kallioniemi, O-P.; Kallioniemi, A.; Piper,J.; Tanner, M.; Stokke, T.; Chen, L.; Smith, H.S.; Pinkel, D.; Gray, J.W.; Waldman,F.M. ; Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comperative genomic hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.vol.91* pp:2156-2160, 1994.
59. Karhu R, Kahkonen M, Kuukasjarvi T, Pennanen S, Tirkkonen M, Kallioniemi O.; Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry* 1;28(3):198-205, 1997.
60. Karhu, R. Improved methodology and potential clinical applications of comparative genomic hybridization; PhD thesis, University of Tampere, Finland, 1998.
61. Kırdar, B.; Kalıtsal Hastalıklarda DNA Analizi ile Prenatal Tanı; PCR uygulamaları "Prenatal Tanı ve Tedavi", (Aydınlı, K., editör) ISBN 975-95654-0-4, sh : 31-39, 1992.
62. Kirchoff M.; Rose, H.; Maahr, J.; Gerdes, T.; Bugge, M.; Tommerup, N.; Tümer,Z.; Lespinasse, J.; Jensen, P.K.A.; Wirth, J.; Lundsteen, C. ; High resolution comperative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal apparently balanced conventional karyotypes. *Eur. Jou. Of Hum. Gen.* 8, 661-668, 2000.
63. Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola.; Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *J Genes Chromosomes Cancer* ,18(2):94-101, 1997.
64. Liang, B. C.; Meltzer, P. S.; Guan, X. Y. &J. M.; Gene amplification elucidated by combined chromosomal microdissection and comparative genomic hybridization. *Trent Cancer Genet Cytogenet* 80: 55-59, 1995.
65. Lichter P., Fischer K., Joos S., Fink T., Baudis M., Potkul R.K., Ohl S., Solinastoldo S., Weber R., Stilgenbauer S., Bentz M., Dohner H. ; Efficacy Of Current Molecular Cytogenetic protocols For The Diagnosis Of

- Chromosome-Aberrations In Tumor specimens. Cytokines and Molekular Therapy;2(3):163-169, 1996.
66. Lundsteen, C.; Maahr, J.; Christensen, B.; Bryndorf, T.; Bentz, M.; Lichter, P.; Gerdes, T.; ;Image analysis in comparative genomic hybridization. Cytometry 19:42-50, 1995.
 67. MacLachan, N.A.; Amniocentesis in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, D.J.H; Rodeck, C.H.; Ferguson-Smith, M.A., edited) Churchill Livingstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo-, pp : 13-23, 1992.
 68. Matsumura, M. Detection of DNA amplifications and deletions in oral squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization (CGH) Ko. Gazasshi 62: 513-531, 1995.
 69. Matsuta C. & Nishiya, I. Comparative genomic hybridization (CGH) Hum. Cell 6: 231-6, 1993.
 70. Miny, P.; Horst, J.; Holzgreve, W.; Koryon Villusları ile Prenatal Tanı "Prenatal Tanı ve Tedavi", (Aydınlı, K.;) ISBN 975-95654-0-4, İstanbul . Sh : 90-99, 1992.
 71. Nicolaides, H.K.; Ermifl, H. Kordosentez "Prenatal Tanı ve Tedavi" (Aydınlı, K., editör) ISBN: 975-95654-0-4, sh : 66-67, 1992.
 72. Nicolini, U.; Rodeck C.H.; Fetal Blood and Tissue Sampling in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, DJH; Rodeck, CH; Ferguson-Smith, MA, edited) Churchill Livingstone-Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo, pp : 39-51, 1992.
 73. Özcan, T.; Burki, N.; Parkash, V.; Huang, X.; Pejovic, T.; Mahoney, M.J.; Ward, D.C. ; Cytogenetical Diagnosis in paraffin-embedded fetoplenental tissue using comperative genomic hybridization. Prenatal diagnosis; 20:41-44, 2000.
 74. Piper, J.; Rutovitz, D.; Sudar, D.; Kallioniemi, A.; Kallioniemi, OP.; Waldman, FM.; Gray, JW.; Pinkel, D.; Computer image analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 19: 10-26, 1995.

75. Ried, T.; Cytogenetics Methods. Genome technology branch, national human genome research institute/NIH, sep.,1997.
76. Rooney, D. E. ; Czepulkowski, B. H. ; Chromosome Abnormalities, P. D. and tissue culture, Human Cyotgenetics, A practical Approach, Volume I, Constitutional Analysis Second Edition, Oxford University Press, pp : 11-15 / 55-89, 1992.
77. Sakamoto, M.; Sakamoto, H.; Suehiro, Y.; Akiya, T.; Iwabuchi, H.; Sakunaga, H.; Muroya, T.; Noda, T.; Sugishita, T.; Tenjin, Y.; CGH (comparative genomichybridization) Nip. Rin. 54: 933-943, 1996.
78. Silverman, N.S.; Wapner, R.J.; Chorionic villus sampling in "Prenatal Diagnosis and Screening", (Brock, D.J.H.; Rodeck, C.H.; Ferguson-Smith,M.A., edited) Churcill Livngstone-Edinburgh, London, Madrid, Melburne, New York, Tokyo., pp : 25-38, 1992.
79. Speicher,M.R.; du Manoir, S; Schrock, E.; Holtgreve-Grez, H.; Schoell, B. Lengauer, C.; Cremer,T. & Ried, T. ; Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. Hum Mol Genet 2:1907-14 1993.
80. Storkel, R. Simon, C. Brinkschmidt, J. Gronwald & W.Bocker ; Comparative genomic hybridization in pathology.A new molecular cytogenetic method [Komparative genomischeHybridisierung in der Pathologie. Eine neue molekular zytogenetische Methode.]. Pathologie 17: 189-194, 1996.
81. Suehiro, Y.; Umayahara, K.; Ogata, H.; Numa, F.; Yamashita, Y.; Oga, A.; Morioka, H.; Ito, T.; Kato, H.; Sasaki, K.; Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with endometrioid carcinoma. Genes, Chromosomes and Cancer Volume: 29, Issue: 1, Pages: 75-82, 2000.
82. Şentürk, L.; Hekim, N.; Prenatal Tanıda Noninvaziv Yöntemler "Prenatal Tanı ve Tedavi", (Aydınlı K.; editör) ISBN 975-95654-0-4, İstanbul sh.: 40-51, 1992.
83. Telenius, H.; Carter, N.P.; Bebb, C.E.; Nordenskiöld, M.; Ponder, B.A.J.; Tunnacliffe, A. ; Degenerate oligonucleotide-primed PCR:General

- amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13, pp:718-725, 1992.
84. Terzic, M.; Plecas, D.V.; Stimec, B.V.; Petkovic, S.V.; Risk Estimation of Intraamniotic Infection Development after Serial Amniocentesis. *Fetal Diagnosis and Therapy*, Jan-Feb, 1994.
 85. Testa, JR.; Liu, Z.; Feder, M.; Bell, DW.; Balsara, B.; Cheng, JQ.; Taguchi, O.; Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*;95(1):20-32, 1997.
 86. Thompson, M.W.; McInnes, R.R.; Willard, H.F.; C, *Genetics in Medicine*. W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. ISBN 0-7216-3113-4 5th Edition, 1991.
 87. Thompson, T. & Gray, J. W. Cytogenetic profiling using fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). *J Cell Biochem Suppl* 17G: 139-43, 1993 .
 88. Tirkkonen, M.; Karhu, R.; Kallioniemi, O.; Isola, J.; Evaluation of camera requirements for comparative genomic hybridization. *Cytometry* 25: 394-398 1996.
 89. Verma, R.S.; Babu, A. *Human Chromosomes, Principles and Techniques*, second edition, McGraw-Hill, Inc., 1996.
 90. Voullaire, L.; Wilton, L.; Slater, H.; Williamson, R. ; Detection of aneuploidy in single cell using comparative genomic hybridization. *Prenatal Diagnosis*, 19:846-851, 1999.
 91. Weatherall, D.J.; *Practical Applications 1: The Prevention of Genetic Disease; The New Genetics and Clinical Practice*; Oxford Un.Press, Second edition, pp : 113-145, 1985.
 92. Weaver, D.D.; *Introduction Catalog of Prenatally Diagnosed Conditions*, The J.Hopkins Uni.Pr. Baltimore and London; second edition, 1992
 93. Wells, D.; Sherlock, J.K.; Handyside, A.A.H.; Delhanty, J.D.A. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization. *Nucleic acid research* 27, No:4, pp: 1214-1218, 1999.

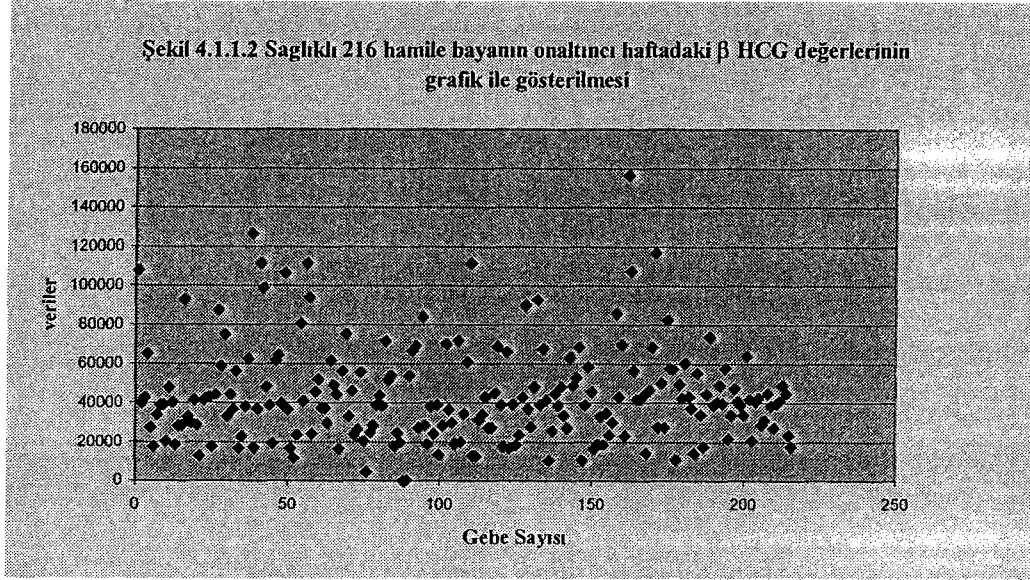
94. Wilkens, L.; Brecht, M.; Flemming, P.; Klempnauer, J.; Kreipe, H.H. Differentiation of multicentric origin from intra-organ metastatic spread of hepatocellular carcinomas by comparative genomic hybridisation. *The Journal of Pathology*, Volume: 192, Issue: 1, Pages: 43-51, 2000.
95. W.W.W. ich.ucl.ac.uk/cmgs/cgh98html. Comparative genomic hybridisation : Principle, promise pitfalls. 1998.
96. Zunino, A.; Viaggi, S.; Ottagio, L.; Fronza, G.; Schenone, A.; Roncella, S.; Abbondandolo, A.; Chromosomal aberrations evaluated by CGH, FISH and GTG banding in a case of AIDS-related Burkitt's Lymphoma. *Haematologica*, , 85:250-255, 2000.



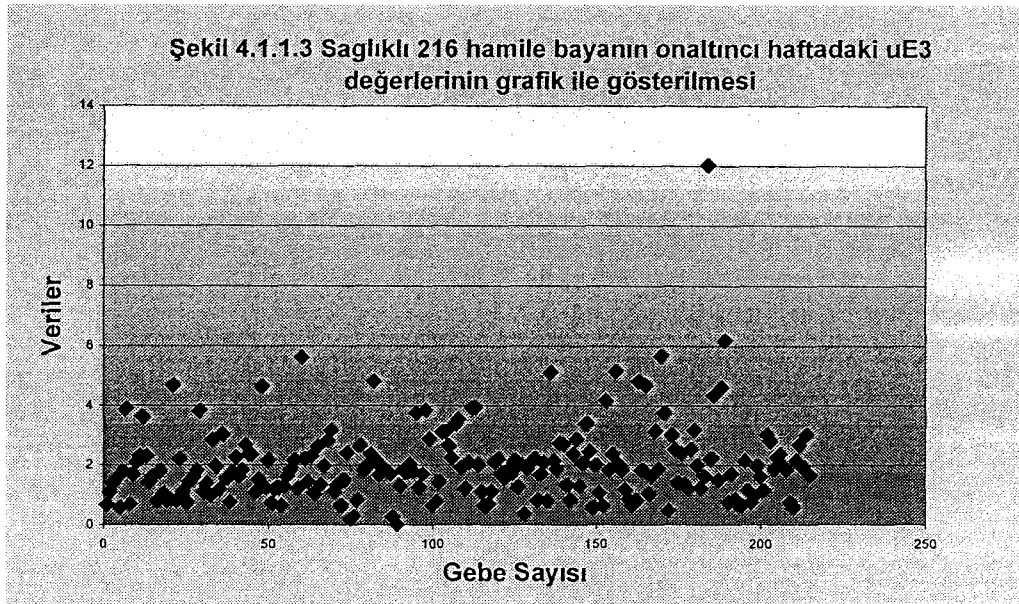
ÖZGEÇMİŞ

T.C. vatandaşı olan Yavuz Hakan ÖZÖN 1968 yılında Karamürsel’de doğdu. İlk öğrenimini Karamürsel’de Orta öğrenimini İzmit’te tamamladı. 1985 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1991 yılında mezun oldu. 1993 yılında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 1994 yılında Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 1996 yılında “Kültüre edilmemiş amniyositlerde cinsiyet ve anöploidi tayini” başlıklı tezini tamamlayarak Bilim Uzmanı ünvanını aldı. Aynı yıl Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Doktora öğrenimine başladı. Halen Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMENTASYON MERKEZİ

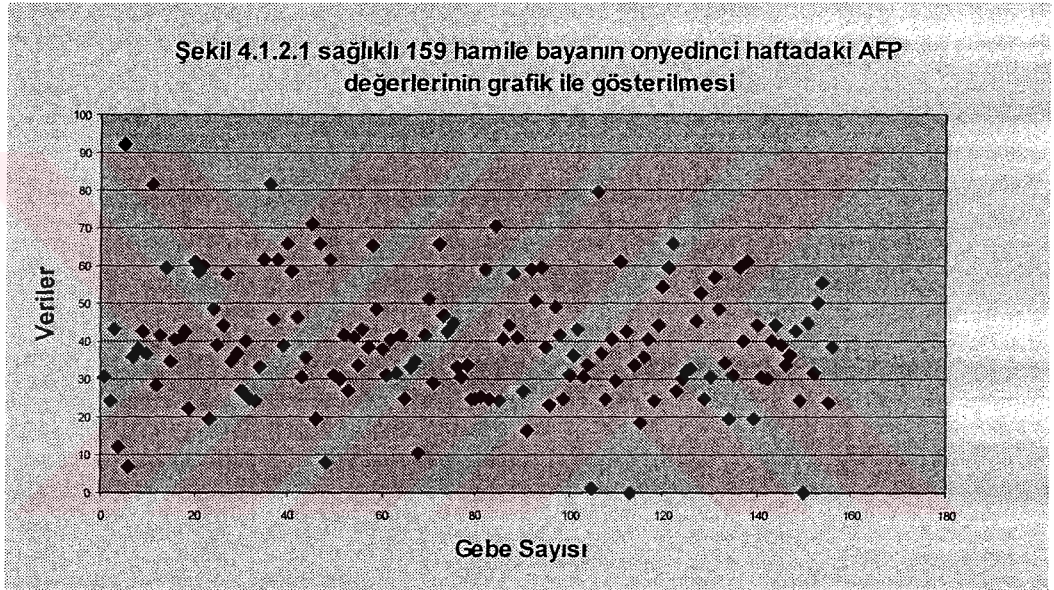


Onaltıncı hafta için uE3 MoM'u 1,95 ng/ml bulundu. uE3 için en yüksek değer 3,95 ng/ml, en düşük değer ise 0,27 ng/ml idi. Değerlerin 1,2 ile 2,2 ng/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait 16. haftadaki uE3 değerleri Şekil 4.1.1.3 de verilmiştir.

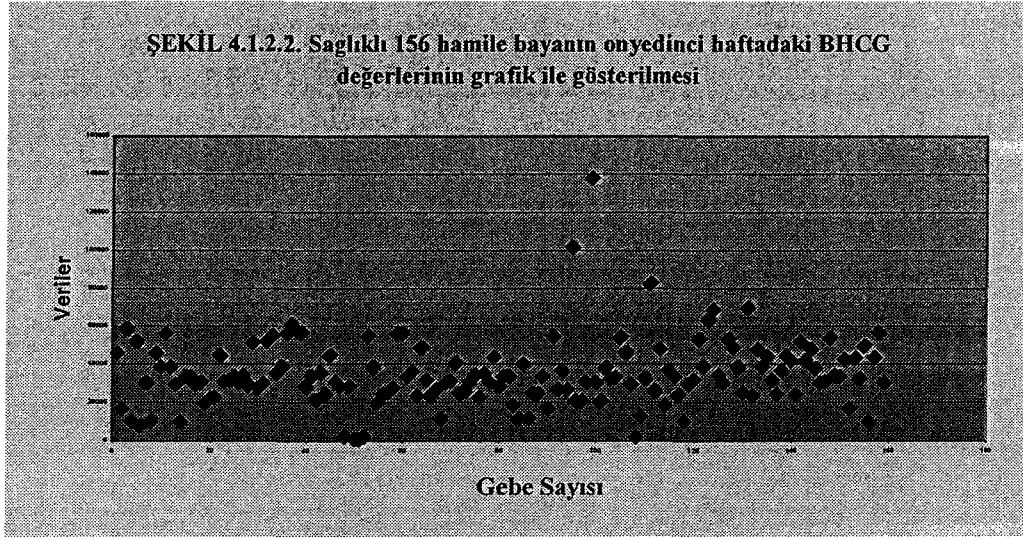


4.1.2. Onyedinci Hafta

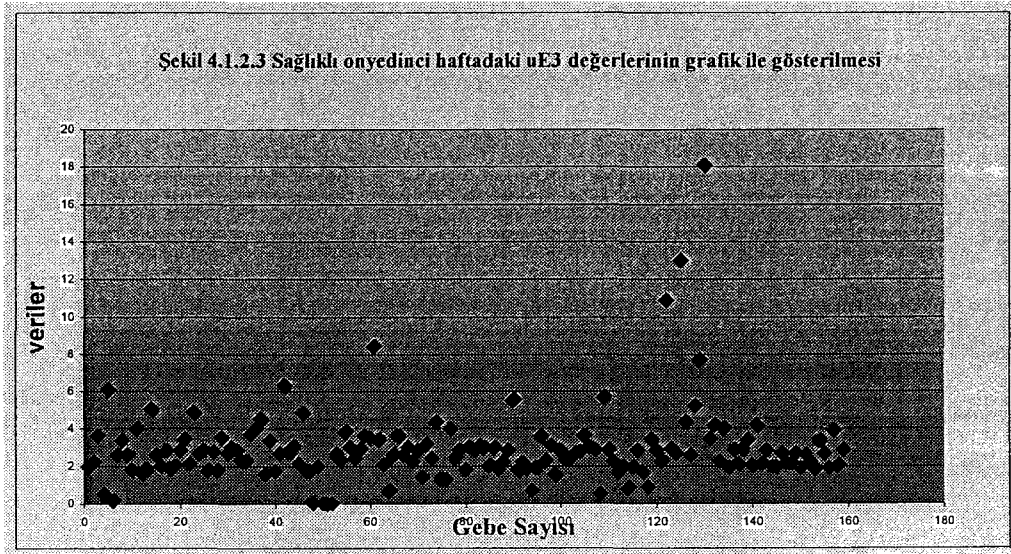
Onyedinci hafta için 159 sağlıklı hamile bayan değerlendirmeye alındı. Bu bireyler için AFP MoM'u 39,6 IU/ml bulundu. AFP için en yüksek değer 70,8 IU/ml, en düşük değer ise 6,9 IU/ml idi. Değerlerin 25-45 IU/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait onyedinci haftadaki AFP değerleri Şekil 4.1.2.1 de verilmiştir.



Onyedinci hafta için β hCG MoM 36893.0 mIU/ml bulundu. 17. hafta. β hCG için en yüksek değer 82641 mIU/ml, en düşük değer ise 11718 mIU/ml idi. Değerlerin 20000 ile 40000 mIU/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait onyedinci haftadaki β hCG verileri Şekil 4.1.2.2.gösterildi.



Onyedinci. hafta uE3 MoM'u 2,75 ng/ml bulundu. uE3 için en yüksek değer 5,55 ng/ml , en düşük değer ise 0,83 ng/ml idi. Değerlerin 2 ile 4 ng/ ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait onyedinci haftadaki uE3 değerleri Şekil 4.1.2.3 de verilmiştir.



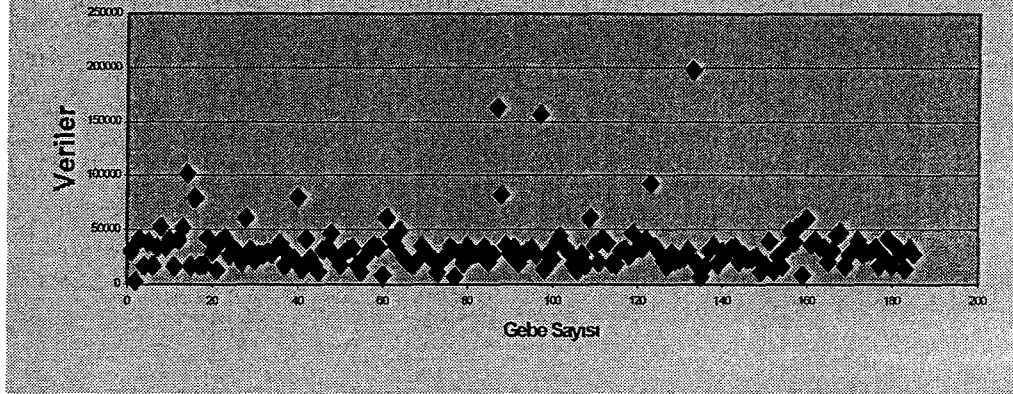
4.1.3 Onsekizinci Hafta

Onsekizinci haftada için değerlendirmeye 185 sağlıklı hamile alındı. Bu bireylerin AFP MoM'u 45,2 IU/ml bulundu. Değerlendirmeye alınan hamile bayanlarda AFP için en düşük değer 15,6; en yüksek değer 100 IU/ml idi. Değerlerin ağırlıklı olarak 30 ile 50 IU/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait onaltıncı haftadaki AFP değerleri Şekil 4.1.3.1 de verilmiştir.



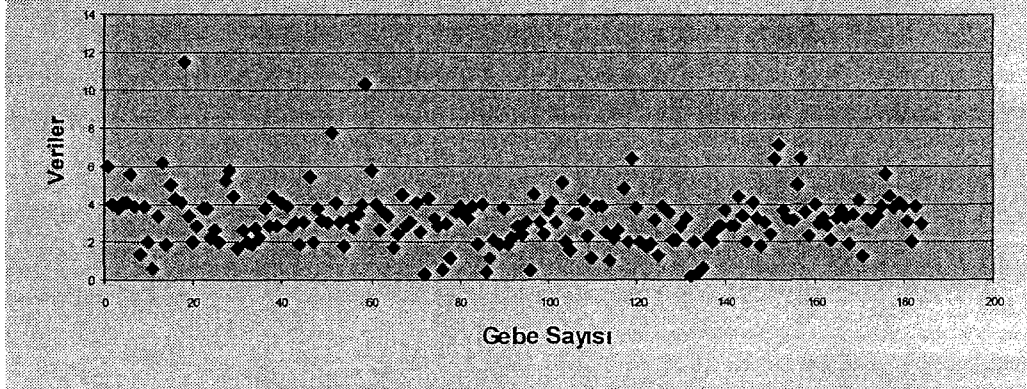
Onsekizinci hafta için β hCG MoM' u 30483,2 mIU/ml bulundu. β hCG için en yüksek değer 197426,7 IU/ ml ve en düşük değer 11690 IU/ ml idi. Değerlerin 25000 mIU/ml ile 45000 IU/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait onsekizinci haftadaki β hCG değerleri Şekil 4.1.3.2 de verilmiştir.

Şekil 4.1.3.2. Sağlıklı 185 hamile bayanın onsekizinci haftadaki BHCG değerlerinin grafik ile gösterilmesi



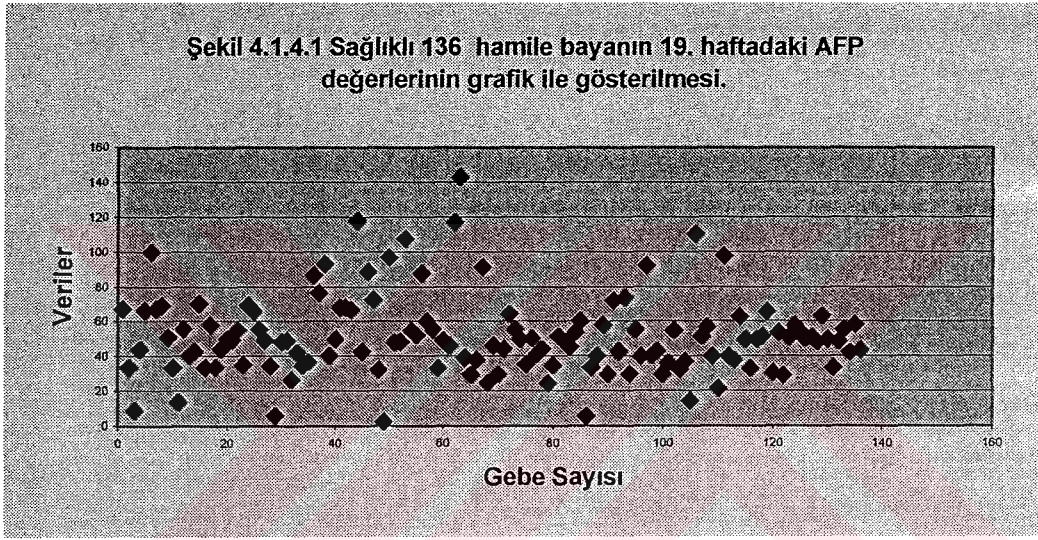
Onsekizinci hafta için uE3 MoM'u 3,18 ng/ ml bulundu uE3 için en yüksek değer 5,55 ng/ ml ,en düşük değer 0,83 ng/ ml idi. Değerler 2,3-4,3 ng/ ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait onsekizinci. haftadaki uE3 değerleri Şekil 4.1.3.3 de verilmiştir.

Şekil 4.1.3.3. Sağlıklı 185 hamile bayanın onsekizinci haftadaki UE3 değerlerinin grafik ile gösterilmesi

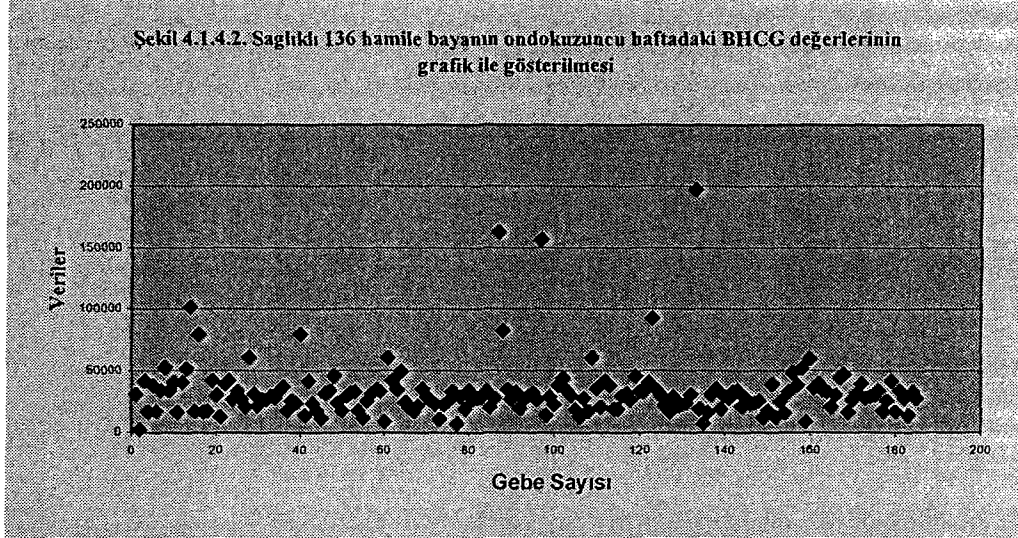


4.1.4. Ondokuzuncu Hafta

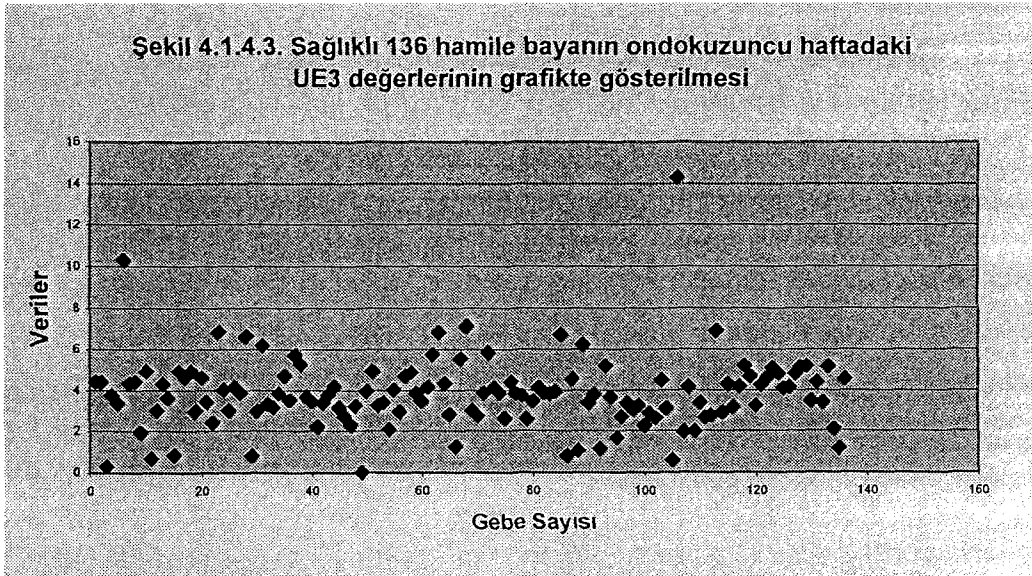
Ondokuzuncu hafta için 136 sağlıklı hamile bayan değerlendirmeye alındı. Bu bireyler için AFP MoM'u 50,0 IU/ ml bulundu. AFP için en yüksek değer 116,7 IU/ ml, en düşük değer 6,00 IU/ ml idi. Değerlerin 40 ile 60 IU/ ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait 19. haftadaki AFP değerleri Şekil 4.1.4.1 de verilmiştir.



Ondokuzuncu hafta için β hCG MoM'u 26718,0 mIU /ml bulundu. β hCG için en yüksek değer 69990 mIU /ml ,en düşük değer 11235,0 mIU/ml idi. Değerlerin 15000 ile 35000 IU/ ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait ondokuzuncu. haftadaki β hCG değerleri Şekil 4.1.4.2 de verilmiştir.

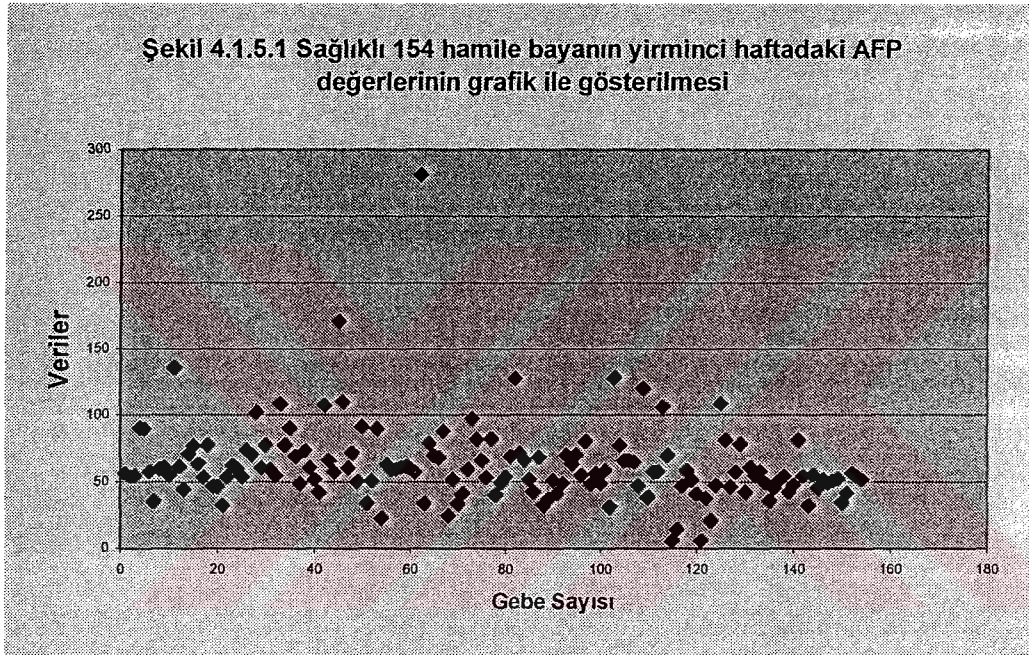


Ondokuzuncu hafta için uE3 MoM'u 3,78 bulundu. uE3 için en yüksek değer 6,72 ng/ ml , en düşük değer ise 0,88 ng/ ml idi. Değerlerin 2,5 ile 4,5 ng/ ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait ondokuzuncu haftadaki uE3 değerleri Şekil 4.1.4.3 de verilmiştir.

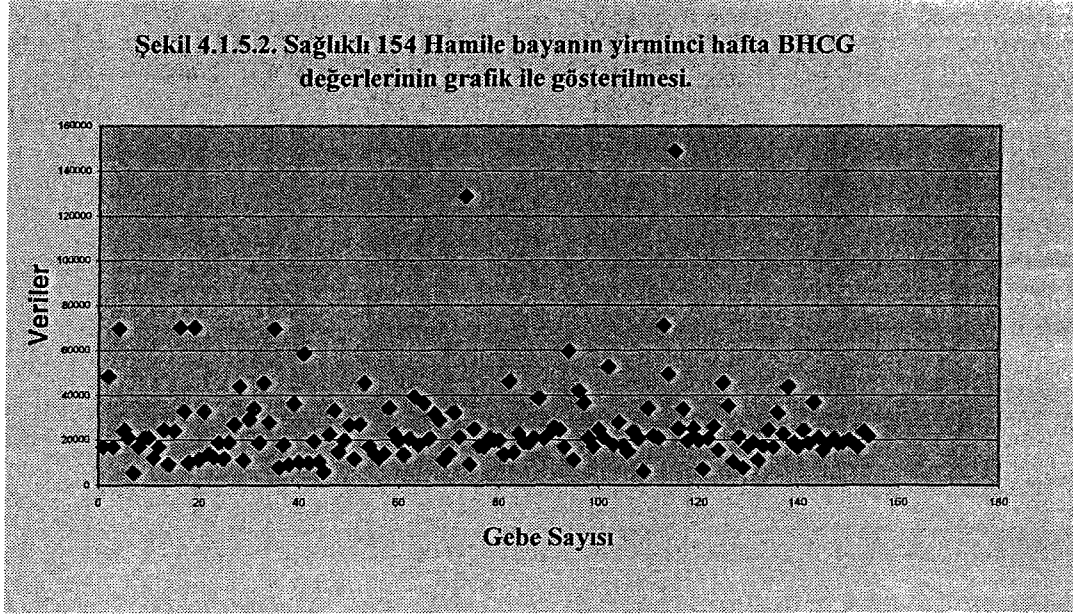


4.1.5 Yirminci Hafta

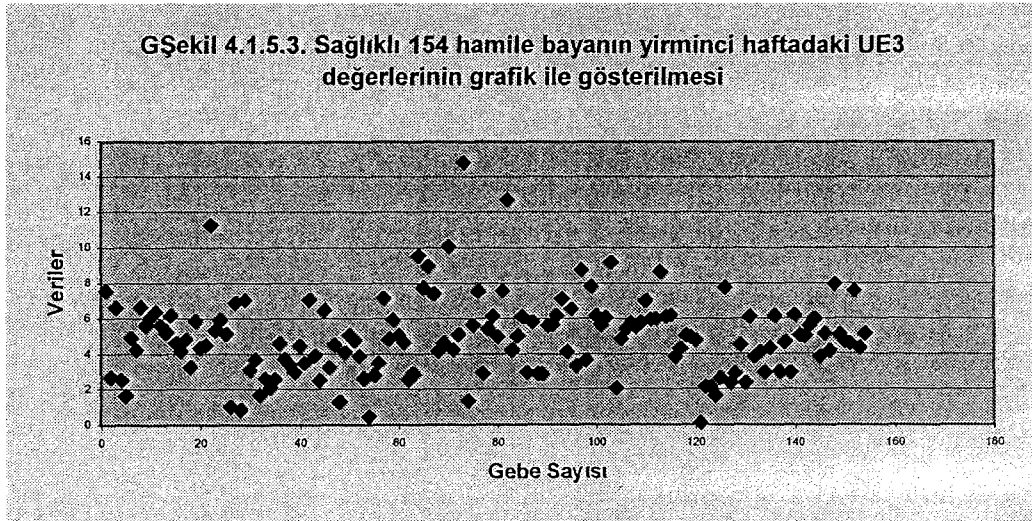
Yirminci hafta için 154 sağlıklı hamile bayan değerlendirmeye alındı. Bu bireyler için AFP MoM'u 57,6 IU/ml bulundu. AFP için en yüksek değer 128,8 IU/ml ve en düşük değer ise 21,3 IU/ml idi. Değerlerin 45-65 IU/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait 20. haftadaki AFP değerleri Şekil 4.1.5.1 de verilmiştir.



Yirminci hafta için β hCG MoM'u 22867 mIU/ml bulundu. B hCG için en yüksek değer 59621,5 mIU/ml ve en düşük değer ise 9922,2 mIU/ml idi. Değerlerin 10000 ile 30000 mIU/ml arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait 20. haftadaki β hCG değerleri Şekil 4.1.5.2. de verilmiştir.



Yirminci hafta için uE3 MoM'u 4,68 IU/ ml bulundu. uE3 için en yüksek değer 9,54 mIU/ ml ve en düşük değer ise 1,31 IU/ ml idi. Değerlerin 3,5-6,5 arasında yoğunlaştığı tespit edildi. Tüm bireylere ait 20 haftadaki uE3 değerleri Şekil 4.1.5.3. de verilmiştir.



4.2.Kilo

Kilo düzeyi yüksek olan hamile bayanlarla normal kilolu hamile bayanlar karşılaştırıldı. Tablo 4.2.1-5 de görüldüğü gibi tüm haftalarda her üç değer de kilolu hamilelerde düşmektedir. Bu düşüş 17. haftada AFP ve uE3, 19.ve 20. haftada uE3 için istatistiksel olarak anlamlı orana ulaşmaktadır

Tablo 4.2.1. Onaltıncı hafta için kilo düzeyi yüksek bayanlarla normal kilolu bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması :

Boy-kilo	N	Ortalama± standart sapma	İstatistiki sonuç
AFP kilolu	13	27,4385±8,66	Fark yok
normal	187	33,4365±11,49	
BHCG kilolu	8	39548,11±13853,68	Fark yok
normal	162	44202,68±15623,33	
uE3 kilolu	11	1,8282±0,84	Fark yok
normal	164	1,9587±0,73	

Tablo 4.2.2. Onyedinci hafta için kilo düzeyi yüksek bayanlarla normal kilolu bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması :

Boy-kilo	N	ortalama± standart sapma	İstatistiki sonuç
AFP kilolu	11	31,0545±13,4656	P<0,05 t=-2,35
normal	135	40,4689±12,7173	
BHCG kilolu	9	33772,64±13187,27	Fark yok
normal	131	37229,19±12182,73	
uE3 kilolu	10	2,1010±0,5753	P<0,05 t= -2,43
normal	132	2,7977±0,8897	

Tablo 4.2.3 Onsekizinci hafta için kilo düzeyi yüksek bayanlarla normal kilolu bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Boy- kilo	N	ortalama± Standart sapma	İstatistiki sonuç
AFP kilolu	13	41,2692±16,7964	Fark yok
normal	151	45,5430±12,2119	
BHCG kilolu	16	31222,48±12675,64	Fark yok
normal	146	30385,96±9449,38	
uE3 kilolu	17	3,3965±1,3857	Fark yok
normal	152	3,1502±1,0204	

Tablo 4.2.4 Ondokuzuncu hafta için kilo düzeyi yüksek bayanlarla normal kilolu bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Boy- kilo	N	ortalama± standart sapma	İstatistiki sonuç
AFP kilolu	15	44,1533±9,6373	Fark yok
normal	109	50,8061±16,2904	
BHCG kilolu	14	22347,33±8999,00	Fark yok
normal	112	27264,48±11014,61	
uE3 kilolu	13	2,9892±0,8921	P<0,05 t= -2,89
normal	109	3,8687±1,0520	

4.2.5. Yirminci hafta için kilo düzeyi yüksek bayanlarla normal kilolu bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Boy- kilo	N	ortalama± Standart sapma	İstatistiki sonuç
AFP kilolu	17	57,0412±17,0463	Fark yok
normal	123	57,7024±15,5251	
BHCG kilolu	17	23259,52±12087,18	Fark yok
normal	122	22583,44±9204,02	
uE3 kilolu	16	3,5175±1,3682	P<0,01 t=-3,64
normal	115	4,8376±1,3565	

4.3. Sigara

Sigara kullanan hamileler ile sigara kullanmayan hamileler karşılaştırıldı. Sigara içenlerde tüm haftalarda AFP değerinde hafif artış, β hCG ve uE3 değerlerinde ise düşüklük gözlemlendi. uE3 deki düşüklük 18 haftada istatistiksel olarak anlamlı orana ulaşmakta idi. Sonuçlar tablo 4.3.1-5 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1 Onaltıncı hafta için sigara içen bayanlarla sigara içmeyen bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sigara	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP normal	199	33,5675±15,7069	Fark yok
Sigara(+)	10	37,6000±15,3459	
β HCG normal	200	44465,57±24212,22	Fark yok
Sigara(+)	10	25401,31±15035,23	
uE3 normal	200	2,0248±1,28	Fark yok
Sigara(+)	10	1,6770±1,40	

Tablo 4.3.2 Onyedinci hafta için sigara içen bayanlarla sigara içmeyen bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sigara	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP normal	150	38,99±16,1	Fark yok
Sigara(+)	7	45,47±20,2	
βHCG normal	152	35413,18±17574,7	Fark yok
Sigara(+)	7	26864,31±15066,8	
uE3 normal	152	2,97±1,05	Fark yok
Sigara(+)	7	1,77±0,82	

Tablo 4.3.3. Onsekizinci hafta için sigara içen bayanlarla sigara içmeyen bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sigara	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP normal	178	48,3±19,5	Fark yok
Sigara(+)	7	39,2±25±1	
BHCG normal	178	32202,41±2120,89	Fark yok
Sigara(+)	7	54079,72±5407,72	
uE3 normal	177	3,28±1,52	P<0,05 t=1,19
Sigara(+)	7	2,13±1,13	

Tablo 4.3.4 Ondokuzuncu hafta için sigara içen bayanlarla sigara içmeyen bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sigara	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP normal	147	60,4±23,1	Fark yok
Sigara(+)	6	74,1±33,9	
BHCG normal	147	25821,58±19062,1	Fark yok
Sigara(+)	6	20024,82±11268,7	
uE3 normal	147	4,99±2,19	Fark yok
Sigara(+)	7	3,89±2,36	

Tablo 4.3.5 Yirminci hafta için sigara içen bayanlarla sigara içmeyen bayanların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Sigara	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP normal	131	51,5±22,7	Fark yok
Sigara(+)	6	49,6±24,6	
βHCG normal	130	29112,8±15878,3	Fark yok
Sigara(+)	6	20618,8±11488,6	
uE3 normal	131	3,88±1,73	Fark yok
Sigara(+)	6	2,72±1,89	

4.4.Ultrason – Son Adet Tarihi Karşılaştırılması

Hamile bayanların gebelik haftaları ultrason sonuçları ve son adet tarihine göre belirlendi. Bu iki grup arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Tablo 4.4.1-5’de görüldüğü üzere özellikle AFP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar oluşmuştur .

Tablo 4.4.1. Onaltıncı hafta için gebelik haftasının ultrasonla veya son adet tarihine göre belirlenenler arasındaki farkın değerlendirilmesi

US./SAT	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP SAT	143	31,3±10,7	P<0,01 t=3,43
US	57	37,3±11,9	
BHCG SAT	123	43299,6±15196,6	Fark yok
US	47	45773,7±16434,4	
uE3 SAT	123	1,88±0,67	Fark yok
US	52	2,10±0,86	

Tablo 4.4.2 Onyedinci hafta için gebelik haftasının ultrasonla veya son adet tarihine göre belirlenenler arasındaki farkın değerlendirilmesi

US./SAT	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP SAT	111	38,4±12,2	P<0,05 t=2,31
US	35	44,1±14,3	
BHCG SAT	103	35725,4±11250,5	Fark yok
US	37	40574,6±14177,1	
uE3 SAT	111	2,66±0,78	Fark yok
US	31	3,04±1,15	

Tablo 4.4.3. Onsekizinci hafta için gebelik haftasının ultrasonla veya son adet tarihine göre belirlenenler arasındaki farkın değerlendirilmesi

US./SAT	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP SAT	120	43,9±11,6	P<0,05 t=2,02
US	44	48,7±14,5	
BHCG SAT	122	29541,6±8701,6	Fark yok
US	40	33295,7±12174,9	
uE3 SAT	127	3,14±1,07	Fark yok
US	42	3,27±1,03	

Tablo 4.4.4. Ondokuncu hafta için gebelik haftasının ultrasonla veya son adet tarihine göre belirlenenler arasındaki farkın değerlendirilmesi

US./SAT	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP SAT	99	48,8±13,9	Fark yok
US	25	54,7±21,2	
BHCG SAT	99	26279,7±10000,6	Fark yok
US	27	28325,6±13753,3	
uE3 SAT	97	3,84±1,03	Fark yok
US	25	3,51±1,16	

Tablo 4.4.5. Yirminci hafta için gebelik haftasının ultrasonla veya son adet tarihine göre belirlenenler arasındaki farkın değerlendirilmesi

US./SAT	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP SAT	96	54,8±15,1	Z<0,05 t=3,22
US	44	63,7±15,0	
BHCG SAT	96	22845,0±8980,5	Fark yok
US	43	22266,7±10826,7	
uE3 SAT	90	4,87±1,33	Z<0,05 t=2,42
US	41	4,23±1,52	

4.5.Akraba Evliliği

Ülkemizde akraba evliliklerinin oranı yüksektir. Bu nedenle özellikle otozomal resesif hastalıkların görülme oranı artmaktadır. Akrabalığın üçlü test değerlendirmelerinde bir farklılığa sebep olup olmadığını anlamak için yapılan değerlendirmede akrabalık durumunun üçlü test üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.(Tablo 4.5.1-5)

Tablo 4.5.1 Onaltıncı hafta için akraba evliliğinin değerlendirilmesi

Akraba	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP Akraba (-)	55	34,3±12,7	Fark yok
Akraba (+)	34	38,0±11,5	
BHCG Akraba (-)	44	45403,3±18365,6	Fark yok
Akraba (+)	30	46018,6±16408,7	
uE3 Akraba (-)	49	1,79±0,58	Fark yok
Akraba (+)	31	2,13±0,88	

Tablo 4.5.2 Onyedinci hafta için akraba evliliğinin değerlendirilmesi

Akraba	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP Akraba (-)	79	40,2±12,7	Fark yok
Akraba (+)	36	34,1±9,32	
BHCG Akraba (-)	73	35833,6±12401,2	Fark yok
Akraba (+)	35	34781,8±8206,1	
uE3 Akraba (-)	79	2,72±0,81	Fark yok
Akraba (+)	37	2,59±0,77	

Tablo 4.5.3.Onsekizinci hafta için akraba evliliğinin değerlendirilmesi

Akraba	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP Akraba (-)	101	43,7±12,6	Fark yok
Akraba (+)	30	45,7±10,6	
BHCG Akraba (-)	97	29935,7±9004,4	Fark yok
Akraba (+)	35	29871,8±9259,4	
uE3 Akraba (-)	104	3,17±1,13	Fark yok
Akraba (+)	34	3,08±0,94	

Tablo 4.5.4.Ondokuzuncu hafta için akraba evliliğinin değerlendirilmesi

Akraba	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP Akraba (-)	79	49,2±13,4	Fark yok
Akraba (+)	22	47,5±15,5	
BHCG Akraba (-)	79	26814,3±90700,8	Fark yok
Akraba (+)	22	25083,5±11134,7	
uE3 Akraba (-)	78	3,81±0,94	Fark yok
Akraba (+)	20	3,89±1,36	

Tablo 4.5.5 Yirminci hafta için akraba evliliğinin değerlendirilmesi

Akraba	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatistiki sonuç
AFP Akraba (-)	63	55,9±13,7	Fark yok
Akraba (+)	36	53,8±17,7	
BHCG Akraba (-)	65	22453,0±9160,7	Fark yok
Akraba (+)	34	23086,1±8490,4	
uE3 Akraba (-)	62	4,85±1,44	Fark yok
Akraba (+)	30	4,87±1,11	

4.6.Hamilelik Sayısı

Hamilelik sayısının (nullipar ve multipar) 16., 17., 18., 19. ve 20. haftalarda üçlü testte kullanılan hormonal değerler üzerine olan muhtemel etkileri değerlendirildiğinde (Tablo 4.6.1-5) nullipar ve multipar hamileliğin üç analit üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edildi. Bu hormonlardan β hCG değerlerinde her hafta için hafif bir yükselme tesbit edildi. Ancak bu değer de istatistiksel olarak önemli değildi.

Tablo 4.6.1 Onaltıncı hafta

	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatiksel sonuç
AFP Nullipar	25	28,8±7,9	Fark yok
Multipar	133	32,3±11,7	
BHCG Nullipar	24	46759,1±11880,9	Fark yok
Multipar	113	43532,1±16495,6	
uE3 Nullipar	20	1,93±0,84	Fark yok
Multipar	117	1,91±0,72	

Tablo 4.6.2. Onyedinci hafta

	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatiksel sonuç
AFP Nullipar	28	39,6±10,9	Fark yok
Multipar	86	37,9±12,5	
BHCG Nullipar	26	38114,2±10607,4	Fark yok
Multipar	81	34700,8±11363,5	
uE3 Nullipar	28	2,64±0,73	Fark yok
Multipar	87	2,68±0,85	

Tablo 4.6.3. Onsekizinci hafta

	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatiksel sonuç
AFP Nullipar	19	48,0±10,6	Fark yok
Multipar	109	43,0±11,9	
BHCG Nullipar	20	29622,6±8446,6	Fark yok
Multipar	111	29999,6±9210,4	
uE3 Nullipar	21	2,91±0,93	Fark yok
Multipar	115	3,18±1,11	

Tablo 4.6.4. Ondokuzuncu hafta

	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatiksel sonuç
AFP Nullipar	23	48,2±15,6	Fark yok
Multipar	82	48,9±13,2	
BHCG Nullipar	23	29466,1±8528,1	Fark yok
Multipar	85	25747,6±10971,3	
uE3 Nullipar	24	3,90±0,81	Fark yok
Multipar	79	3,79±1,11	

Tablo 4.6.5 Yirminci hafta

	N	Ortalama± Standart Sapma	İstatiksel sonuç
AFP Nullipar	18	54,8±16,5	Fark yok
Multipar	90	56,0±15,3	
BHCG Nullipar	16	23075,7±8406,7	Fark yok
Multipar	92	22732,6±9203,4	
uE3 Nullipar	16	4,77±1,20	Fark yok
Multipar	83	4,81±1,44	

4.7. Diğer Sonuçlar

Çalışma grubumuzu oluşturan hamile bayanlar içinde doğum sonuçlarında göre 3 adet ikiz gebelik mevcuttu. Bunların MoM değerleri sırasıyla AFP 3,71 – 1,94–1,09 ; β hCG 1,18–5,67-0,82 ; uE3 2,89–3,16 – 1,90 idi. Bu veriler normal değerlerin üzerinde gibi gözükmele birlikte veri sayısının az olması nedeniyle kesin bir yoruma gidilemedi.

Yaptığımız araştırmada 1 adet özefagus atrezili bebek doğdu. Bu hastanın maternal serum MoM değerleri AFP için 3.03, β hCG için 1.68, uE3 için ise 3,17 idi . Her üç değer de ortalamanın bir hayli üzerindeydi.

Üç adet nöral tüp defektlerine uyan hamile bulundu. Bunlardan birincisinin 16. haftada üçlü test sonucu mevcuttu ve ultrason ile de meningoel tanısı konmuştu. 16. hafta MoM değerleri şu şekilde idi. AFP 1,78 MoM, β HCG 1,84 MoM, uE3 0,33 MoM idi. İkinci hastamız bize 18. haftada müracaat etmişti. Üçlü test sonuçları AFP 2,36 MoM, β hCG 1,04 MoM, uE3 0,96 MoM idi ve AFP MoM değeri 2 MoM'un üzerinde olduğundan nöral tüp defekti açısından risk grubunda idi. İsteğimiz üzerine yapılan

detaylı ultrason sonucu anensefali tanısı aldı. Medikal abort ile gebeliği sonuçlandırıldı. Üçüncü hamilemiz 19 haftada bize başvurdu. Dışarda yapılan ultrasonda NTD şüphesi ile fakültemize sevk edilmişti. Yapılan üçlü test sonucunda AFP 2,21 MoM, β hCG 0,76 MoM, uE3 3,78 MoM tespit edildi. AFP 2 MoM un üzerinde olması ve fakültemizde yapılan ayrıntılı ultrason sonucu tanı kesinleştirildi..

Hamile bayanlar içinde 2 trimesterden sonra düşük yaptığını tespit ettiğimiz 5 bayanın verileri ise aşağıdaki tabloda gösterildi.

hasta	Başvuru haftası	AFP MoM	BHCG MoM	UE3 MoM
1	17	3,06	1,24	0,98
2	17	0,2	0,2	0,1
3	17	0,4	0,73	0,24
4	18	0,89	1,47	0,95
5	20	1,84	3,12	1,84

Tablodan da görüldüğü gibi düşük yapan hamilelerde ortalamalardan aşırı artış ve azalışlar dikkat çekmektedir. Bu değerlerdeki aşırı oynamaların düşüğe neden olan herhangi bir yapısal veya kromozomal anomaliye bağlı olabileceği düşünüldü.

İki adet multipl anomalili bebek dünyaya geldi . Bunların bize başvuru haftaları 18 ve 20 gebelik haftalarında idi. Üçlü test sonuçları ise AFP 0,98 – 1,15; β hCG 1,44 – 1,09 ; uE3 1,27 – 1,21 idi . Bu verilerde ortalamalardan sapmalar gözlenmemiştir.

Üçlü test sonucu pozitif olan hastalarımızdan amniosentez yapılan bir hastamızda 47,XY,+21 karyotipi tespit edildi. Hastaya verilen genetik danışma sonucunda medikal abortu onaylayan hastanın gebeliği sonlandırıldı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada Konya bölgesindeki hamilelerde gebelik haftalarına göre üçlü test için median değerlerini oluşturmak amaçlanmıştır. Bunun için ikinci trimester seçildi. Çünkü, daha önce yapılan çalışmalarda (Wald ve ark 1992; Macri ve ark 1993; Wald ve ark 1996) üçlü testin 16-20 ve ideal olarak 16-18. haftalarda yapılması tavsiye edilmiş, buna neden olarak da her üç parametrenin (AFP, β hCG ve uE3) normal populasyonla, riskli grup arasındaki dağılımları ve belirleyicilik değerlerinin bu trimesterde en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir. Bu dönemin hastanın psikolojisi ve tıbbi müdahaleler yönünden de önemli olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından (Aydınlı 1992; Muller ve Bussieres1996; Polamaki ve ark 1997) vurgulanmıştır. İngiltere’de yapılan çalışmalarda maternal serum AFP düzeyinin özellikle NTD taramalarındaki etkinliğinin 15. haftanın altında ve 20. haftanın üzerinde anlamlı bir şekilde düştüğü saptanmıştır (Wald ve ark 1992 , Wald ve ark 1996).

5.1. MoM Değerleri

Sunulan çalışmada ilk parametre olan AFP için oluşturulan MoM değerleri 16., 17., 18., 19. ve 20. haftalarda sırasıyla; 33.1, 39.6, 45.2, 50.0 ve 57.6 IU/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değerler Elias ve Simpson (1992) , Wald ve ark. (1992) , Benn ve ark. (1997)’nın bildirdikleri gibi her hafta % 10’luk bir artış göstermiştir.

İkinci parametre olan β hCG değerleri ölçüm yapılan 16-20. haftalarda sırasıyla; 43998.6, 36893.0, 30483.2, 26718.0 ve 22867.0 mIU/ml olarak belirlenmiş ve bu değerler Elias (1992) , Wald ve ark. (1992) , Benn ve ark. (1997)’nin kaydettikleri gibi her hafta nispi bir azalma göstermiştir

Çalışmada kullanılan üçüncü parametre olan uE3 değerleri 16-20. haftalarda sırasıyla; 1.95, 2.75, 3.18, 3.78 ve 4.68 ng/ml olarak bulundu. Bu sonuçların Elias ve Simpson (1992) , Wald ve ark (1992) , Benn ve ark (1997) ve Erk (1996)'in değerlendirmeleriyle paralellik gösterdiği görüldü.

5.1.1. Kilonun MoM Değerleri ile İlişkisi

Bu çalışmada 16-20. haftalarda kriter olarak kullanılan AFP, β hCG ve uE3 değerleri kilolu ve normal kilolu bireylerde ayrı ayrı değerlendirilmiş ve tespit edilen değerler tablo 4.2.1-5'de verilmiştir. Tablolarda da görüldüğü gibi tüm haftalarda kilolu hamilelerde AFP değerleri Wald ve ark. (1992) ile Bartels ve ark. (1993)'nın da bildirdikleri gibi sayısal olarak normal kilolulardan daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ancak 16, 18, 19 ve 20. haftalarda kilolu ve normal kilolu hamileler arasında AFP değerleri bakımından istatistiksel olarak bir farklılık belirlenemezken; 17. haftada önemli bir farklılık belirlenmiştir. ($P<0.05$)

β hCG bakımından araştırma süresince ortalama değerler incelendiğinde, kilolu gebelerin 20. hafta hariç diğer tüm haftalarda normal kilolulara göre daha düşük β hCG düzeyine sahip olduğu görülmüştür. Ancak değerlerdeki sayısal farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) bulunmuştur. Bogard ve ark. (1991) da β hCG düzeyleri bakımından kilolu ve normal kilolu bireyler arasında sayısal farklılıkların olduğunu ve bu farklılıkların bu çalışmada da belirlendiği gibi istatistiki olarak farklılık göstermediğini bildirmektedir.

uE3 bakımından 16. ve 18. haftalarda kilolu ve normal kilolu bireylerin değerleri arasında istatistiksel bir farklılık belirlenemezken; ölçüm yapılan 17, ve 19.

haftalarda $P<0.05$ düzeyinde ve 20. haftada $P<0.01$ düzeyinde bir farklılık saptanmıştır.

Wenstrom ve ark. (1995) ve Watt ve Wald (1998), annenin vücut ağırlığı arttıkça bedendeki plazma miktarının da arttığını, buna bağlı olarak dilüsyon etkisinin ortaya çıktığını ve kullanılan analitlerin düzeyinde düştüğünü ifade etmişlerdir. Çalışmamızda da kilolu gebelerin 16-20. haftalardaki üçlü test değerlerinin normal kilolulara göre düşüş göstermesinin aynı mekanizma ile izah edilebileceği düşünülmüştür.

Tüm hamilelerde üçlü test sonucuna göre risk değerinin 1/250 ye yakın olduğu tarama testi negatif veya pozitif çıkan hastalarda, kilonun test değerlerinde oynamalara sebebiyet verebileceği anlaşıldıktan sonra, kilo düzeyi yüksek bayanlara uygulanmak üzere kilo düzeltme formülü geliştirilmiş, fakat yapılan araştırmalarla kilo düzeltme formülü uygulaması sonrasında yakalanan Down sendromlu gebelik sayısında herhangi bir farklılığın oluşmadığı anlaşılmıştır (Wenstrom ve ark 1995, Watt ve Wald 1998). Ancak mevcut çalışma sonucunda da belirlendiği gibi çok yüksek kilolu bayanlarda dilüsyon faktörü artacağından değerlerdeki düşüş de kaçınılmaz olacaktır. Sınırdan bir pozitiflik veya negatiflik durumunda kilolu hamile bayana bu konuda bilgi sahibi bir uzman tarafından ayrıntılı olarak bilgi verilmesi, gerektiğinde ileri tetkikler için hastanın uyarılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

5.1.2. Sigaranın MoM Değerleri ile İlişkisi

Sigara kullanma alışkanlığının üçlü test sonuçlarına etkilerini ortaya koyan farklı sonuçlar bildirildiğinden çalışmamızda 16-20. haftalarda AFP, β hCG ve uE3 değerleri sigara kullanan ve kullanmayan gebelerde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Elde edilen

değerler Tablo 4.3.1-5’de gösterilmiştir. Tablolardan da görüleceği gibi, tüm haftalarda sigara kullanan ve kullanmayan hamilelerin AFP değerleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenememiştir. Ancak sigara kullanan gebelerde kullanmayanlara göre, AFP değerleri bakımından Bartels ve ark. (1993) ile Polamaki ve ark. (1993)’nın da belirttikleri gibi hafif bir yükseklik göze çarpmaktadır.

Onaltı ile 20. haftalarda β hCG bakımından ortalamalar incelendiğinde, sigara kullanan gebelerde saptanan değerlerin kullanmayanlara göre sayısal olarak daha düşük, ancak farklılıkların tüm haftalarda istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, Bernstein ve ark. (1989) ile Bremme ve ark. (1990) değerleri ile paralellik göstermektedir.

Değerlendirmeye alınan gebelerdeki uE3 değerleri incelendiğinde 18. haftada sigara kullananlar lehine bir azalma ($P<0.05$) olduğu anlaşılmıştır. Diğer haftalardaki değerlerin sigara kullananlarda yaklaşık %10’luk bir düşüş gösterdiği saptanmış, ancak istatistiksel bir farklılık belirlenememiştir. Bu bulgulara göre sigara kullanan gebelerin uE3 düzeylerinde bir düşüklüğün meydana geldiğinden söz edilebilir. Ancak Polamaki ve ark (1993) sigara içenlerdeki uE3 düzeylerindeki düşüşün ancak %3 seviyelerinde kaldığını belirtmişlerdir. Bulgular arasındaki bu farklılığın kullanım dozundan kaynaklanmış olabileceği sigaranın istatistiksel oranlara ulaşılmasa bile üçlü test sonuçlarını etkileyebileceği, bu nedenle sigara içen bayanları ayrı değerlendirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

5.1.3.Akrabalık Durumunun MoM değeri ile ilişkisi

Ülkemizde akraba evliliklerinin oranı yüksektir. Konya bölgesinde yapılan bir çalışmada bu oran % 24 olarak bulunmuştur (Demirel ve ark 1997). Bu nedenle otozomal resesif hastalıkların ortaya çıkma riski artmaktadır. Sunulan bu çalışmada

akrabalığın üçlü test değerlendirmesinde bir farklılığa neden olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Akrabalık durumunun üçlü test üzerine etkisinin sonuçları tablo 4.5.1-5' te gösterilmiştir. Elde edilen bulgular karşılaştırıldığında akrabalığın üçlü test sonuçlarını etkilemediği anlaşılmaktadır. ($P>0.05$)

5.1.4.Ultrason ve Son Adet Tarihine Göre MoM Değeri Oluşturmanın Önemi

Bazı çalışmalarda (Wald ve ark 1992, Benn ve ark 1997) anne serum düzeylerinin 2. trimesterde her hafta için AFP ve uE3'de % 10 artış, β hCG'de % 10 azalış gösterdiği, bu nedenle gebelik haftasının yanlış tayininin oluşturulan MoM değerleri doğrultusunda farklı sonuçların ortaya çıkmasına yol açtığı ifade edilmiştir. Bu durum hastalara uygulanacak ileri tetkiklere yönlendirme konusunda hatalı bilgiler verilmesine yol açmaktadır. Bu nedenle son adet tarihi kesin belli olanlar ve ultrason sonucuna göre gebelik haftası belirlenen gebelerin üçlü test değerleri karşılaştırıldı. Veriler tablo 4.4.1-5' te gösterildi. Bulgularımıza göre son adet tarihi esas alınarak gebelik haftası tayin edilen bireylerle gebelik haftası ultrasonla belirlenen gebelerin AFP değerleri arasında 16-17-18-20. Haftada istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu (sırasıyla $P<0.01$, $P<0.05$ $P<0.05$, $Z<0.05$), uE3 düzeyinin ise 20. haftada ($Z<0.05$) farklılık gösterdiği tespit edildi. Diğer verilerde ise istatistiksel yönden herhangi bir özellik saptanmadı. Ancak, veriler arasında istatistiksel yönden önemsiz bulunmasına rağmen MoM değerlerini etkileyebilecek farklılıklar görülmüştür.

Bu durumun hamilelerin son adet tarihini doğru hatırlayamamalarından veya ultrasonda gebelik haftasının tam ve güvenilir olarak belirlenememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere hamile bayanın gebelik haftasının doğru tayin edilmesi son derece önemlidir. Ultrason ve son adet

tarihinin birlikte değerlendirilip gestasyonel yaşı doğru tahmin edilmesinin üçlü testin güvenilirliğini arttıracak ve ileri tetkiklerin oranını azaltacak düşünülmemektedir.

5.1.5 Nullipar ve Multipar Hamilelerde MoM Değerinin Karşılaştırılması

Spencer (1995), Wald ve Watt (1996) nullipar hamileliklerde β hCG seviyelerinin multiparlara göre yüksek olduğunu göstermişlerdir. Barkai ve ark. (1996) ise β hCG' nin iki grup arasında bir fark göstermediğini, nulliparlarda AFP'nin %5, uE3'ün %3 oranında düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle mevcut çalışmada nullipar ve multipar hamilelerde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı. Tablo 4.6.1-5 'te görüldüğü gibi elde edilen bulgular arasında istatistiksel bir fark saptanamadı ($P>0.05$). Ancak nulliparlarda β hCG değerlerinde 18. hafta hariç hafif bir yükselme gözlemlendi. Bulgular Spencer (1995), Wald ve Watt (1996) verileriyle uyum gösterirken, Barkai ve ark. (1996)' nın sonuçlarından farklıydı. Barkai ve ark β hCG seviyelerinin hiç etkilenmediğini belirtirken araştırmamızda her hafta için bu değerlerde nulliparlarda istatistiksel oranlara ulaşmasa bile hafif bir artış görülmektedir. Ancak yapılan tüm çalışmalarda nullipar ve multipar ayrımının üçlü test üzerinde bir etkisinin olmadığı ifade edilebilir. Burada dikkat edilmesi gereken, ilk hamileliklerde risk yükselmiş ve bunun da β hCG' den ileri geldiği tespit ediliyorsa bu durumun nullipariteden kaynaklanabileceğinin göz önünde tutulması gereğidir.

5.1.6. İkiz Gebeliklerin MoM Değerleriyle İlişkisi

Bogart ve ark. (1991), Wald ve ark. (1994) ikiz gebeliklerde AFP, β hCG ve uE3 değerlerinin normalin üstünde bulunduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da saptanan 3 adet ikiz gebelikte elde edilen MoM değerleri normalin yaklaşık 2 kat

üzerinde bulunmuştur. Ancak veri sayısının az olması nedeniyle kesin bir yorum yapılamamıştır.

5.2.Diğer Sonuçlar

İkinci trimesterde üçlü test serum değerlerinin erken doğum, preeklamsi ve fetal gelişme geriliği olan çocuklarda (Kabukçu ve ark 1996) ve fetal aneuploidilerde yüksek olabileceği (Thiagarajah ve ark 1995) öne sürülmektedir. Benn ve ark (1995) yaptıkları bir araştırmada, üçlü testte normal değerlerden farklılıklar gösteren hamilelerin, prenatal kromozom analizi sonucunda % 3.69 oranında kromozom anomalisi tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte açıklanamayan ikinci trimester uE3 düşüklüklerinde gebelik kaybı riskinin arttığı kaydedilmektedir (Santolaya ve ark 1996). Diğer bir araştırmada (Morssink ve ark. 1996) ise plasental mosaizm tanısı konulmuş normal hamileliklerde, tarama testi pozitif olan olguların oranı % 54 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda takibi yapılan ve doğum sonuçlarına göre yanlış (+) oranımız %6,08 idi. Bu değer literatürde belirtilen oran (%4,5-%8) arasında idi. (Cuckle ve ark 1994, Carroll 1994) Ancak veri sayımız yükseldikçe ve tecrübemiz arttıkça yanlış + oranların minimuma inmesi beklenmektedir. Olgularımız arasında 2 adet doğumdan hemen sonra ölen bebek mevcuttu. Bunların üçlü test sonuçlarında herhangi bir farklılık saptanamamıştır. Doğum sonucunda 1 adet özefagus atrezili bebekte her üç değer de ortalamanın çok üstünde MoM değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda doğum sonucuna kadar takip ettiğimiz bayanlardan 5 tanesinin 2 trimesterden sonra düşük yaptığı ve bunlardan 1.hastada AFP nin 3,06 MoM değerinde 2. ve 3. hastada normalin altında MoM değerlerinde 4. hastada normal MoM değerlerinde olduğu ve 5 hastanın ise yüksek β hCG değerlerine sahip olduğu

belirlenmiştir. Buradaki farklı bulguların düşüğe sebep olacak herhangi bir kromozomal yada yapısal anomaliden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Yukarıda ifade edilen araştırmalar ve mevcut çalışmadan elde edilen veriler çeşitli hastalık ve anomalilerde üçlü test değerlerinde farklılıklar meydana gelebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, üçlü test sonuçlarında risk düşük olsa bile, kullanılan analitlerde göze çarpan farklılıklar olduğunda, bu farklılığın değişik bir hastalıktan kaynaklanabileceği düşünülerek bu durum literatür ışığı altında gözden geçirilmeli ve hamile bayanların daha sık kontrollere gelmesi önerilmelidir.

5.3.Sonuç

Günümüzde genetik hastalıkların kesin prenatal tanısı invaziv yöntemlerle yapılmaktadır. Bu girişimler mortalite ve morbiditeyi artırmaktadır. Aynı zamanda bu yöntemlerin yaygın olarak kullanılamaması nedeniyle invaziv olmayan üçlü tarama testine olan ihtiyaç artmıştır. Bu test sayesinde geniş toplulukları tarama olanakları ortaya çıkmış konjenital malformasyon, genetik hastalıklar ve bazı anomaliler açısından risk taşıyan gebelerin belirlenmesi kolaylaşmıştır. Üçlü test çeşitli faktörlere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Bu faktörlerin içinde en önemlisi laboratuvar ve yöntem farklılıklarıdır. Bugün dünyada üçlü test için değişik laboratuvarlarca üretilen çok çeşitli kitler kullanılmaktadır. Farklı teknik ve yöntem uygulamaları doğal olarak ölçümleri yapılan popülasyonlara ait median değerlerini de farklı kılmaktadır. Aynı kiti kullanan laboratuvarlar arasındaki uygulama farklılıkları bile median değerlerde değişimlere neden olmaktadır. Bütün bu özellikler nedeni ile her laboratuvarın kendi şartlarında, içinde bulunduğu popülasyona ait median değerlerini oluşturması gerekmektedir.

Ayrıca mevcut çalışma sonucunda üçlü tarama testi değerlendirilmelerinde: a) uygulamanın gebeliğin 16-20. ideal olarak 16-18. Haftalarında gerçekleştirilmesi b) serum örnekleri alındıktan sonra gestasyonel yaştan son adet tarihi ve ultrason eşliğinde doğru tespit edilmesi c) gebe kadınların sigara içip içmediğinin belirlenmesi d) kilolu olup olmadığının tespit edilmesi e) insüline bağlı diyabetinin bulunup bulunmadığının araştırılması f) daha önce anomalili bebek sahibi olup olmadığının sorgulanması g) herhangi bir farklılıkta değişik hastalıkların da olabileceği düşüncesinin dikkate alınması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Üçlü test taramalarında hastaların hesaplanan Down sendromu riski 1/250 den yüksekse testin doğruluğu tekrar gözden geçirilmeli ve hamile bayanlar amniosenteze yönlendirilmelidir. İzole NTD yönünden risk yüksekse ultrasonografiyle, herhangi bir kromozomal anomaliye bağlı NTD düşünülüyorsa amniosentez ile kesin tanı konulmaya çalışılmalıdır. Yukarıda ifade edilen uygulamalar sonucunda herhangi bir anomali saptanırsa hastalık hamile bayana ayrıntılı bir şekilde anlatılmalı, karşılaşılabileceği durumlar ve yapabilecekleri hakkında hasta bilgilendirilmelidir.

Sonuçta, üçlü testin kolay ve ucuz olması, tüm toplumlarda NTD ve Down sendromu taramasında önemli bir gösterge olması, ayrıca defektlerin saptanması ve gebeliğin devamı hakkında fikir verebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılması gereken noninvaziv bir test olduğu kanısına varılmıştır.

6. ÖZET

S.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ / KONYA- 2000

Mahmut Selman YILDIRIM

PRENATAL TANIDA ÜÇLÜ TESTİN ÖNEMİ VE HAFTALARA GÖRE MoM DEĞERLERİ

Bu araştırmada Konya ilinde 16-20. gebelik haftalarındaki hamilelerde üçlü tarama testi için bir ortalama median değeri (MoM-multiple of median) belirleyip, Down Sendromu ve Nöral Tüp Defektlerinin prenatal olarak tanınmasına yardımcı olmak amacıyla planlandı.

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim dalı bünyesinde Mayıs 1997 – Aralık 1999 tarihleri arasında yürütülen bu çalışmaya, fakültemize ve Konya merkez sağlık ocaklarına başvuran toplam 925 hamile kadın dahil edildi. Hamile bayanların anamnezi alındıktan sonra uygun şartlar altında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi rutin Biyokimya laboratuvarında AFP, β hCG ve uE3 düzeyleri belirlendi.

Çalışma grubuna dahil edilen tüm gebelerin 16.-20. gebelik haftalarında her üç analit için maternal serum düzeylerinin median değerleri hesaplandı. Bu değerler yaş ile kombine edilerek bireysel risk değerine ulaşıldı. Down sendromu riski 1/250 den düşük olan gebeler rutin gebelik takibine alındı. Down sendromu riski 1/250 den yüksek olanlara genetik danışma ve prenatal tanı önerildi. Ayrıca kilo yüksekliği,

sigara kullanma alışkanlığı hamilelik sayısı, ve akrabalık durumunun üçlü teste etkileri gözden geçirildi

Bulgularımıza göre kilo düzeyi yüksek olan hamile bayanlarda normal MoM değerlerine göre tüm haftalarda her üç değerinde düşmektedir. Bu düşüş 17. haftada AFP ve uE3, 19.ve 20. haftada uE3 için istatistiksel olarak anlamlı orana ulaşmaktadır

Sigara içen hamileler ile sigara içmeyen normal ortalamaya sahip hamileler karşılaştırıldığında ise sigara içenlerde tüm haftalarda AFP değerinde hafif artış, β hCG ve uE3 değerlerinde ise azalış gözlenmektedir. uE3 deki düşüklük 18 haftada istatistiksel olarak anlamlı orana ulaşmaktadır.

Hamile bayanların gebelik haftaları ultrason sonuçları ve son adet tarihine göre belirlendiğinde AFP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar oluşmuştur. Hamilelik sayısının etkileri değerlendirildiğinde ise nullipar ve multiparlığın üçlü testte istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edildi.

Akrabalık durumunun üçlü test üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı da yapılan çalışmada anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, üçlü testin kolay ve ucuz olması, tüm toplumlarda NTD ve Down sendromu taramasında önemli bir gösterge olması, ayrıca defektlerin saptanması ve gebeliğin devamı hakkında fikir verebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılması gereken noninvaziv bir test olduğu kanısına varılmıştır.

7. SUMMARY

THE IMPORTANCE OF TRIPLE TEST IN PRENATAL DIAGNOSIS AND MoM VALUES ACCORDING TO GESTATIONAL WEEKS

In this study, a MoM value were calculated for the triple test at 16-20 weeks of pregnancies. The aim of this investigation was to help diagnosis of Down syndrome and neural tube defect.

From May 1997 to december 1999 , 925 pregnant women were evaluated. AFP , β hCG and uE3 levels were measured by biochemistry laboratuary of Selçuk Universty Medical Faculty.

Median levels of these three analyt were calculated for 16-20 weeks of pregnancy These values were combined with age and individual risk values were determined. Pregnants with low Down syndrome risk ($< 1/250$) were observed routivnely for pregnancy period. Genetic counsiling and prenatal diagnosis were suggested for pregnant with high Down syndrome risk ($>1/250$) In addition high body weight, smoking, pregnancy number and consenquinity were compared with normal individuals.

All of three test results were lower than normal MoM values in all weeks for pregnant with high body weight. These values were 1statisticaly significant for AFP and UE3 at 17 week and for uE3 at 19-20 weeks.

When smoking and nonsmoking was compared, AFP levels were moderately high β hCG and uE3 lewels were moderately decreased . Decreasing uE3 levels were statistically significant at 18 week.

When pregnancy time were calculated according to last menstruation time , statistically significant differences were observed in AFP levels. No differences were found between multiparity and nulliparity.

Also it was understood that consenquinity was no effect on triple test

As a result of this investigation triple test is acheupreliable and important tecnique for detection of NTD and Down syndrome and must be used generally.



7. LİTERATÜR LİSTESİ

Abelev GT, Elfort DA (1982) *Alfa fetoproteins in cancer medicine*, Lea and Deciger, 1089-1099

Adair CD, Rosnes J, Frye AH; Burrus DR, Nelson LH, Veille JC (1996) *The role of antepartum surveillance in the management of gastroschisis*, İnt J Gynaecol Obstet, 52(2):141-144

Andrew E, Czeizel MD , Dudas I (1992) *Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation*, New England Journal of Medicine, 327:1832-1835

Aitken DA, McCaw G, Crossley JA, Berry E, Connor JM, Spencer K (1993) *First –trimester biochemical screening for fetal chromosome abnormalities and Neural Tube defects*, Prenatal Diagnosis, 13:681-689

Aydınlı K (1992) *Prenatal tanıda noninvaziv yöntemler*, Prenatal tanı ve tedavi, 5:40-51

Bahado RO, Kovancı E, Deren O, Copel J, Baumgarten A, Mahoney J (1998) *New Down syndrome screening algoritm: Ultrasonographic biometry and multipl serum markers combined with maternal age*, AM J Obste Gynecol, 179:1627-1631

Bal F, Oğur G, Yıldız A, Şahin İ ve Menevşe A (1995) *Kromozomal anomali riski taşıyan gebeliklerde amniyotik hücre kültürü ile fetal kromozomların incelenmesi*, T Klin Jineköl Obst, 5, 249-255.

Bal F, Yıldız A, Menevşe A ve Menekşe S (1996) *Kromozomal anomaliler ve doğum öncesi tanı yöntemleri*, T Klin Jineköl Obst, 6, 149-157.

Barford DA, Dickerman LH, Johnson WE, (1985) *α -fetoprotein: relationship between maternal serum and amniotic fluid levels*, AM J Obstet Gynecol, 151: 1038-1041

Barkai G, Goldman B, Ries L, Chaki R, Dor J, Cuckle H (1996a) *Down's syndrome screening marker levels following assisted reproduction*, Prenatal diagnosis, 16: 1111-1114

Barkai G, Goldman B, Ries L, Chaki R, Cuckle H (1996b) *Effect of gravidity on maternal serum markers for Down syndrome*, Prenatal Diagnosis, 16:319-322

Bartels I, Sievert BH, Bockel B, Herold S (1993) *Adjustment formulae for maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin and unconjugated oestriol to maternal weight and smoking*, Prenatal Diagnosis, 13:123-130

Bartels I Sancken U (1994) *Prenatal risk index fetal Down's syndrome with serum markers. Serum screen for Down's syndrome in women less than 35 years of age an age-independent index*, Z Geburtshilfe Perinatol, 198(4) : 153-154

Başaran N (1999) Tıbbi Genetik ders kitabı, 250-256

Başer İ, Ergun A, Küçük T, Dilek S, Orhon E, Pabuçcu R, Ülgenalp İ (1995) *GATA obstetric popülasyonunda üçlü tarama testi sonuçları*, T Klin Jineköl Obst, 5:15-19

Beaman JM, Akhtar N, Goldie D (1996) *Down's syndrome screening using free β hCG : instability can significantly increase the Down's risk estimate*, Ann. Clin. Biochem, 33: 525-529

Benn PA, Horne D, Briganti BS, Greenstein RM (1995) *Prenatal diagnosis of diverse chromosome abnormalities population of patients identified by triple marker testing a screen positive for Down syndrome*, Am J Obstet Gynecol, 173 (2):496-501

Benn PA, Borgida A, Horne D, Briganti BS, Collins R, Rodis JF (1997) *Down syndrome and neural tube defect screening: The value of using gestational age by ultrasonography*, Am J Obstet Gynecol, 176:1056-1061

Berkel AI, Ersoy F, Çevik N, Koçak N (1973) *Serum Alpha fetoprotein in childhood*, Turkish Journal of pediatrics, 15(4):171-177

Bernstein L, Pike MC, Lobo RA, Depue RH, Ross RK, Henderson BE (1989) *Cigarette smoking in pregnancy results in marked decrease in maternal hCG and oestradiol levels*, Br J Obstet Gynecol, 96(1):92-96

Berry E, Aitken D, Crossley A, Macri JN, Connor JM (1997) *Screening for Down's syndrome: Changes in marker levels and detection rates between first and second trimesters*, British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 104:811-817

Bishop JC, Dunstan FDJ, Nix ABJ (1997) *The effects of gestation dating on the calculation of patient-specific risks in Down's syndrome screening : multivariate case*, Ann Clin Biochem, 34: 55-60

Bogard MH, Jones OW, Felder RA, Best RG, Bradley L, Butts W, Crandall B, Macmahon W, Wians FH, Loeh PV (1991) *Prospective evaluation of maternal serum human chorionic gonadotropin levels in 3428 pregnancies*, AM J Obstetric Gynecol, 165:663-667

Bombard AT, Nakagava S, Runowicz CD, Cohen BL, Mikhail MS (1994) *Early detection of abdominal pregnancy by maternal serum AFP+ screening*, Prenatal Diagnosis, 14:1155-1157

Borman B, Cryer C (1993) *The prevalence of anencephalus and spina bifida in New Zealand*, J Paediatr Child Health, 29(4) 282-288

Brazcau NK, Wentz SJ, Hansen AM, Holmes TM (1992) *An epidemiologic study of neural tube defects: Delta Country, Michigan, 1969-1988* Fam Pract Res J, 12 (2): 205-212

Bremme K, Lagerstrom M, Anderson O, Johansson S, Eneroth P (1990) *Influences of maternal smoking and fetal sex on maternal serum oestriol, prolactin, hCG and hPI levels*, Arch Gynecol Obstet, 247(2): 93-103

Brock DJH, Barron L, Holloway S, Liston WA, Hiller SG and Seppala M (1990) *First trimester maternal serum biochemical indicators in down syndrome*, Prenat Diagnosis, 10:245-251

Buccimazza SS, Molteno CD, Dunne TT, Viljoen DL (1994) *Prevalance of neural tube defect in Cape town, South africa*, Teratology, 50(3) . 194-199

Burton BK (1989) *Maternal serum α -fetoprotein screening*, Pediatric Annals, 18:11, 687-697

Burton BK, Prins GS, Verp MS (1993) *A prospective trial of prenatal screening for Down syndrome by means of maternal serum α -fetoprotein human chorionic gonadotropin and unconjugated estriol* AM J Obstet Gynecol 169:526-530

Canick JA, Knight GJ, Polamaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ (1988) *Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down syndrome* Br J Obstet Gynaecol 95 (4) 330-333

Canick JA, Kellner LH (1999) *First trimester screening for aneuploidy: serum biochemical markers*, Semin Perinatol, 23(5):359-368

Carroll JC (1994) *Maternal serum screening*, Canadian Family Physician, 40:1756-1764

Casals E, Aibar C, Martinez JM, Borrell A, Soler A, Ojuel J, Ballesta AM (1999) *First trimester biochemical markers for Down syndrome*, Prenatal Diagnosis, 19:8-11

Chen CS, Bejcek BE, Kersey JH (1995) *A mapping study of 13 genes on human chromosome band 4q11-q25*, Cytogenet Cell Genet, 69(3-4)260-265

Cheng EY, Luthy DA, Zebelman A, Williams WA, Liepman RE, (1993) *A prospective evaluation of a second trimester screening test for fetal Down syndrome using maternal serum AFP, hCG and uE3*, Obstet Gynecol, 81:72-77

Crosley JA, Aitken DA, Connor M (1993) *Second – trimester unconjugated oestriol levels in maternal serum from chromosomally abnormal pregnancies using an optimized assay*, Prenatal Diagnosis, 13: 271-280

Crossley JA, Berry E, Aitken DA, Connor M (1996) *Insulin-dependent diabetes mellitus and prenatal screening results: Current Experience from a regional screening programme*, Prenatal Diagnosis, 16: 1039-1042

Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH, (1984) *Maternal serum alpha – fetoprotein measurement: A screening test for Down syndrome*, The Lancet, 28- 926

Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG (1987) *Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha –fetoprotein level*, British Journal of Obstetric and Gynecology , 94:387-402

Cuckle HS, Oudgaarden ED, Mason G, Holding S (1994) *Taking account of vaginal bleeding in screening for Down's syndrome*, B J Obstet Gynecol, 101:948-953

Cuckle HS (1998) *Effect of maternal age curve on the predicted detection rate in maternal serum screening for Down syndrome*, Prenatal Diagnosis, 18:1127-1130

Dar H, Merksamer R, Berdichevsky D, David M (1996) *Maternal serum markers levels in consecutive pregnancies: A possible genetic predisposition to abnormal levels*, American Journal of Medical Genetics, 61:154-157

Demirel S, Kaptanoğlu N, Acar A, Bodur S, and Paydak F (1997) *The Frequency of consanguinity in Konya; Turkey and its medical effects*, Genetic Counseling, 8(4): 295-301

Elias S, Simpson JL (1992) *Maternal serum screening for fetal genetic disorders*,

Erhan G, Yücebیلgin MS, Bilgin O ve Tıraş B (1994) *Gebelerde alfafetoprotein düzeyleri ve Nöral tüp defektleri*, T Klin Jineköl Obst, 4, 74-77.

Erler A, Uran B, Aruh İ, Karaman AŞ, Südekan Ö, Demir N (1992) *Normal gebeliklerde maternal serum alfa-fetoprotein değerleri*, T Klin Jineköl Obst, 2:89-92

Erk A (1996) *Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite*, 257-281

Espinase M, Manouvrier S, Boute O, Farriaux JP (1997) *Embryofetopatı due to valproate :a pathology only little known. Apropos of 4 cases*, Arch. Pediatr, 4(3):288-289

Forrester MB, Merz RD, (1999) *Impact of demografic factors on prenatal diagnosis and elective pregnancy termination because of abdominal wall defects*, Fetal Diagn Ther, 14(4) 206

Haddow JE, Palomaki G, Kloza EM and Knight GJ (1984) *Does smoking influence serum alpha -fetoprotein levels in mid-trimester pregnancies*, Br J Obstet Gynaecol, 91, 12, 1188-1191.

Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ (1995) *Effect of parity on human chorionic gonadotropin levels and Down's syndrome screening*, J Med screen, 2(1): 28-30

Hafner E, Stangl G, Rosen A, Schuchter K, Plattner M, Philipp K (1999) *Influence of cigarette -smoking on the result of the triple test*, Gynecol Obstet Invest, 47(3): 188-190

Heinonen S, Ryynanen M, Kirkinen P, Saarikoski S (1996) *Endometrial and fetoplasental markers in pregnancies with fetal congenital nephrosis*, Acta Obstet Gynecol Scand, 75(6) 526-530

Hsu JJ, Hsieh TST, Hsieh FJ (1996) *Down syndrome screening in an Asian population using Alpha-fetoprotein and free β -hCG: A report of the Taiwan Down syndrome screening group*, Obstet Gynecol, 87:943-947

Johnson JM, Harman CR, Evans JA, Macdonald K, Manning FA (1990) *Maternal serum alpha-fetoprotein in twin pregnancy*, AM J Obstet Gynecol, 162 (4) 1020-1025

Jorgensen FS (1995) *Attitudes to prenatal screening, diagnosis and research among pregnant women who accept or decline an alpha-fetoprotein test*, Prenatal Diagnosis, 15:419-429

Journel H, Marec L, Parent P, Roussey M (1986) *Evaluation of the incidence of anencephaly and spina bifida in Brittany*, Rv Epidemiol Sante Publique, 34(6):373-381

Jüllier C, Weil D, Couillin P, Cote JC, Nguyen VC, Foubert C, Boue AJP, Kaplan JC, Junien C. (1984) *The beta chorionic gonadotropin – beta luteinizing gene clone maps to human chromosome*, Hum Genet, 67(2) : 174-177

Kabukcu A, Önderoğlu L, Durukan T, Laleli Y (1996) *İkinci trimesterde anne serumunda açıklanamayan alfa-fetoprotein yüksekliğinin gebeliğin sonucuna etkisi*, T- Klin Jinekoloj Obst, 6:287-289

Kaffe S, Hsu LYF, (1992) *Maternal serum α fetoprotein screening and fetal chromosome anomalies: Is Lowering maternal age for Amniocentesis preferable?*
American Journal of Medical Genetics, 42:801-806

Kellner HL, Weiner Z, Weiss RR, Neuer M, Martin GM, Mueenuddin M, Bombard A (1995 a) *Triple marker (α fetoprotein, unconjugated estriol, Human chorionic gonadotropin) versus α -fetoprotein plus free $-\beta$ subunit in second – trimester maternal serum screening for fetal Down syndrome :A prospective comparison study*, AM J Obstetric Gynecology, 173:1306-9

Kellner HL, Weiss RR, Weiner Z, Neuer M, Martin G, Schulman H, (1995b) *The advantages of using triple marker screening for chromosomal abnormalities*, Am J Obstet Gynecol, 172:831-836

Kennedy DM, Edwards VM, Worthington DJ (1999) *Evaluation of different weight correction methods for antenatal serum screening using data from two multi-centre programmes*, Ann Clin Biochem, 36:359-364

Knight GJ, Palomaki GE, Neveux LM, Fodor KK (1998) *hCG and The free β -subunit as screening tests for Down syndrome*, Prenatal Diagnosis, 18:235-245

Kologlu S (1996) *Temel ve klinik endokrinoloji*, 654-658

Lambert GM, Saller DN, Tumber MB, French CA, Peterson CJ, Canick JA. (1999) *Second-trimester maternal serum progesterone levels in Turner syndrome with and without hydrops and in trisomy 18*, Prenatal Diagnosis, 19: 476-479

Larsen SO, Christiansen M, Norgaard-Petersen B (1998) *Inclusion of serum marker measurements from a previous pregnancy improves Down syndrome screening performance*, Prenatal Diagnosis, 18:706-712

Laundon CH, Spencer K, Macri JN, Anderson RW (1996) *Free beta hCG screening of hydropic and non-hydropic Turner syndrome pregnancies*. Prenatal Diagnosis 16: 853-856

Lockwood C, Benecerraf B, Krinsky A, Blakemore K, Belanger K, Mahoney M (1987) *A sonographic screening method for Down syndrome*, Am J Obstet Gynecol, 157:803-808

Macri JN, Spencer K, Anderson RW, Cook EJ (1993) *Free β -chorionic gonadotropin : a cross-reactivity study of two immunometric assays used in prenatal maternal serum screening for Down's syndrome*. Ann Clin Biochem 30:94-98

Mavrou A, Metaxotou C, Trichopoulos D (1998) *Awareness and use of prenatal diagnosis among Greek women: a national survey*, Prenatal Diagnosis, Apr;18(4):349-55

Miller-Lindholm AK, Labenz CJ, Ramey J, Bedows E, Ruddon RW (1997). *Human chorionic gonadotropin β -subunit gene expression in the placenta*, Endocrinology, 138(12) :5459-5465

Mooij PNM, Regine PM, Chris MG, Doesburg WH (1993) *Periconceptional vitamin profiles are not suitable for identifying women at risk for neural tube defects*, Human and Clinical Nutrition, 123: 197-203

Morsink LP, Kornman LH, Beekhuis JR, Woift BT, Mantingh A(1995)
Abnormal levels of maternal serum human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein in second trimester relation to fetal weight and preterm delivery, Prenatal diagnosis, 15(11) 1041-1046

Morsink LP, Sikkema-Raddatz B, Beekhuis JR, DeWolf BT, Manting A (1996)
Placental mosaicism is associated with unexplained second-trimester elevation of MShCG levels but not with elevation MSAFP levels, Prenatal Diagnosis, 16(9):845-51

Muller F , Boue A (1990) *A single chorionic gonadotropin assay for maternal serum screening for down's syndrome*, Prenatal Diagnosis, 10:389-398

Muller F, Bussieres L (1996) *Maternal serum markers for fetal trisomy 21 screening*, European J Obst. Gynecol, 65:3-6

Naylor SL, Chin WW, Goodman HM, Lalley PA, Grzeschik KH (1983)
Chromosome assignment of genes encoding the alpha subunits of glykoprotein hormones in man and mouse, Somatic Cell Genetic, 9(6) 757-770

Nazer J, Eaglin MA, Cifuentes L (1998) *Incidence of Down syndrome at a University hospital Ma. Of Chile : A 25- years record:1972-1977*, Rev Med Chil, 126(4) 383-390

Neveux LM, Palomaki GE, Knight GJ and Haddow JE (1996) *Multiple marker screening for down syndrome in twin pregnancies*, Prenat Diagn, 16, 29-34.

Norgard -Petersen B, Larsen SO, Arends J, Svenstrup B, Tabor A (1990)
Maternal serum markers in screening for Down syndrome, Clin Genet, 37(1) 35-43

Norgard-Petersen B, Alfthan H, Arents J, HoghdalCK Larsen SO (1994)

A new simple and rapid dual assay for AFP and free β hCG in screenning for Down syndrome, Clin Genet, 45:1-4

Nyberg DA, Luthy DA, Cheng EY, Sheley RC, Resta RG, (1995)

Role of prenatal ultrasonography in women with positive screen for Down syndrome on the basis of maternal serum markers, AM J Obstet Gynecol, 173: 1030-1035

Nurluoğlu M, Ceylan Y, Altuncu N ve Turan Ö (1991)

Nöral tüp defekti (NTD) insidensi üzerine, Jinekoloji ve Obstet Derg, 5, 109-112.

Owen J, Wenstrom KD, Hardin MJ, Boots LR, Hsu CC, Cosper PC,

Dubard MB (1994) *The utility of fetal biometry as an adjunct to the multiple-marker screening test for Down syndrome, AM J Obstet Gynecol, 171:1041-1046*

Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Lawrence JB, Conover

CA, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L, Haaning J (1999) *Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues, Biol Reprod, 61(4):1083-1089*

Petrocik E, Wassman ER, Lee J, Kelly JC (1990)

Second trimester maternal serum pregnancy specific beta-1 glycoprotein (SP-1) levels in normal and Down syndrome pregnancies, American Journal of Medical Genetics, 37:114-118

Polamaki GE, Knight GJ, Haddow JE, Canick JA, Wald NJ (1993a)

Cigarette smoking and levels of maternal serum Alpha -fetoprotein , unconjugated estriol and hCG : Impact on Down Syndrome screening, Obstet Gynecol, 81:675-678

Polamaki GE, Knight GJ, McCarthy J, Haddow JE, (1993b) *Maternal serum screening for fetal Down's syndrome in the United States:A 1992 survey*, AM J Obstet Gynecol, 169: 1558-1562

Polamaki GE, Knight GJ, Haddow JE (1994) *Human Chorionic gonadotrophin and unconjugated oestriol measurements in insulin – dependent diabetic pregnant women being screened for fetal Down syndrome*, Prenatal Diagnosis, 14:65-68

Polamaki GE, Knight GJ, McCarthy J, Haddow JE, Donhowe JM (1997) *Maternal serum screening for fetal Down's syndrome in the United States:A 1995 survey*, AM J Obstet Gynecol, 176:1046-1051

Ribbert LSM, Kornman LH, De wolf BTHM, Simons AHM, Jansen CAM, Beekhuis JR, Mantingh A (1996) *Maternal serum screening for fetal Down syndrome in IVF pregnancies*, Prenatal Diagnosis, 16: 35-38

Rodríguez L, Sanchez R, Hernandez J, Carrillo L, Oliva J (1997) *Results of 12 years combined maternal serum alpha-fetoprotein screening and ultrasound fetal monitoring for prenatal detection of fetal malformations in Havana city, Cuba*, Prenatal Diagnosis, 17:4: 301-304

Ross HL, Elias S, (1997) *Maternal serum screening for fetal genetic disorders*, Fetal Diagnosis and Therapy, 24,1 33-45

Rose NC, Mennuti MT (1993) *Maternal serum screening for Neural Tube Defects and fetal chromosome abnormalities*, West J Med, 159:312-317

Saller DN, Canick JA, Oyer CE, (1996) *The detection of nonimmunohydrops through second-trimester maternal serum screening*, Prenatal Diagnosis, 16:431-435

Silahtaroglu AN, Tumer Z, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, (1993) *Assignment of the human gene for pregnancy-associated plasma protein A(PAPP) to 9q33.1 by fluorescent in situ hybridization to mitotic and meiotic chromosomes*, Cytogenet Cell Genet, 62 (4):214-216

Spencer K, Mallard A, Ward M (1992) *Free beta human chorionic gonadotropin in Down's syndrome screening: a multicentre study of its role compared with other biochemical markers*, Ann Clin Biochem, 29: 506-518

Spencer K, Salonen R, Muller F (1994) *Down's syndrome screening in multiple pregnancies using alpha-fetoprotein and free beta hCG*, Prenatal Diagnosis, 14:537-542

Spencer K (1995) *The influence of gravidity on Down's syndrome screening with free beta hCG*, Prenatal Diagnosis, 15:87-89

Spencer K, Wallace EM, Ritoe S (1996) *Second trimester dimeric inhibin-A in Down's syndrome screening*, Prenatal Diagnosis, 16:1101-1110

Spencer K(2000) *Screening for trisomy 21 in twin pregnancy in first trimester using free-hCG and PAPP-A combined with fetal nuchal translucency thickness*, Prenatal Diagnosis, 20(2): 91-95

Tahtaravani U, Matsumoto C, Delach J, Craffey A, Smeltzer J, Benn P (1996) *Trisomy 16 mosaicism in amniotic fluid cell cultures*, Prenatal Diagnosis, 16(8):749-754

Thornton G, Richard SV, Williams J, Holding S,(1991) *Clinical experience with the triple test for Down's syndrome screening*, J.Perinat.Med., 19:151-154

Thiagarajah S, Stround CB, Vavelidis F, Schnorr JA, Schnatterly TP, Ferguson JE (1995) *Elevated maternal serum α -feto protein levels: What is the risk of fetal aneuploidy?* AM J Obstet Gynecol, 173:388-392

Tenlung S, Olsen A, Khan WN, Frangsmyr L, Hammarstrom S (1994)*The pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene cluster human chromosome 19: fine structure of the 11 PSG gen identification of 6 new genes forming athird subgrup carcinoembriogenic antigen (CEA) family*, Genomics, 23(3) 669-684

Tul N, Spencer K, Noble P, Chan C (1999) *Screening for trisomy 18 by fetal nuchal translucency and maternal serum Free b-hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation*, Prenatal Diagnosis, 19:1035-1042

Wald NJ , Cuckle HS Densem JW Nanchahal K, Royston P, Chard D, Haddow JE, KnightGJ, Polamaki GE, CanickJA (1988) *Maternal serum screening for Down syndrome in early pregnancy*, B M J, 22;297(6653)883-887

Wald N , Cuckle H (1988) *Antenatal screening for Down syndrome*, Lancet, 10;2 (8624)1362

Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Kennard A, Smith D (1992) *Maternal serum screening for Down's syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight*, Fetal and Neonatal Medicine, 99:144-149

Wald NJ, Kennard A, Watt HC, Smith D (1994) *Value of maternal serum unconjugated oestriol measurement in prenatal screening for Down's syndrome*, Prenatal Diagnosis, 14: 699-706

Wald NJ, Densem JW, Smith D, Kleee G (1994) *Four-marker serum screening for Down's syndrome*, Prenatal Diagnosis, 14: 707-716

Wald NJ, Watt HC, George L (1996) *Maternal serum Inhibin -A in pregnancy with insulin -dependent diabetes mellitus: Implications for screening for Down's syndrome*, Prenatal Diagnosis, 16:923-926

Wald NJ, Densem JW, George L, Muttukrishna S (1996) *Prenatal screening for Down's syndrome using Inhibin -A as a serum marker*, Prenatal Diagnosis, 16:143-153

Wald NJ, Densem JW (1994) *Maternal serum free α -human chorionic gonadotrophin levels in twin pregnancies: Implications for screening for Down's syndrome*, Prenatal diagnosis, 14:717-719

Wald NJ, Watt HC (1996) *Serum markers for Down's syndrome in relation to number of previous births and maternal age*, Prenatal diagnosis, 16:699-703

Wallace EM, Swanston IA, McNelly AS, Ashby JP, Blundel G, Calder AA (1996) *Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin A*, Clinical Endocrinology, 44:17-21

Wals P, Trochet C, Pinsonneault L (1999) *Prevalance of neural tube defects in the province of oubec 1992*, Can J Public Health, 90(4) 237-239

Watt HC , Wald NJ (1998) *Alternative methods of maternal weight adjustment in maternal serum screening for down syndrome and neural tube defect*, Prenatal Diagnosis, 18(8): 842-845

Watt HC, Wald NJ, George L (1996) *Maternal serum inhibin –A levels in twin pregnancies : Implications for screening for Down's syndrome* Prenatal Diagnosis, 16 (10): 927-929

Watt HC, Wald NJ, Smith D, Kennard A, Densem J (1996) *Effect of allowing for ethnic group in prenatal screening for down syndrome* Prenatal Diagnosis, 16:691-698

Wheller DM, Sinosich MJ, (1998) *Prenatal screening in the first trimester of pregnancy*, Prenatal Diagnosis, 18: 537-543

Wenstrom KD, Owen J Boots L Either (1995) *The influence of maternal weight on chorionic gonadotropin in the multiple –marker screening test for fetal down syndrome*, AM J Obstet Gynecol, 173:1297-1300

Wu Y, Zeng M, Xu, Liang J, Wang Y, Miao L, Xiao K (1995) *Analyses of the Prevalances for neural tube defects and cleft lip and plate in China from 1988 to 1991*, Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Husueh Pao, 26(2) : 215-219

Van Rootselaar FJ (1993) *The epidemiology of neural tube defects. A mathematical model*, Med. Hypotheses, 41(1) : 78-82

Yagel S, Anteby YE, Celnikier DH, Ariel I, ChaapT, Ben Z (1998) *The role of midtrimester targeted fetal organ screening combined with the "triple test" and maternal age in the diagnosis of trisomy 21: A retrospective study*, AM J Obstet Gynecol, 178:40-44

Yeh SH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS (1996) *Allelic loss on chromosomes 4q and 16q in hepatocellular carcinoma: association with elevated alpha-fetoprotein production*, Gastroenterology, 110(1):184-192

Yankowitz J, Fulton A, Williamson R, Grand SS, Budelier WT (1998) *Prospective evaluation of prenatal maternal serum screening for trisomy 18*, AM J Obstet Gynecol, 178:446-450

Zwahr C, Voss P, Kistner G (1996) *Comparison between age-dependent (wald alpha program) and age-independent (Ulm -index) analysis program for detection of Down's syndrome with serum markers*, Z Geburt Neonatal, 200 (5) :181-185

9.ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlköğrenimini Malatya Fırat İlkokulu Orta öğrenimini Ankara Etimesgut Mehmetçik Ortaokulu, Lise öğrenimini Ankara Atatürk Lisesinde tamamladı. 1984 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandı. 1991 yılında mezun oldu. Aynı yıl mecburi hizmetini Ankara Nallıhan Sarıyar sağlık ocağında tamamladı . Daha sonra Ankara Altındag Altınova sağlık ocağında 2 yıl çalıştıktan sonra Konya merkez 8 nolu sağlık ocağına atandı. 1994 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalında doktora eğitimine başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AnaBilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalında öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli bir erkek bir kız babasıdır.

10. TEŞEKKÜR

Eğitimimin devam ettiği süre içerisinde çalışmalarımı yönlendiren bilgi ve görüşleri ile bana yol gösteren danışmanlığımı yürüten hocam Sayın Prof Dr Aynur ACAR'a, gerekli kolaylıkları her zaman sağlayıp bize destek veren Anabilim Dalı başkanımız hocam Prof Dr. Ferhan PAYDAK'a, çalışmalarımda kıymetli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarım Doç. Dr Sennur DEMİREL ve Doç Dr Hasan ACAR'a, mesai arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr Tülin ÇORA , Dr Ayşegül ZAMANI ve Uzm. H. Gül DURAKBAŞI'na, ayrıca materyal toplama ve analiz aşamasında yardımlarını esirgemeyen Kadın-Doğum ve Biyokimya Anabilim Dalı Hocalarına, teknisyenlerimiz Ahmet DEMİRDELEN, Osman KURT, Mevlüt ÖZYOLDAŞ'a , sekreterimiz Sıdıka ASLANTAŞ'a ve Aileme teşekkürü bir borç bilirim