

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Çocuk Sağlığı Enstitüsü  
Tıbbi Genetik Bilim Dalı

**CİNSİYET ANOMALİLERİNİN TARANMASINDA  
BARR CİSİMCİĞİ (X KROMATİNİ) TAYİNİ YÖNTEMLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI VE DEĞERİ**

Tıbbi Genetik  
Yüksek Lisans Tezi

Bio.Binnur Gökçek

Tez Yürütücüsü: Prof.Dr.Memnune (Yüksel) Apak

İstanbul - 1989

**T. C.**  
**YÜKSEKÖĞRETİM KURUMU**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MATERYEL VE METOD.....	20
BULGULAR.....	28
RESİMLER.....	35
TARTIŞMA.....	40
ÖZET.....	49
KAYNAKLAR.....	51

## Ö N S Ö Z

Tez konumu belirleyen, çalışmamın yürütülmesini sağlayan, değerli fikirlerinden faydalandığım, Tıbbi Genetik Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Memnune (Yüksel) Apak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, destek ve bilgilerini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Olcay Neyzi'ye en derin teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Yard.Doç.Dr.Gönül Oğur'a, bulguların istatistiksel değerlendirilmesine yardımcı olan Sayın Doç.Dr.Ayşen Bulut'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Genetik Laboratuvarı Araştırma Görevlileri Biolog Ayşegül Güler ve Biolog Birsen Karaman'a teşekkür ederim.

Ayrıca bütün çalışma sürem boyunca, manevî desteklerini esirgemeyen tüm yakınlarıma teşekkür ederim.

Binnur Gökçek

## GİRİŞ

Cinsiyet anomalilerinin teşhisinde en önemli kriterlerden biri, hastanın genetik cinsiyetinin tayin edilmesidir. Bu konuda; kromozom analizi yöntemi ve yapılması çok basit bir test olan X kromatini tayin yöntemi kullanılmaktadır(28).

X kromatini (Barr body), normal dişilerin somatik hücre çekirdeklerinin periferinde bulunan ve cinsiyet tayininde kullanılan bir kromatin kitlesi olup, erkeklerde bulunmaz(22, 23). Diploid hücrelerde X kromozomlarından biri inaktif hale geçerek X kromatinini oluşturur(2). X kromozomlarından birinin inaktivasyonu, yalnızca iki veya daha fazla X kromozomu içeren hücre çekirdeklerinde olur. X kromatini, o hücredeki X kromozom sayısının bir eksiği olarak ifade edilmektedir(2, 24). Normal kadında, XX karyotipi olduğu için tek X kromatini bulunmaktadır. Normal erkeklerde ise XY karyotipi nedeni ile X kromatini bulunmamaktadır(16,30). Erkeklerde bir veya daha fazla X kromatin bulguları, X kromozom anomalileri ile ilişkilidir. Kadınlarda ise, çok düşük veya fazla sayıda olması, X kromozomu sayı anomalilerinin göstergesidir(18).

Moore ve Barr (1955), yanak mukozasından alınan yayma preparatlarında X kromatin sayımlarının özellikle X kromozom düzensizliklerine bağlı hastalıkların tanısında klinik olarak çok yararlı olduğunu ve bu yöntemin kolaylıkla uygulanabileceğini ortaya koymuşlardır(2). X kromatin testinde, pratikte belirgin çekirdeği olan ve kolay elde edilebilen hücreler

kullanılmaktadır. Yanak mukozasının bazal epitel hücreleri, X kromatin incelemeleri için çok uygundur. Yanak mukozası yayma yöntemi, hem basitliği hem de ucuzluğu nedeniyle çok kullanılan yararlı bir tarama yöntemi olarak kabul edilmiştir(2,5,25).

X kromozom sayı anomalilerinin tesbitinde X kromatin testi pratik bir yöntemdir(23). Cinsiyet kromozomları yönünden mozaik olan bireylerin saptanmasında da bu test önemlidir. Örneğin X kromatin oranı düşük bulunan bireylerde mozaik durum düşünülerek bir ön tanı konulabilir. XX/XO mozaisizmi gösteren Turner vakalarında, X kromatin oranı düşmektedir. X kromatini, X kromozomunun yapısal anomalileri hakkında da bilgi vermektedir. Böyle anomalilerde X kromatini normalden büyük veya küçük görünmektedir(2,23,28).

Günümüzde, cinsiyet kromozom anomalilerinin teşhisinde laboratuvar çalışması olarak, kromozom karyotip analizleri yapılmaktadır. Bu metod en doğru sonucu vermesine rağmen, pahalı ve uzun süren bir çalışma gerektirmektedir. Yanak mukozasından alınan epitel hücrelerinin yayma preparatları ile yapılan X kromatini testi, kromozomal karyotipin yerini almakla birlikte, laboratuvar çalışmalarında kısa sürede uygulanması ve ucuz olması nedeniyle pratik bir değer taşımaktadır(2,18,26). Dolayısıyla kromozomal anomalilerin tanısında basit bir tarama testi olarak kullanılmaktadır(13). Ayrıca periferik kan dokusuna ek olarak bir başka dokuyu (epitel) incelememize olanak verdiğiinden, dokusal mozaisizm durumlarında deri biopsisi ve fibroblast kültüründen karyotip yapılmadan önce yine tarama testi olarak son derece yararlıdır. X kromozomunun sayısal ve yapısal anomalilerinin ve dokusal mezoisizmin saptanmasında, kromozom analizinden önce bir tarama testi olarak yanak mukozası yaymalarında X kromatin tayini eskiden beri kullanılagelen bir yöntemdir. Çalışmamızın amacı, normal dişi ve erkeklerden elde edilen yanak mukozası yaymalarında değişik boyama yöntemlerini uygulamak ve laboratuvarımız için en uygun olan yöntemi ve materyalimizde cinsiyet kromatininin normal değerlerini saptamaktır.

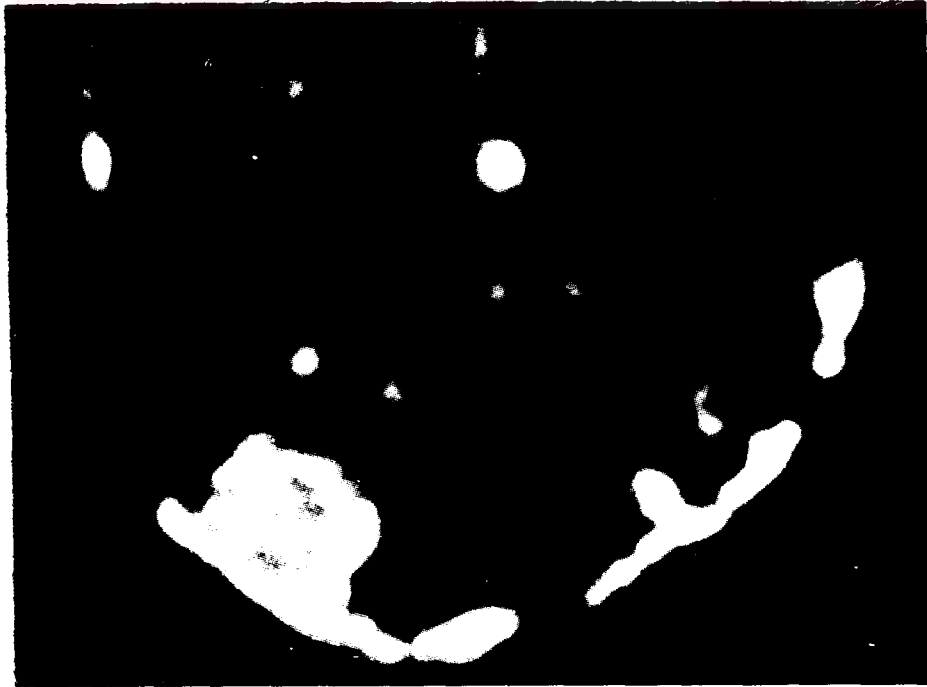
## GENEL BİLGİLER

Cinsiyet kromatini, seks kromatini, Barr cisimciği gibi adlar verilen X kromatini, yalnızca dişi memeli hücrelerinde interfaz nukleusunda bulunan çekirdek zarına yapışmış özel bir kromatindir(2,9,13,17,19,23,25). İlk kez 1937 yılında zoolog Geitler tarafından, böceklerde X kromozomunun interfaz nukleusunda ayrı bir kromatin kitlesi halinde yoğunlaşmış olduğu gösterilmiştir(1). Daha sonra 1949 yılında, dişi ve erkek kedilerin sinir hücrelerinin morfolojik özellikleri üzerine çalışmalar yapan Barr ve Bertram tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar "Barr cisimciği" adı ile anılacak olan X kromatininin yalnızca dişi kedilerin sinir hücrelerinde bulunduğunu, erkeklerde ise böyle bir kromatinin bulunmadığını tesbit etmişlerdir(2,5,18,26,28,30). Bu arada Barr çeşitli boyama teknikleri kullanarak (Feulgen, Cersyl echt violet, Hematoxylin-Eozin, Methyl green pyronin) X kromatininin DNA'dan zengin olduğunu göstermiştir(12,15). Daha sonraki çalışmalarda X kromatininin kedilerin öteki vücut hücrelerinde de bulunduğu gösterilmiştir(2,9,25). Kanada'da Moore ve Barr (1955) ve ABD'de Marberger ve arkadaşları, nukleer seks tayinini daha da kolaylaştırmak amacıyla yanak mukozasından alınan epitel hücrelerinin yayma preparatlarını incelemişler ve bu hücrelerde de X kromatininin gösterilebileceğini bulmuşlardır(5,26).

### X Kromatininin Morfolojisi

X kromatini, yaklaşık bir mikron çapında olup, genellikle nukleus periferinde bulunur. Bir yüzü düz, çekirdek içine bakan yüzü ise dışbükey, yarımküre veya üçgen şeklindedir. Genellikle koyu boyanan katı bir cisim görünümündedir. DNA içeriğinden dolayı Feulgen pozitif reaksiyon verir(1,3,9, 11,17,18,22,23,24,26).

Çeşitli tip insan seks kromatinleri incelenirken X kromatininin iki parçalı bir yapısı olduğu bulunmuş ve bunun için "Diplococus" deyiminin kullanılması önerilmiştir (Crouch ve Barr; 1954, Klinger; 1957-1958)(1). Bu iki parçalı yapı, birbirine sıkı bağlı iki yarı küreden oluşmuştur. Polarize ışık mikroskobu ile detaylı X kromatin yapısı incelenmiş ve X kromatinlerinin tek tarafı açık veya yarım daire şeklinde, çifte halkalar oluşturdukları görülmüştür (Resim 1). Bu yapının özelliği tam olarak tarif edilmemesine rağmen, orjinal örnekler katlanmış X kromozomları görünüşünü ileri sürmektedir(26).



Resim 1- Nukleus periferinde, tek tarafı açık veya yarım daire şeklindeki X kromatininin görünüşü(26).

## X Kromatininin Kökeni

X kromatini ya da Barr Cisimciği, X kromozomlarından birinin rastgele olarak yoğunlaşması ve inaktivasyonu sonucu oluşmakta ve yalnız hücre siklusunun interfaz evresinde (S evresinde) görülebilmektedir. Normal dişideki 2X kromozomundan birisi, heterokromatik hale gelerek interfazda yoğunlaşır ve X kromatinini oluşturur(2,28).

Dişilerdeki 2X kromozomu arasındaki fark, otoradyografik teknikler kullanılarak gösterilmiştir (Taylor, 1957). Bu tekniklerle, DNA ya özgü Timidin bazı çok düşük enerjili  $\beta$  radyasyonu veren, radyoaktif hidrojen (Tritium,  $H^3$ ) ile işaretlenir ve S devresinin sonlarına doğru, hücrelerin üremekte olduğu ortama konur. Böylece  $H^3$  Timidin, DNA sentezine ve dolayısıyla kromozom yapısına katılır. İşaretlenmiş materyal özel fotografik emülsiyon ve kağıtlarla temas ettirilir, açığa çıkan gümüş taneciklerinin sayı ve dağılışı saptanır. Böylece kromozomlar spesifik olarak işaretlenirler. Yapılan çalışmalar, normal dişinin 2X kromozomundan birisinin otozomlarla aynı anda işaretlenmesine rağmen, diğerinin daha geç işaretlendiğini göstermiştir. Bu da X kromozomlarından birinin DNA sentezine geç başladığını ve dolayısıyla sentezini daha geç tamamladığını gösterir(1,25). Bu geç DNA sentezleyen X kromozomu, heterokromatin durumunu interfazda da sürdürerek seks kromatinini oluşturmaktadır (German 1962, Gilbert ve ark., 1962)(25,28).

Heterokromatik X kromozomlarını oluşturan, geç replike olmuş X kromozomlarının, ayrı X kromatinlerinin oluşmasında rol oynadığını gösteren kanıtlar vardır. Bu kanıtlar şu şekilde özetlenmektedir:

1- Geç replike olan X kromozomlarının, metafaz plağında periferal bir yerleşme eğiliminde oldukları görülür (X kromatininin çekirdek zarına yapışık görünmesinin nedeni).



2- Aynı kromozom çoğunlukla bükülmüş bir görünüme sahiptir.

3- Bunun gibi geç replike olan kromozomlar, erkek hücrelerinde bulunmazlar.

4- XXXXY bireylerde, 3X kromozomu geç replike olur.

5- XXXXX dişilerinde 4X kromozomu geç replike olur.

6- X kromatini üzerinde işaretlenen kısım, geç replike olan X kromozomundakinin aynıdır.

Normal dişilerdeki 2X kromozomu arasındaki morfolojik farklılığı gösteren sitolojik çalışmalar, tek X kromatininin yapısı hakkında daha iyi bilgiler sağlar. Geç replike olan X kromozomları, kendi homologlarından daha kısadır ve sentromere yakın olan her kolda negatif heteropiknotik segmentlere sahiptirler(1,25).

#### Lyon Hipotezi (Lyonizasyon)

Dişilerdeki 2X kromozomuna karşılık, erkeklerde bir X ve bir Y kromozomu bulunmaktadır. İlk bakışta dişide 2X kromozomunun bulunması, bu kromozom üzerindeki genlerle oluşturulan proteinlerin ve dolayısıyla ilgili özelliklerin, erkekten bir kat daha fazla olacağı izlenimini vermektedir. Oysa, X kromozomu üzerindeki genlerin oluşturduğu nitelikler bakımından, dişi ve erkek arasında hiç bir fark bulunamamıştır. Bu durumu Müller 1932 yılında aydınlatmış ve dişilerde fazla genlerde dozaj kompanzasyonu oluştuğunu bildirmiştir.

Mary Lyon, Müller tarafından açıklanmaya çalışılan dişideki fazla X kromozomu durumunu, kendi adıyla anılan Lyon hipotezi (Lyonizasyon) ile aydınlatmıştır (1961, 1962)(2,13, 21,25,28).

Lyon hipotezine göre;

1- Normal dişilerin somatik hücrelerindeki 2X kromozomundan, yalnız biri aktif, diğeri fonksiyonel olarak inaktiftir. İnaktif olan bu X kromozomu, X kromatinini oluşturmaktadır.

2- X kromozomlarından birinin inaktivasyonu, embriyonal hayatın ikinci haftasında başlar.

3- İnaktifleşen X kromozomu, yavru hücrelere inaktif olarak geçer. Fakat inaktif kromozomun dağılışı rastgele olmaktadır. Bir hücrede anneden gelen X ( $X_m$ ), diğeri hücrede de babadan gelen X ( $X_p$ ) inaktif olabilir.

Bir başka deyimle, normal dişi X kromozomlarındaki genlerin etkinliği bakımından mozaiktir. Bir hücrede baba kökenli X kromozomu aktif (görev yapıyor), diğeri anne kökenli X aktif olabilmektedir.

İnaktivasyonun net etkisi X kromozomal genlerinin erkek ve dişi hücrelerinde eşit olmasını sağlamaktır.

Aktif ve inaktif kromozomların dağılışı aşağı yukarı yarı yarıyadır. İnaktif olan X kromozomlarının % 50'si anneden, % 50'si babadan gelen X kromozomlarıdır(1,2,7,13,20,21,25,28).

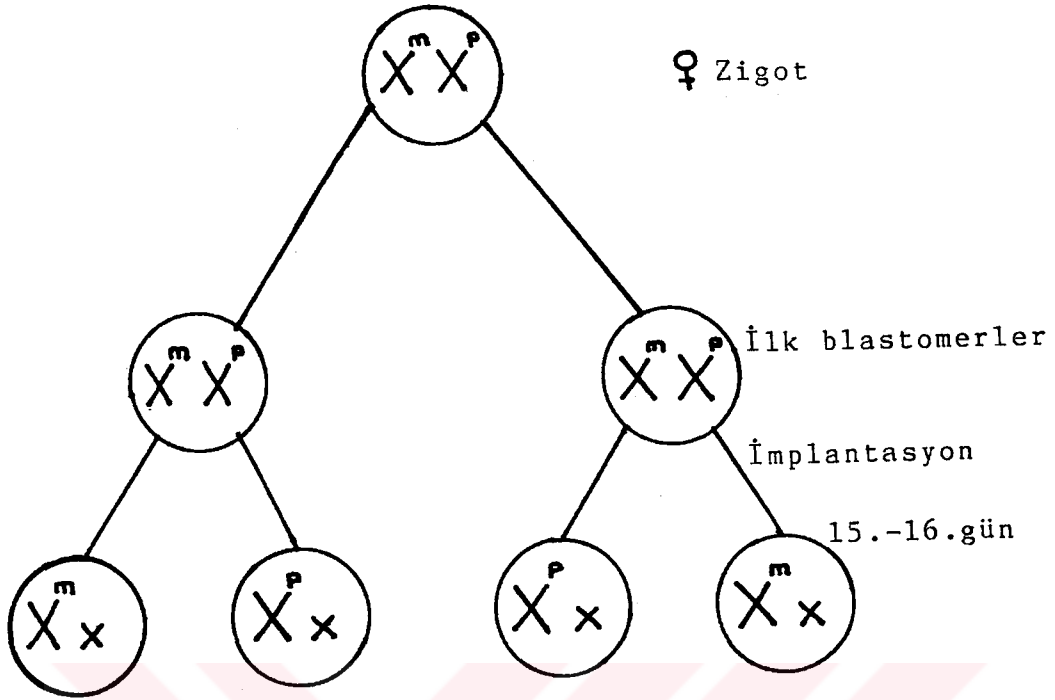
Lyonizasyon daha geniş olarak şöyle açıklanmaktadır:

Normal dişinin (Redüksiyon bölünmesine uğramış olgun ovum hariç) bütün vücut hücrelerinde, iki tane X kromozomu bulunur. Bu X ler şekil, büyüklük bakımından denk ve eş kromozomlardır. Bunların biri ovumla anneden, öteki spermiumla babadan gelmektedir. Döllenen sonra, normal mitoz bölünmeleri ile yavru hücrelere (Blastomer) geçmektedirler. Bu ana

kadar, her iki X kromozomu üzerindeki genler belli görevleri yerine getirmektedirler. Embriyonel hayatın aşağı yukarı on-beşinci ve onaltıncı gününde, blastomer sayısı 32 olduğu zaman X lerden biri inaktifleşir ve bu inaktifleşmenin geriye dönüşümü yoktur. Aktivitesini yitirmiş X kromozomu heteropiknotik nitelik kazanmakta ve bu heterokromatik X, somatik hücrelerde görülen X kromatinine dönüşmektedir. X kromatini, embriyonel hayatın başlarında görülmeyip, ancak ikinci haftanın sonlarına doğru görülmektedir(7,21,25).

X kromozomlarından birinin inaktif olması rastgeledir. Ve bu inaktif X kromozomunun yavru hücrelere geçişi de rastgele olmaktadır. Fakat belli bir hücrede örneğin, X<sub>p</sub> inaktif olmuşsa, ondan meydana gelecek tüm yavru hücreler aynı inaktif kromozomu taşıyacaklardır. Bir kısım hücrelerde anneden gelen, bir kısım hücrelerde de babadan gelen X kromozomlarının inaktif olması nedeniyle normal kadın mozaiktir(21,25) (Şekil 1).

Geç replikasyon, yoğunlaşma, çekirdek zarına yakın yerleşim ve DNA metilleşmesi değişiklikleri, inaktif X kromozomunun özelliklerinden sayılmaktadır. X kromozomunun tümünün mü inaktif olduğu, yoksa belli gen lokuslarının mı görev yapmadığı uzun yıllardan beri tartışılmaktadır. X kromozomunun büyük ölçüde inaktif olduğu sanılmaktadır(1,13,25). Bir görüşe göre; X kromozomunun sentromere yakın uzun kolunda "X kromatin kondanzasyon merkezi" bulunmaktadır. Kondanzasyon, yani genetik inaktivasyon buradan başlayıp yayılmaktadır (Therman ve ark., 1974). Fakat bazı genlerin inaktivasyona uğramadıkları anlaşılmıştır. Özellikle X kromozomunun kısa kolundaki bazı lokuslar lyonize edilmemektedir. Polani'ye göre (1982) buraları erkek mayozunda Y kromozomu ile eşleşebilen kesimlerdir(25).



Şekil 1- Lyon Hipotezi: Zigotta normal ya da aktif 2X kromozomu vardır. Bu X lerin biri anneden ( $X^m$ ), öteki babadan ( $X^p$ ) gelmiştir. Mitoz bölünme ile normal olarak yavru hücelere geçerler. implantasyondan sonraki günlerde (15.-16.embriyonel gün) X lerden biri inaktif olur (Alt sıradaki büyük X ler). Somatik hücelerdeki X kromatini inaktifleşen X kromozomu tarafından meydana gelir. İnaktif X kromozomları yavru hücelere, olasılık ilkelerine uygun olarak geçer. Bir hücrede  $X^m$ , diğerinde  $X^p$  inaktif olarak bulunabilir(25).

Normal dişilerin, oogonia ve primer oositlerinde (ana germ hüceleri) 2X kromozomu bulunmasına rağmen, X kromatini seçilmemektedir (Ohno ve ark., 1960). Bu da oogeneze giden hücelerin X kromozomlarının, normal aktivitelerini sürdürdüğünü göstermektedir(7,25).

Lyon hipotezini destekleyen deneysel olarak elde edilmiş sitogenetik ve genetik bulgular vardır:

a) Sitogenetik Bulgular

Dişi hücelerdeki 2X kromozomundan biri geç replike olarak X kromatinini meydana getirmektedir. Bu geç replike

olan X kromozomu genetik olarak inaktivasyona uğramaktadır. Her hücrede, ya anneden ya da babadan gelen X kromozomu inaktif olmaktadır. At ile epeğin hibridi olan katırda, otoradyografik çalışmalarla bu olay deneysel olarak gösterilmiştir. At ve epeğin X kromozomları morfolojik olarak farklı olduğu için, katırda birbirinden farklı 2X kromozomu bulunmaktadır. Katırda biri daha metasentrik olan bu 2X kromozomun biri anneden diğeri de babadan gelmiştir. Bu kromozomlar, H<sup>3</sup> Timidin ile işaretlenmiştir. İşaretlenme sonucunda Lyon hipotezine göre yalnız bir X kromozomu geç replike olacağından, belli bir anda belli bir hücrede yalnız bir X kromozomu işaretlenecek, diğesinde işaret olmayacaktır. Ve bir hücrede anneden, diğesinde babadan gelen X kromozomu işaret almış olacaktır.

Deneyin sonucunda; hücrelerin yaklaşık yarısında anneden, diğeri yarısında ise babadan gelen X kromozomunun işaret aldığı görülmüştür(28).

b) Genetik Bulgular :

Bu bulgular Beutler'in glukoz-6-fosfatdehidrogenaz (G-6-PD) enzimi için, heterozigot olan kadınlarda yaptığı deneylerden elde edilmiştir. Heterozigot olan bir kadının eritrositleri, histokimyasal metodlarla boyandığında G-6-PD enzimi pozitif ve G-6-PD enzimi negatif olan iki tip hücre popülasyonu görülmüştür. Hücrelerden bazılarında mutant geni taşıyan X kromozomu inaktiftir. Bu nedenle, bu hücre enzim eksikliği göstermeyip, boya almaktadır. Oysa diğeri bir hücrede normal geni taşıyan X kromozomu inaktif olacaktır. Fakat mutant geni taşıyan X kromozomu aktif olduğundan, bu hücrede enzim eksikliği görülmekte ve boya almamaktadır(13,28).

Lyon hipotezinin aleyhinde de bazı bulgular vardır. Bu bulgular şöyle özetlenmektedir:

a) Normal kadında 2X den biri inaktif hale gelir ve tek X kromozomu fonksiyonel halde kalır. Turner (XO) vakalarında tek bir fonksiyonel X kromozomu olacağından bu vakaların fenotiplerinin normal olması gerekirdi, oysa Turner sendromlu hastalar belirli fenotipik özellikler göstermektedirler.

b) X kromozomunun birden fazla olduğu halde bunlardan biri hariç, diğerleri inaktif hale geleceğinden XXX ve XXXX karyotipindeki kişilerin normal olmaları beklenirdi. Fakat X kromozomunun sayısının artması, kişide buna paralel olarak artan anomalilere sebep olmaktadır. Aynı şekilde XXY (Klinefelter sendromu) vakaları da normal XY erkeklerden klinik olarak farklıdır. Bu fark XXXY gibi X kromozomunun sayısının arttığı Klinefelter vakalarında daha da belirgin olmaktadır.

Aleyhdeki bu bulgular, kısmen teorik olarak şöyle izah edilmektedir:

a) Normal gelişme için iki adet X kromozomu gerekmektedir. Normal insanda biri inaktif oluncaya kadar embriyoda 2X kromozomu da aktif olup, normal gelişmeyi sağlamaktadır. İnaktivasyon embriyonik hayatın 15-16.günlerinde tamamlanmaktadır. Oysa Turner vakalarında (XO), 2.X kromozomu embriyoda ilk günden itibaren yoktur.

b) X kromozomunun inaktivasyonunun tam olmaması yani heterokromatik X kromozomunun bir kısmı inaktive olup, ufak bir kısmının ise genetik olarak aktif kalması bir izah tarzı olarak ileri sürülmüştür.

Bazı dokularda ise, önceden inaktive olmuş X kromozomunun yeniden aktive olduğu ileri sürülmüştür. Fakat bu izah tarzı bugün için mümkün görülmemektedir ve buna ait hiç bir deneysel bulgu yoktur(28).

Sonuç olarak Lyon hipotezinin önemi ve gereği şöyle özetlenebilir: Dişide 2X kromozomu ve bu kromozomlar üzerinde genler (X'e bağlı genler) vardır. Bu genlerin bir kısmı yapısal, bir kısmı işlevsel proteinleri sentezlemektedir. Erkeklerde ise tek X kromozom bulunmaktadır. Fakat dişide hiç bir zaman X'e bağlı genlerin kararlaştırdığı yapısal ve işlevsel elementler yönünden, tek X kromozomlu erkeğin iki katı değildir.

### X Kromatininin Normal Sıklığı

Dişilerin bir çok dokusunun interfaz hücre çekirdekleri, X kromatininin incelenmesinde elverişlidir.

Yanak mukozası yaymalarında, vajinal yaymalarda, kan yaymalarında, fikse edilmiş doku kesitlerinde, saç kökleri hücrelerinde, amniyotik zarlarda X kromatini görülebilir(9, 23).

Her dişide somatik hücrede X kromatini görülmesine rağmen, görülme oranları dokudan dokuya büyük farklılıklar göstermektedir. Yanak mukozasından elde edilmiş preparatlarda bu oran Barr tarafından % 25-30 olarak bildirilmiştir(9). 1956 yılında A.D.Dixon ve J.B.D.Torr tarafından % 30-50, 1959 yılında H.R.Guard tarafından % 41-69, 1964 yılında Grob ve Kupperman tarafından % 10-65, De Beer tarafından ise % 5-80 arasında bulunmuştur(5,12,18).

Oysa sinir hücrelerinden yapılan histolojik preparatlarda % 85, amniyotik zarlarda % 95 gibi yüksek X kromatin değerleri elde edilmiştir(2,23,25,28). Kültürlerdeki fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde X kromatin sıklığı düşük bulunmuştur(1,25). Ayrıca Malign tümör hücrelerinde de X kromatin oranının düşük olduğu gösterilmiştir(18).

Gebe kadınlarda doğumdan hemen önce ve sonra sıklık değişebilmektedir (Taylor, 1963). Yeni doğan kız bebeklerde

de X kromatin oranı düşük bulunmuştur (% 4-10). Fakat onuncu günden itibaren normal değerlere ulaşmaktadır. X kromatin oranının, kadının yaşlanması ile de düştüğü ileri sürülmektedir (Jacobs ve ark., 1963).

Platt ve Kailin (1964) genel psikolojik durumla, X kromatinleri arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kansere merkezlerine yatan kadınlarda X kromatin oranı düşük bulunmuştur. Yine tedavi amacıyla östrojen, testosteron, progesteron, yüksek kortizon ve ACTH alan hastalar düşük X kromatin sıklığı göstermişlerdir. Ayrıca kongenital sürrenal hiperplazi ve hipotroidi olgularında X kromatini oranının normalden düşük olduğu bildirilmiştir(1,2,25,27,28,29).

Yapılan bir çalışmada, bazı kimyasal ajanların (plastikler, böcek ilacı kalıntıları, deterjanlar, klorlu beyazlatıcılar, amonyak, dizel yağı, gaz ve basit sobaların yanma artıkları) sebep olduğu allerjik ve toksik reaksiyon gösteren bir grup kadında X kromatin oranının düşük olduğu bulunmuştur(18,26).

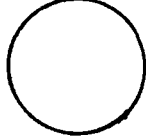
### X Kromatinindeki Sayısal Farklılıklar

Herhangi bir hücrede bulunan X kromatini sayısı, o hücredeki X kromozomu sayısı ile direkt olarak ilişkilidir. XY, XO, XYY bireyleri, X kromatinine sahip değildirler (Negatif kromatin)(22). XX, XXY ve XYY bireyleri, tek X kromatinine sahiptirler. XXX, XXXY ve XXXYY bireylerinde 2, XXXX ve XXXXY bireylerinde ise 3 tane X kromatini bulunur (Şekil 1). Bu gözlemler X kromatininin sayı düzensizlikleri ve  $n-1$  denkleminin temelini teşkil eder. Diploid hücrelerdeki X kromatinlerinin sayısı, o hücrede bulunan X kromozomları sayısının bir eksigidir ve  $B=n-1$  formülü ile gösterilip "n-1 kuralı" olarak bilinir(1,2,8,13,21,24,25,28).



Formülde:

B, X kromatin sayısını (Barr cisimciği, seks kromatini), n ise diploid hücrelerdeki X kromozom sayısını göstermektedir.



- 45, XO (Turner sendromu, kadın)
- 46, XY (Normal erkek)
- 47, XYY (YY sendromlu erkek)



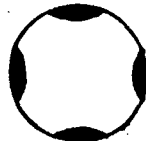
- 46, XX (Normal kadın)
- 47, XXY (Klinefelter sendromu, erkek)



- 47, XXX (Triple X sendromu, kadın)
- 48, XXXY (Triple X-Y sendromu, erkek)



- 48, XXXX (Tetra X sendromu, kadın)
- 49, XXXXY (Tetra X-Y sendromu, erkek)



- 49, XXXXX (Penta X sendromu, kadın)

Şekil 2- X kromatini ile X kromozomu arasındaki ilişki(2).

Birden fazla X kromozomu olduğunda, fazla X kromozomları ayrı seks kromatin cisimleri olarak görülmektedir. Daha sonraki araştırmalar sonucunda, otozomların seks kromatinlerinin saptanmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Harnden (1961), poliploid hücrelerdeki X kromatini sayısına otozomlarında etkisini göstermek amacıyla n-1 kuralının değiştirilmiş

bir şeklini sunmuştur. Buna göre;  $B = X - \frac{P}{2}$  dir. Buradaki B simgesi yine X kromatini sayısını, X simgesi hücrede bulunan X kromozomları sayısını ve P simgesi de hücrenin ploidi derecesini göstermektedir(1,2,26).

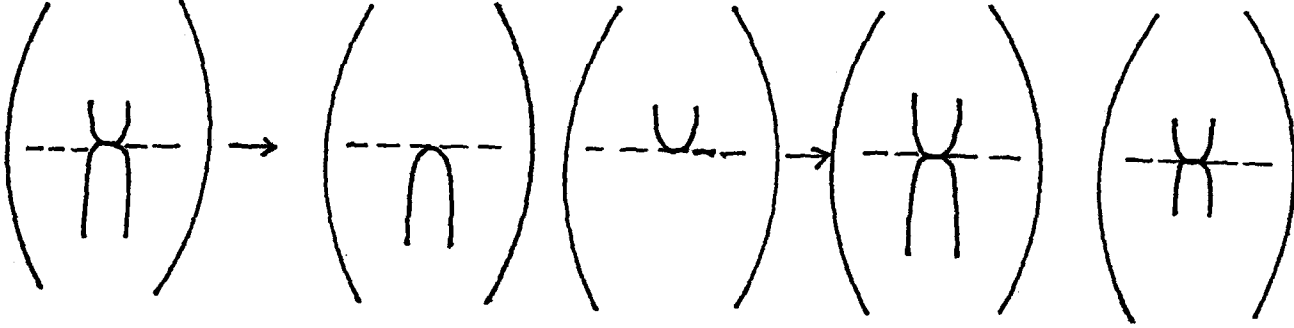
Seks kromatin sıklığının oranı, X kromozomunun kısa kol izokromozomu olduğu hallerde düşmektedir. Bunun yanında, oranın yüksek bulunması karyotipte 2 den fazla X kromozomu olabileceğini veya uzun kol izokromozomu olasılıklarını akla getirmelidir(25).

X kromatin sayısının normalden sapmasına neden olan durumlardan birisi de organizmanın mozaik olmasıdır. Yani kromozom yapıları değişik birden çok hücre gruplarından oluşan organizmalardaki X kromatin sayısı 0 ile normal değerler arasında bulunmaktadır. Örneğin XX ve XO hücreleri birlikte taşıyan mozaik Turner olgularında, X kromatin sayısı normalden daha az çıkmaktadır (% 10-15 gibi)(2,28,31).

#### **X Kromatininin Büyüklüğündeki Farklılıklar**

X kromatininin normalden büyük ya da küçük görünmesi, X kromozomlarında yapısal bir anomalinin bulunduğunu göstermiştir. Yapısal anomali gösteren X kromozomları diğerlerinden daha geç DNA sentezinde bulunurlar. Bu geç replike olan X kromozomu, hücredeki X kromatinini oluşturur. Örneğin normalden daha küçük görünen X kromatini, X kromozomunda bir eksilme (46, XXq-ya da 46, XXp-), bir kısa kol izokromozomu (46, XXpi) ya da bir ring kromozomu (46, XXr) olduğunu gösterir. Buna karşılık, normalden daha büyük görünen X kromatini ise, X kromozomundaki bir artma ya da uzun kol izokromozomunu gösterir(1,2,8,25,28) (Şekil 3).

Sentromerin hatalı bölünmesi



İzokromozom oluşumu



Normal X kromatini (46, XX)

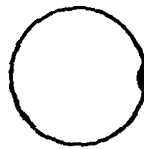


Normalden büyük X kromatini

46, X, i(Xq)

46, XX, Xq<sup>+</sup>

46, XX, Xp<sup>+</sup>



Normalden küçük X kromatini

46, X, del (Xp)

46, X, del (Xq)

46, X, r (X)

46, X, i (Xp)

Şekil 3- X kromatini büyüklüğü ile X kromozomunun yapısal düzensizliği arasındaki ilişki

Bazı antibiyotiklerin (chloramphenicol ve benzyl penisilin), X kromozomunun replikasyonunun inhibisyonuna bağlı olarak X kromatininin büyüklüğünü azaltabildiği bildirilmiştir(1).

### Genel Popülasyonda Anormal Seks Kromatin Bulguları

Doğuştan seks kromatin anomalilerinin sıklığı; Kanada (Moore, 1959), İsviçre (Bergaman, 1961) ve İskoçya'da (Maclean ve ark., 1961) araştırılmıştır. Bu incelemeler yeni doğan 8600 erkek ve 6600 dişinin nukleer seksini kapsamaktadır. Bunlarda kromatin pozitif erkek bebekler 1000 doğumda 2.65, kromatin negatif dişi bebekler 0.3 kadardır. Dişi bebeklerde 2X kromatini bulunma sıklığı, 1000 doğumda 1.33 olarak hesaplanmıştır (Maclean ve ark., 1961). Bombay'da 2058 erkekte ve 1832 dişi yeni doğan çocukta, gerçek seks ve seks kromatin bulguları arasında bir ayrıcalık bulunmamıştır (Subray ve Prabhaker, 1962). İsviçre'de (Wiesli, 1962), 1563 yeni doğan erkek bebek arasında bir tane X kromatini olan erkek bebek bulmuştur. Bu bebekte, anencephalik bir bebektir. 1466 yeni doğan dişi bebekte ise anormallik olmadığı gözlenmiştir(1, 25).

### Mental Özürlülerde X Kromatin Bulguları

Zekaca yetersiz bireyler arasında kromatin negatif dişiler binde 0.5, zekaca yetersiz erkekler içinde kromatin pozitif kişilerin oranı binde 10 kadar bulunmuştur(1,25). Yine zekaca yetersiz dişilerde yapılan bir çalışmada da, iki kromatinli dişilerin oranı binde 4.2, başka bir çalışmada binde 7 olarak bulunmuştur(1). Finlandiya'da de la Chapella ve Hortling, 342 zihinsel bozukluğu olan erkek okul öğrencisinde pozitif kromatin oranını 0.88 bulmuşlardır(1).

### Seks Kromatininin Klinikte Uygulanması

Seks kromatini klinikte eskiden beri çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Örneğin, cinsiyet fizyolojisi bozukluklarında tarama testi olarak seks kromatin araştırmasına başvurulmaktadır(25). Ayrıca bantlama olmaksızın, rutin boyanan karyotiplerin değerlendirilmesinde de, seks kromatini yararlı ola-

bilir. Örneğin X kromozomunun morfolojisi, C grubu kromozomlarından 6 ve 7 numaralı kromozomlara çok benzemektedir. Bir hücrede, C grubunda bir fazla kromozom bulunduğunda bunun X kromozomu mu, yoksa C grubundan başka bir kromozom mu olduğunu anlamada seks kromatin tayini yararlı olmaktadır(28).

Yine 1960 ve 1970'li yılların başında seks kromatin tayini ile doğacak çocuğun cinsiyetini önceden saptamak için çalışmalar yapılmıştır(1). Amniyosentez yolu ile, bazı kalıtsal hastalıklarda hem cinsiyeti anlamak, hem de hastalığı beklenen çocuğun erkek ise abortusu için endikasyon sağlamak amacıyla X kromatin yöntemi uygulanmıştır (Riis ve Fuchs, 1960; hemofili taşıyıcısı bir kadının hemofilik erkek çocuğu doğurma riski yüksek olduğundan düşürme izni alabilmek için, fetusun amniyon sıvısı hücrelerinde X kromatini aramışlardır)(25).

Seks kromatin testi bazı hücrelerin tanınması için kullanılmıştır. Örneğin, homolog deri transplantasyonlarında veya kemik iliği transplantasyonlarında, alıcı ve vericiyi ayrı cinslerden seçip daha sonra alıcıdaki transplant materyalinde cinsiyet kromatini tayin ederek, transplantasyonun başarılı olup olmadığı hakkında bilgi edinilmiştir(1,25,28).

Primer cinsiyet oranının saptanmasında, spontan düşük materyalinde cinsiyet tayininde de X kromatini kullanılmıştır(25,28).

Seks kromatininin tayini, Adli Tıpta da çok önemlidir. Saç, kıl gibi doku parçalarında seks kromatin oranı araştırılarak cinsiyet tayini yapılmaktadır(1,6).

Bugün için en çok X kromozomunun sayısal anomalilerinin saptanmasında tarama testi olarak veya dokusal mosaisizmi göstermede ön test olarak kullanılmaktadır. Cinsiyet anomalilerinde genellikle kuşkulu genital durumunda ise asla kullanılmamalıdır.

Literatürde bildirilen ve yapılan çalışmalarda kullanılmış olan X kromatini boyama metodları şunlardır:

Guard boyama metodu(2,10,12,19,26), Hematoxylin-Eozin boyama metodu(4,19), Papanicolaou boyama metodu(4,10), Feulgen boyama metodu(19,23), Thionin boyama metodu (Klinger-Ludwig)(19, 23,26), Crsyl-Violet (Moore-Barr)(1,2,5,9,23), Carbol Fuchsin boyama metodu (Eskelund 1956, Barr 1965)(2,19,23), Aceto-Orcein boyama metodu(19,26), Giemza boyama metodu(9), Pinacyanol boyama metodu(14).

Çalışmamızda ilk dört boyama metodu kullanılmıştır.



## MATERYEL VE METOD

Çalışmamızda, sekonder seks karakterleri gelişmiş ve en az dört yıldır menstruasyon gören 30 normal dişinin yanak mukozalarından alınan epitel yaymaları kullanıldı. Kontrol olarak 10 normal erkekte de X kromatini boyaması uygulandı.

Yanak mukozası yaymaları alınmadan önce, kişinin ağız iyice çalkalatılarak, besin artıklarının giderilmesi sağlandı. Daha sonra tahta bir spatül yardımıyla, sağ ve sol yanağın iç yüzeyinden alınan yaymalar, iyice temizlenmiş lamlar üzerine ince bir şekilde yayıldı. Yanak mukozasından yaymalar alınırken, yanağın iç yüzeyi sıkıca fakat hafif hafif kazınarak, derin epiteliyal tabakalar elde edildi. Alınan materyel temiz lamlar üzerine yayıldıktan hemen sonra, kurumadan içerisinde % 96 ethanol bulunan 100 ml'lik şale içinde tespit edildi. Yanak mukozası yaymaları % 96 ethanol içerisinde en az 30 dakika, en fazla 48 saat bırakıldı.

Otuz dişiden alınan yanak mukoza yaymalarında, her bir kişiye ait olan preparatlarda dört ayrı boyama tekniği uygulandı. Sonuçta elde edilen değerler karşılaştırıldı. Her dişinin yayma preparatında buruşma veya herhangi bir hasar belirtisi olmayan, üstüste gelmemiş, nükleer bünyeye sahip 100 ağız epitel hücresi sayıldı. Bu hücrelerin piknotik olmayan, düzgün zarlı nükleusları incelenerek, sadece periferik kitleye sahip olan nükleuslar, X kromatini açısından pozitif olarak değerlendirildi. Kromatin pozitifliği yüzde değer olarak belirlendi.

Uygulanan boyama teknikleri şunlardır:

- 1- Guard boyama tekniği(2,10,12,19,26).
- 2- Hematoxylin-Eozin tekniği(4,19).
- 3- Papanicolaou boyama tekniği(4,10).
- 4- Feulgen boyama tekniği(19,23).

Literatürde kullanılan başka boya yöntemleri bulunmakla beraber, denediğimiz ve çalışmalarımızda esas olarak kabul ettiğimiz bu dört boyama yöntemini seçmemizdeki neden; yapılan çalışmalarda en çok kullanılan, sonuçlarından olumlu olarak söz edilen boyama teknikleri olmasıdır. Ayrıca kullanılan maddelerin ucuz olması ve kolay sağlanması da, tercih etmemizde rol oynamıştır.

#### 1- GUARD BOYAMA TEKNIĞİ:

Solüsyonlar:

##### 1- Biebrich scarlet solüsyonu:

Biebrich scarlet	1.0 gr
Phoshotungstic acid	0.3 gr
Glacial acetic acid	5 ml
% 50 etil alkol	100 ml

Hazırlanışı:

Hassas terazide tartılan 0.3 gr phoshotungstic acid ve 1 gr Biebrich scarlet maddeleri bir erlen içinde % 50'lik 100 ml etil alkolde çözüldü. Üzerine 5 ml Glacial acetic acid ilave edildi.



2- Fast Green FCF solüsyonu:

Fast green FCF	0.5 gr
Phosphomolybdic acid	0.3 gr
Phosphotungstic acid	0.3 gr
Glacial acetic acid	5.0 ml
% 50 etil alkol	100 ml

Hazırlanışı:

Hassas terazide tartılan 0.5 gr Fast green FCF, 0.3 gr Phosphomolybdic acid ve 0.3 gr Phosphotungstic acid, bir erlen içine konarak % 50'lik 100 ml etil alkol içerisinde çözüldü. İçerisine 5 ml Glacial acetic acid ilave edildi.

Teknik:

- 1- % 96 alkolde fiksasyondan sonra, % 70 alkolde lam- lar 2 dakika bekletildi.
- 2- Biebrich scarlet solüsyonunda 15 dakika boyandı
- 3- % 50 alkolde iyice çalkalandı.
- 4- 1-4 saat süre ile Fast green FCF solüsyonunda bıra- kıldı (Bir gece bırakılması ile daha iyi sonuç alındığı görüldü).
- 5- % 50 alkolde çalkalandı.
- 6- % 70, % 95 alkollerin her birinde 2 dakika dehidre edildi.
- 7- Her birinde 2 dakika bekletilmek suretiyle, 3 kez ayrı ksilolde bırakıldı.
- 8- Kanada balsam kapatma maddesi kullanılarak, yayma- ların üzeri lamelle kapatıldı.

## 2- HEMATOXYLIN-EOZİN BOYAMA TEKNİĞİ

### Solüsyonlar:

#### 1- Harris Hematoxylin Boyası:

% 10 absolü alkolde hematoxylin	5 ml
Mercuric oxide (civa oksid)	0.25 gr
% 10 sulu potasyum alum (Şap)	100 ml
Glacial acetic asid	4 ml

### Hazırlanışı:

10 gr Hematoxylin, bir erlen içerisinde, 100 ml absolü alkolde ısıtılarak çözüldü. Daha sonra, Hematoxylin solüsyonundan 5 ml alınıp, % 10 luk 100 ml potasyum alum solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışım tekrar hızlı bir şekilde kaynatıldı ve alev üzerinden çekildikten sonra, üzerine yavaş yavaş 0.25 gr Mercuric oxide ilave edildi. Solüsyon, koyu menekşe rengini alır almaz, boya solüsyonunun bulunduğu kap, içinde soğuk su bulunan bir kap içerisine konup, soğutuldu. Üzerine, % 4'lük acetic acidten 4 ml ilave edildi.

#### 2- Eozin solüsyonu:

Eozin % 3 sudaki solüsyonu	100 ml
Alkol % 70	125 ml
Distile su	375 ml

### Hazırlanışı:

Eozin boyasından 3 gr tartılarak, bir erlen içinde 100 ml distile suda çözüldü. Daha sonra, % 70'lik alkolden 125 ml çalkalayarak ilave edildi. 375 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı.

3- Asit alkol:

% 70 alkol	100 ml
HCL (Saf)	1 ml

Hazırlanışı:

% 70 derecelik alkolden, 100 ml alınarak, üzerine 1 ml saf HCL asit ilave edildi.

Teknik:

- 1- Yanak mukozasının bulunduğu lamlar, tespit işlemin- den sonra, distile suda yıkandı.
- 2- Harris hemotoxylin de 5-15 dakika boyandı.
- 3- Akarsu altında yıkandı.
- 4- Asit alkolde birkaç saniye farklılaştırıldı.
- 5- Tekrar akarsuda yıkandı
- 6- Eozin ile 10-60 saniye kadar boyandı ve tekrar suda yıkandı.
- 7- % 95 alkolde ve asetonda hızla dehidre edildi.
- 8- İki defa 2 ayrı ksilolden geçirildi.
- 9- Kanada balsamı ile lamelle kapatıldı.

3- PAPANICOLAOU BOYAMA TEKNİĞİ

Solüsyonlar:

1- Harris Hematoxylin solüsyonu (2. Metoda anlatıldığı gibi hazırlanmaktadır).

2- Orange G 6

Art.6888 Papanicolaous lösung 2 a

Orange G-Lösung (OG 6) (Merck)

100 ml

3- E<sub>A</sub> 65

Papanicolaous Lösung 3 c (Merck)

100 ml

Teknik:

- 1- % 96 alkolden alınan lamalar, sırasıyla % 80, % 70 ve % 50 alkol serilerinden iyice çalkalanarak geçirildi.
- 2- Lamalar distile suda iyice yıkandı (Ortalama 15 kez daldırılıp çıkartıldı).
- 3- Hematoxylin boyasında 2-3 dakika boyandı (Bu süre Hemotoxylin boyasının yeniliğine göre ayarlandı. Boya eski olduğu zaman daha kısa tutuldu.)
- 4- Çeşme suyunda 6 dakika yıkandı.
- 5- % 50, % 70, % 80 ve % 96 alkol serilerinden geçirildi
- 6- Orange G<sub>6</sub> solüsyonunda 3 dakika boyandı.
- 7- İki ayrı % 96 alkolde iyice çalkalandı.
- 8- E<sub>A</sub> 65 solüsyonunda 2 dakika bırakıldı.
- 9- Üç kez 3 ayrı % 96 alkolde çalkalandı.
- 10- Üç kez 3 ayrı asetondan geçirildi.
- 11- Dört ayrı ksilolde 2 şer dakika bekletildi ve kanda balsamı ile kapatıldı.

#### 4- FEULGEN BOYAMA TEKNİĞİ

Solüsyonlar:

1- Schiff solüsyonunun hazırlanışı:

1 gr Basic fuchsin 200 cc distile su içersine konup, karıştırılarak kaynatıldı (5 dakika kaynatmak yeterlidir). 50°C ye kadar soğutulup, süzüldü. 20 cc N-HCL ilave edildi. 25°C ye kadar soğutuldu ve 1 gr Sodyum bisülfid ilave edildi. Ağzı kapalı olarak, 24-48 saat karanlıkta, oda ısısında bekletildi. Önceden pembe olan solüsyonun rengi, karanlıkta bekletildiği süre içinde soğan kabuğu rengine döndü. Daha sonra, 2 gr aktif kömür konup, 1 dakika karıştırıldıktan sonra, süzüldü. Solüsyonun rengi beyaz oldu.

2- N-HCL

Konsantre HCL	8.3 ml
Distile su	91.6 ml

3- 5 N-HCL

Konsantre HCL	41.6 ml
Distile su	58.4 ml

4- Yıkama solüsyonunun hazırlanışı:

% 10 Sodyum bisülfid (veya Sodyum metabisülfid)	10 ml
1 N HCL	10 ml
200 ml distile su ile tamamlandı.	

Bu teknikte, yayma preparatların fiksasyonunda Davidson fiksatifini kullanıldı.

Davidson Fiksatifini:

Formalin (% 40 formaldehide)	20 ml
% 95 alkol	35 ml
Glacial acetic acid	10 ml
Distile su	35 ml

Hazırlanışı:

Bir dereceli kaba, 20 ml formalin alındı. Üzerine, % 95'lik alkolden 35 ml ilave edildi. Daha sonra, 10 ml Glacial acetic acide eklendi. En son olarak, 35 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı.

5- Light Green Solüsyonu:

Light green	1 gr
Distile su	100 ml

Hazırlanışı:

1 gr Light green tartılarak, bir erlen içinde, 100 ml distile su ile, yavaş yavaş çalkalamak suretiyle çözündü.

Teknik:

- 1- Yayma preparatları 20 dakika fiksatifte bekletildikten sonra, distile su ile çalkalandı.
- 2- 5 N HCL de, oda ısısında 20 dakika bekletildi.
- 3- Lamalar distile suda 3 dakika yıkandı.
- 4- Schiff solüsyonunda, oda ısısında 1,5 saat karanlıkta bekletildi.
- 5- Yıkama solüsyonunda 5 dakika bırakıldı.
- 6- Çeşme suyunda 15 dakika yıkandı.
- 7- Light green ile 1-2 saniye boyandı (Zıt boya).
- 8- Çeşme suyunda yıkandıktan sonra % 70, % 80 ve % 96 alkol serilerinden geçirildi.
- 9- Üç ayrı ksilolde, 5 dakika bekletildi. Kanada balsamı ile lamelle kapatıldı.

Sonuçların analizinde, Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi, istatistiksel yöntem olarak kullanıldı.

## B U L G U L A R

Tablo 1'de 30 normal dişiden alınan yanak mukozası yaymalarında dört ayrı boyama metodunun uygulanması ile elde edilen X kromatini sonuçları görölmektedir.

TABLO 1  
Dört Boyama Metodu İle Otuz Normal Dişide  
Kromatin Pozitiflik Yüzdeleri

Kişi	Guard (%)	Pananicolaou (%)	Feulgen (%)	Hematoxylin-Eozin (%)
1	25	35	30	29
2	26	22	25	30
3	22	35	24	28
4	20	24	30	18
5	20	18	25	19
6	32	29	27	29
7	28	23	26	22
8	35	36	24	20
9	22	22	22	20
10	24	30	30	23
11	26	38	30	25
12	28	26	25	20
13	18	26	28	20
14	28	28	28	23
15	22	33	24	22
16	29	25	25	22
17	20	26	23	22
18	38	28	26	23
19	30	36	28	21
20	25	35	30	20
21	19	25	22	28
22	21	32	23	20
23	24	30	25	22
24	25	38	27	19
25	28	25	25	24
26	22	20	20	25
27	24	20	15	20
28	25	18	25	10
29	20	40	22	17
30	31	24	27	38

Tablo 2'de her dört boyama metodu ile elde edilen en yüksek, en düşük ve medyan (ortanca) değerleri gösterilmiştir.

TABLO 2  
Dört Boyama Metoduna Göre  
X Kromatin Değerlerinin Dağılımı

	Guard (%)	Papanicolaou (%)	Feulgen (%)	Hematoxylin-Eozin	Ortalama 4 Yöntemin %
En düşük değer	18	18	15	10	15.2
En yüksek değer	38	40	30	38	36.5
Ortalama değer	25.2	28.2	25.3	22.6	25.3
Medyan (Ortanca)	25	26	25	22	

Guard boyama metodunu uyguladığımız 30 dışide; en düşük değer % 18, en yüksek değer % 38 idi. Tüm değerlerin ortalaması % 25.2 olup, medyan (ortanca) % 25 bulundu.

Papanicolaou boyama metodunu uyguladığımız aynı 30 dışide; en düşük değer % 18, en yüksek değer % 40 idi. Tüm değerlerin ortalaması (% 28.2) olup, medyan (ortanca) % 26 bulundu.

Feulgen boyama metodu ile; en düşük değer % 15, en yüksek değer % 30 idi. Tüm değerlerin ortalaması % 25.3 olup, medyan (ortanca) % 25 bulundu.

Aynı 30 dışide uyguladığımız Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile en düşük değer % 10, en yüksek değer % 38 idi. Tüm değerlerin ortalaması % 22.6 olup, medyan (ortanca) % 22 bulundu.



Burada görüldüğü gibi en yüksek X kromatin değeri % 40 ve en yüksek ortalama X kromatini değeri (% 28.2) Papanicolaou boyama metodu ile elde edilmiştir.

Feulgen ve Guard boyama metodları ile, ortalama X kromatini değeri birbirine çok yakın bulundu (Feulgen % 25.3, Guard % 25.2).

Dört boyama metodunu uyguladığımız 30 dışında, en düşük X kromatin değeri (% 10) ve en küçük ortalama X kromatin değeri (% 22.6) Hematoxylin-Eozin ile elde edildi.

Uyguladığımız farklı boyama metodlarına ait X kromatin yüzdelerinin kişi sayısına göre dağılımları ve farklılıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 3, 4 ve 5'de gösterilmiştir.

TABLO 3

Hematoxylin-Eozin ve Feulgen Metodlarına Ait X Kromatin Yüzdelerinin Kişi Sayısına Göre Dağılımı

Boyama Metodları	X Kromatin % si	Kişi Sayısı
Hematoxylin-Eozin	10	1
	17	1
	18	1
	19	2
	20	7
	21	1
	22	5
	23	3
	24	1
	25	2
	28	2
	29	2
	30	1
38	1	
Feulgen	15	1
	20	1
	22	3
	23	2
	24	3
	25	7
	26	2
	27	3
	28	3
30	5	

Burada görüldüğü gibi, Hematoxylin-Eozin ve Feulgen boyama metodları ile yapılan X kromatin sayımlarında, bu iki boyama metodu arasında farklılık vardır. Tablo 1 verileri kullanılarak, Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi uygulandığında, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $Z=2,365$   $p=0,009$ ). Feulgen boyama metodu, Hematoxylin-Eozin boyama metoduna göre daha yüksek sonuçlar vermektedir.

TABLO 4

Feulgen ve Guard Boyama Metodlarına Ait X Kromatin Yüzdelerinin Kişi Sayısına Göre Dağılımı

Boyama Metodları	X Kromatin % si	Kişi Sayısı
Feulgen	15	1
	20	1
	22	3
	23	2
	24	3
	25	7
	26	2
	27	3
	28	3
	30	5
Guard	18	1
	19	1
	20	4
	21	1
	22	4
	24	3
	25	4
	26	2
	28	4
	29	1
	30	1
	31	1
	32	1
35	1	
38	1	

Feulgen ve Guard boyama metodları ile yapılan X kromatin sayımlarında, bu iki boyama metodu arasında, Tablo 1 verileri kullanılarak, Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi uygulandığında anlamlı istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır ( $Z=0,391$   $p=0,348$ ).

TABLO 5

Guard ve Papanicolaou Boyama Metodlarına Ait X Kromatin Yüzdelerinin Kişi Sayısına Göre Dağılımı

Boyama Metodları	X Kromatin % si	Kişi Sayısı
Guard	18	1
	19	1
	20	4
	21	1
	22	4
	24	3
	25	4
	26	2
	28	4
	29	1
	30	1
	31	1
	32	1
	35	1
38	1	
Papanicolaou	18	2
	20	2
	22	2
	23	1
	24	2
	25	3
	26	3
	28	2
	29	1
	30	2
	32	1
	33	1
	35	3
	36	2
38	2	
40	1	

Guard ve Papanicolaou boyama metodları ile yapılan X kromatin sayımlarında, bu iki boyama metodu arasında, Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi sonuçlarına göre, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $Z=1,943$   $p=0,027$ ). Papanicolaou boyama metodu, Guard boyama metoduna göre daha yüksek X kromatin sonuçları vermektedir.

Tablo 6'da, toplam dört boyama metodu sonucunda elde edilen X kromatin yüzdelerinin kişilere göre dağılımı görülmektedir.

TABLO 6

Toplam Dört Boyama Metodu Sonucunda Elde Edilen  
X Kromatin Yüzdelerinin Kişilere Göre Dağılımı

BOYAMA METODLARI kişi	X Kromatin Yüzdesi			
	% 1-10	% 11-20	% 21-30	% 31-40
GUARD	-	6	20	4
PAPANICOLAOU	-	4	16	10
FEULGEN	-	2	28	-
HEMATOXYLIN-EOZİN	1	11	17	1

Guard, Papanicolaou ve Feulgen boyama metodlarında % 1-10 arasında X kromatin değeri saptanamamıştır. Hematoxylin-Eozin boyama metodunda ise yalnızca bir kişide % 1-10 arasında X kromatin değeri saptanmıştır. % 11-20 arasındaki X kromatin değerleri, Guard boyama metodunda 6 kişide, Papanicolaou boyama metodunda 4 kişide, Feulgen'de 2 kişide ve Hemotoksilin-Eozin boyama metodunda ise 11 kişide elde edilmiştir.

% 21-30 arasındaki X kromatin değerleri, Guard boyama metodu ile 20 kişide, Papanicolaou boyama metodu ile 16 kişide, Feulgen boyama ile 28 kişide, Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile ise; 17 kişide elde edilmiştir.

% 31-40 arasındaki X kromatin değerleri Guard boyama metodu ile 4 kişide, Papanicolaou boyama metodu ile 10 kişide görülmüştür. Feulgen boyama metodu ile % 31-40 arasında değer bulunamamıştır. Hematoxylin-Eozin boyama ile ise 1 kişide elde edilmiştir.

Çalışmamızda uyguladığımız dört boya metodu içinde, Papanicolaou metodunun pratikliği, X kromatininin gözlenmesindeki kolaylığı, en yüksek değeri (% 40) ve yine en yüksek

ortalama X kromatini değerini (% 28.2) vermesi nedeniyle, X kromatini için uygun boyama metodu olduğu kanısına varılmıştır. Bu nedenle, bu metodun sayımı yapan kişilere bağlı olabilecek hata oranını saptamak amacı ile, 10 normal erkek ve 10 normal dişiden alınan yanak mukozası yayma preparatları, birbirinden bağımsız 3 ayrı kişi tarafından analiz edildi (Tablo 7). Her 3 kişinin yaptığı tüm sayımlarda erkeklere ait yaymalarda X kromatini gözlenmediği halde, dişilerden alınan yanak mukoza yaymalarında % 23-47 arasında değişen X kromatin değerleri elde edilmiştir. Grldğu gibi dişilere ait yaymalarda 3 ayrı kişinin bulduğu değerler birbirine yakın bulunmuştur.

TABLO 7

Papanicolaou Boyama Metodu Sonucunda Normal 10 Dişi ve 10 Erkekten Alınan Yanak Mukoza Yaymalarında Bağımsız Olarak 3 Ayrı Kişi Tarafından Bulunan X Kromatin Değerleri

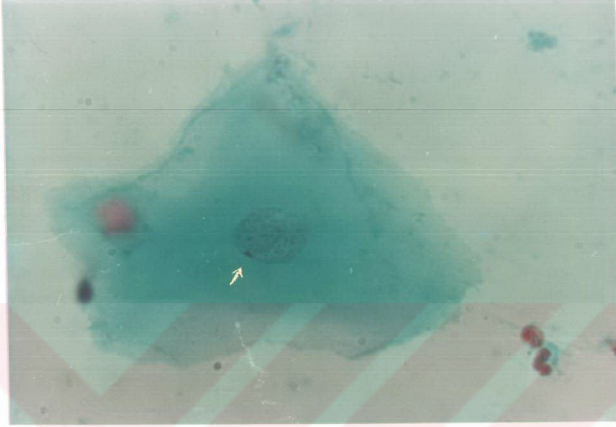
Kişi			
Erkek	1.Sayım	2.Sayım	3.Sayım
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
Dişi	1.Sayım	2.Sayım	3.Sayım
1	25	30	26
2	33	28	34
3	27	31	23
4	34	35	38
5	30	32	35
6	34	31	35
7	33	41	34
8	30	33	47
9	34	30	35
10	32	34	35

1. ve 2. sayım ile, 2. ve 3. sayımlarda elde edilen bulgular, Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (sırasıyla;  $T_1 = 19,5$  ve  $T_2 = 21,5$   $p > 0,05$ ).

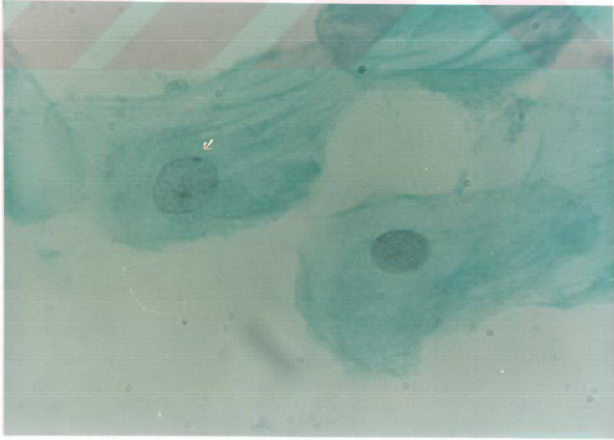


**RESİMLER**

Guard Boyama Metodu

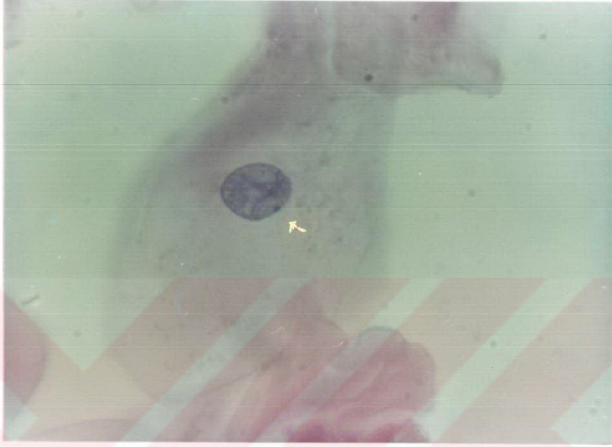


Resim 1- Yanak mukozası epitel hücresinde Guard boyama metodu ile boyanmış X kromatini, X1250

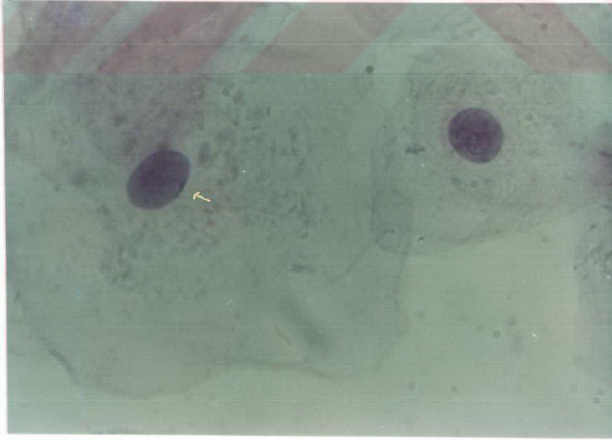


Resim 2- Yanak mukozası epitel hücrelerinde Guard boyama metodu ile boyanmış X kromatini ve X kromatini negatif çekirdek. X1250

Papanicolaou Boyama Metodu



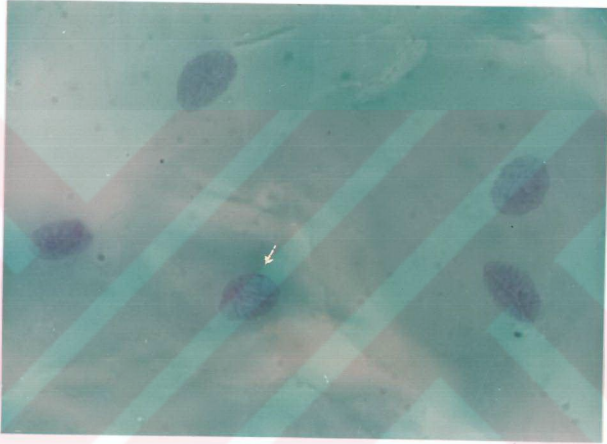
Resim 3- Yanak mukozası epitel hücresinde Papanicolaou boyama metodu ile boyanmış X kromatini. X1250



Resim 4- Yanak mukozası epitel hücrelerinde Papanicolaou boyama metodu ile boyanmış X kromatini ve X kromatini negatif çekirdek. X1250

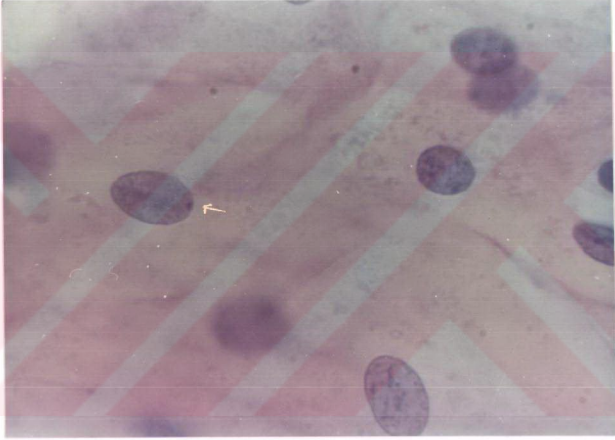


Feulgen Boyama Metodu



Resim 5- Yanak mukozası epitel hücrelerinde Feulgen boyama metodu ile boyanmış X kromatini ve X kromatini negatif çekirdekler.  
X1250

Hematoxylin-Eozin Boyama Metodu



Resim 6- Yanak mukozası epitel hücrelerinde Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile boyanmış X kromatini ve negatif çekirdekler. X1250

## TARTIŞMA

X kromatini (Barr cisimciği, seks kromatini); Barr ve Bertram tarafından interfaz nükleusunda özel kromatin kitlesi olarak tanımlanmıştır(9).

X kromatini ve intermitotik nükleuslardaki seksüel dimorfizmin Barr ve Bertram tarafından keşfi, genetik seksin belirlenmesinde yeni araştırma sahaları ortaya çıkarmıştır(12).

X kromatin testi ile, insanlarda genital organ anomalilerine yol açan kromozomal bozuklukların tanınmasının mümkün olabileceği düşünülerek ilk kez 1954 yılında Turner sendromlu hastalarda bu yöntem uygulanmış ve bunlarda normal dişilerin aksine X kromatini bulunmadığı görülmüştür. Bir yıl sonra, yanak mukozasından X kromatini elde etme yöntemi daha da geliştirilmiş ve Klinefelter sendromlu erkeklerin hücrelerinde, normal erkeklerin aksine bir adet X kromatini olduğu gösterilmiştir(28). Erkeklerde X kromatini yoktur. Fakat bazen çekirdek içindeki diğer kromatin materyallerinin yanlış yorumlanması sonucu, % 2-19'a kadar değerler bildirilmiştir(2, 16,18,24,25,28).

Normal olarak, dişilerin yanak mukozasından yapılan yayma preparatlarda, epitel hücrelerinin en az % 20'sinde X kromatini bulunmaktadır(28).

Teorik olarak her dokudan cinsiyet kromatini tayini yapılabilir ve hücrelerdeki görülme sıklığı % 20-100 arasında değişir. Cinsiyet kromatini her ne kadar bütün dişi somatik hücrelerinde bulunmakta ise de insan yanak mukozasından elde edilen epitel hücrelerinde 100 hücreden ortalama 20 kadarında görülmektedir. Bu durum hücre dinamiği ile ilgilidir. Bilindiği gibi X kromatini, DNA replikasyonu esnasında ve bir sonraki mitotik çoğalmadan hemen önce ortadan kaybolur(28). Sinir hücrelerinden yapılan histolojik preparatlarda % 85 gibi yüksek oranlar elde edilmektedir. Yenidoğan kız bebeklerde ilk birkaç gün % 4 gibi çok düşük X kromatin değerleri bildirilmiştir(28). Ayrıca sürrenal korteks hormonlarının örneğin androjenlerin aşırı salgılandığı konjenital sürrenal hiperplazi vakalarında veya hipotiroidide cinsiyet kromatini yüzdesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Hormonların belirtilen etkilerinin mekanizması iyi bilinmemektedir(2,28).

XO/XX hücre dizilerini birlikte taşıyan mozaik Turner olgularında, yaşlılarda ve kimyasal ajanlara maruz kalan dişilerde, X kromatin sayısının normalden düşük olduğu bildirilmiştir(2,18,25,26,28,31).

Barr, dişilerin yanak mukozasından elde ettiği yaymalarda, X kromatin oranını % 25-30 olarak bildirmiştir(9).

Dixon ve Toir; 1956 yılında ağız mukozasından aldıkları yayma preparatlarda çalıştıkları 162 erkekte X kromatini görememişler, 95 dişiye ait yaymalarda ise % 30-50 arasında X kromatin değerleri bulmuşlardır(5).

Cinsiyet sayı anomalilerinin teşhisinde, basit bir tarafa testi olarak kullanılan X kromatinini gösterebilmek için bilinen metodlarla hücrelerin boyanması gerekmektedir. Barr ve Bertram, dişi kedilerin sinir hücrelerinin nukleusunda X kromatinini bulduktan sonra, değişik boyama metodları kullanmışlardır. Orijinal boya olarak Cresyl violet kullanarak X

kromatinin Feulgen pozitif reaksiyon verdiğini göstermişler ve böylece DNA içeriğine dikkati çekmişlerdir.

Daha az kompleks olan bir boyama metodunun bulunması için yapılan çalışmalar sonucunda Barr ve arkadaşları, rutin Hematoxylin-Eozin boyasının yeterli olduğunu, çok sayıda inceleme ve araştırmalar için çok kullanışlı olduğunu bulmuşlar ve Hematoxylin-Eozin ile boyanmış doku kesitlerinde, % 50-80 oranında X kromatin değerleri elde etmişlerdir(15,25).

Bir başka çalışmada Barr ve Klinger, 20 normal dişinin vaginal yaymalarına uyguladıkları Hematoxylin-Eozin boyaması ile yaptıkları sayımlarda, X kromatin oranını ortalama % 48.8 olarak bulmuşlardır(12).

Bizim çalışmamızda, 30 normal dişinin yanak mukoza yaymalarına uygulanan Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile yapılan sayımlarda bu oran % 10-38 arasındaki değerlerde (ortalama % 22.6) bulunmuştur.

Klinger ve Ludwig, X kromatini boyama teknikleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, en büyük sayım hatalarını Hematoxylin-Eozin ile yaptıklarını açıklamışlardır. Bu araştırmacılar, özellikle kromatince zengin nukleuslarda ve küçük çekirdekçik içeren nukleuslarda, X kromatininin ayrılmasında hata yaptıklarını bildirmişlerdir(15).

Hematoxylin, bir nukleus boyası olduğu için, nukleusun diğer kromatin materyelini de boyamaktadır. Bu metod ile boyadığımız yayma preparatlarda, özellikle nukleus periferine yakın olan kromatin materyelinin, X kromatini açısından yanıltıcı olabileceği gözlenmiştir. Bu nedenle, nukleus periferinde, belirgin bir şekilde görülen X kromatinleri dikkate alınarak, hata yapma olasılığı ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

Hematoxylin-Eozin boyama metodu, solüsyonlarının hazırlanması açısından zaman almakla birlikte, uygulanması yönünden basit ve pratiktir. Boyama sonucunda, kromatin yapısı mor, sitoplazma soluk pembe boyanmaktadır (Resim 6). Bu boyama metodunun, kısa bir sürede uygulanması açısından avantaj sağladığı gözlenmiştir.

Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile Barr ve arkadaşlarının doku kesitlerinde bulduğu % 50-80 X kromatin oranı ve Barr ve Klinger'in vaginal yaymalarda buldukları ortalama % 48.8'lik X kromatin değerine karşılık, biz çalışmamızda yanak mukozası yaymalarında ortalama % 22.6 gibi daha düşük bir değer elde ettik. Buradaki farklı bulguların çalışılan materyellerin farklı olmasından kaynaklanabileceği gözönüne alınmalıdır.

Çalışmamızda, dişilerin yanak mukoza yaymalarına uyguladığımız bir başka X kromatin boyama metodu da, Guard'ın kendi adıyla bilinen boyama metodudur.

Guard; 1959 yılında dişilerin yanak mukoza yayma preparatlarına uyguladığı bu boyama metodu ile, % 41-69 oranında (ortalama % 55) X kromatin değerleri elde etmiştir(12).

Bizim çalışmamızda, Guard boyama metodu ile X kromatin değerleri daha düşük olarak % 18-38 arasındaki (ortalama % 25.2) değerlerde bulunmuştur.

Bu boyama metodu ile çekirdek kromatini dahil, diğer hücre elemanları fast green (FCF) ile yeşile boyanırken, X kromatini Biebrich scarlet ile kırmızı renkte boyanmaktadır(12,25). Bu teknikte kullanılan Biebrich kırmızısının, nüklear boyama özelliğine sahip olduğu ve fosfotungstik asit varlığında, biebirsch kırmızısının nüklear kromatine kuvvetli afinitesinin olduğu bildirilmiştir(12).

Guard, bu boyama metodunun vaginal ve yanak mukoza yaymalarında en iyi sonucu verdiğini ve X kromatinini diğer heterokromatin granüllerinden ayıran en iyi metod olduğunu bildirmiştir(12).

Çalışmamızda, yeşil boyanan nükleusların periferinde, diğer kromatin partikülleri ile karışma olasılığı olmaksızın belirgin bir şekilde, kırmızı renkte görülen X kromatinin sayımları rahatlıkla yapılmıştır (Resim 1-2). Boyama iyi olduğu zaman yeşil boyanan nükleuslar X kromatinini en iyi şekilde göstermiştir. Bu nedenle sayımlarımızda sadece yeşil boyanmış nükleuslar dikkate alınmıştır. Çalışmamız süresince yayma preparatların bazılarında X kromatininin iyi bir şekilde boyanmadığı fakat boya solüsyonları yenilendiği zaman boyamanın çok daha iyi olduğu gözlenmiştir. Boya solüsyonlarının hazırlanmalarından yaklaşık 7 gün sonra boyama özelliklerini kaybettiği, bu süreden sonra yanak mukozasından alınan yaymalara yapılan boyamalarda X kromatininin iyi seçilemediği gözlenmiştir. Solüsyonların hazırlanması çok fazla zaman almamakla birlikte boyama süresi uzundur. Kullanılan solüsyonlardan FCF'da boyama süresi, yapılan çalışmalarda 1-4 saat olarak belirtilmiştir(2,10,12,19,26). Bu çalışmada yanak mukozası yayma preparatlarını 1 gece boyunca (12-18 saat) fast green FCF solüsyonunda bırakmakla, daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Uyguladığımız bir diğer boyama metodu da Papanicolaou metodudur.

Carpentier (1956) ve Riis (1956); Papanicolaou boyama metodu ile boyadıkları vaginal yaymalardaki epitel hücrelerinde X kromatininin gösterilebileceğini bulmuşlardır(15). Ayrıca Platt ve Kailin (1964), X kromatini ile ilgili çalışmalarında vaginal ve yanak mukozası yaymalarına bu boyama metodunu uygulamışlardır. Bu araştırmacılar, yaptıkları çalışma sonucunda yanak ve vaginal yaymalardaki epitel hücrelerinde

X kromatini sayımlarının sonucunda oranlarda belirgin bir fark bulmamışlardır ve 100 normal dişide X kromatini pozitif hücrelerin sayısını % 20-86 arasındaki değerlerde bildirmişlerdir(18).

Çalışmamızda ise 30 normal dişinin yanak mukozası yayma preparatlarına uyguladığımız Papanicolaou boyama metodu sonucunda X kromatini pozitif hücrelerin sayısı % 18-40 değerleri arasında bulunmuştur. Uyguladığımız 4 boya metodu içinde en yüksek ortalama değer bu metodla elde edilmiştir (% 28). Bu boyama metodunun uygulanması çok fazla zaman almamaktadır. Solüsyonları da hazır olarak kullanıldığı için pratik olarak kısa bir sürede uygulama olanağı sağlanmıştır. Boya solüsyonları bozulmadan uzun bir süre kullanılabilirdiğinden bu boyanın ekonomik olduğu da söylenebilir. Boyama sonucunda epitel hücre sitoplazmaları soluk pembe ve mavi boyanan nukleus periferinde X kromatini mor renkte boyanmıştır ve sayımlarda güçlkle karşılaşılmamıştır (Resim 3-4).

Çalışmamızda uyguladığımız Feulgen boyama metodu; literatürde X kromatini için en geçerli boyama metodlarından biri olarak kabul edilmektedir(9,15,23,25). Moore ve Barr, X kromatin sayımlarında Feulgen metodunu kontrol olarak kullanmışlardır(15).

Yapılan bir çalışmada, Feulgen boyama metodu ile yanak mukozası yaymalarında X kromatin oranı % 26.2 olarak bildirilmiştir(31). Çalışmamızda ise; Feulgen boyama metodu ile X kromatin değerleri benzer olarak % 15-30 (ortalama % 25.3) arasındaki değerlerde bulunmuştur.

Feulgen boyaması sonucunda elde ettiğimiz ortalama X kromatin değeri (% 25.3) Papanicolaou ve Guard boyamaları sonucunda elde ettiğimiz ortalama değerlerden daha düşüktür.



Feulgen X kromatini için spesifik bir boyama metodu olmasına rağmen, boya solüsyonlarının hazırlanması açısından zahmetli bir metod olup oldukça zaman almaktadır. Kullanılan Schiff solüsyonunun hazırlanması uzun sürmekte ve çok hassas bir çalışma gerektirmektedir. Aynı zamanda çok kısa bir sürede beyaz olan Schiff solüsyonu pembeleşip boyama özelliğini kaybetmektedir. Feulgen boyama metodunun yukarıda bahsedilen güçlüklerine rağmen, X kromatininin boyanması ve ayırt edilmesi açısından oldukça iyi sonuç vermektedir. Yanak mukoza-sından alınan epitel hücrelerinin sitoplazmaları uygulanan zıt boya (light green) nedeniyle açık yeşil, X kromatini de nukleus periferinde menekşe renginde boyanmıştır (Resim 5).

Değişik laboratuvarlarda çeşitli boyamalarla yapılan çalışmalarda, X kromatin bulguları değişik oranlarda bildirilmiştir(5,12,18). Bu nedenle her laboratuvarın X kromatin için ortalama bir değer bulması ve sayımlarda önceden pozitifliği bilinen bir kontrol yayma preparatın kullanılması gerekmektedir.

Yanak mukoza yayma preparatlarına uyguladığımız dört boyama metodu sonucunda X kromatin değerleri, genel olarak bu boyama metodları ile yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına göre daha düşük bulunmuştur. Analiz edilen hücre tipi, sayımı yapan kişinin tecrübesi gibi faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Uyguladığımız dört boyama metodu sonucunda yaptığımız X kromatini sayımlarında, en yüksek X kromatin değeri, yine en yüksek ortalama X kromatini değeri Papanicolaou boyama metodu ile elde edilmiştir. Ayrıca bu boyama metodunun pratikliği ve X kromatininin gözlenmesindeki kolaylığı nedeniyle X kromatini için uygun bir boyama metodu olduğu kanısına varılmıştır. Bu metodun sayımı yapan kişilere bağlı olabilecek hata oranını saptamak amacıyla, 10 erkek ve 10 dişiden alınan yanak mukoza yayma preparatlarına uygulanan boyama sonucunda

birbirinden bağımsız olarak yapılan objektif sayımlarda erkeklere ait yaymalarda hiç X kromatini görülmemiştir. Dişilere ait yaymalarda ise, % 23-47 arasında değişen X kromatin değerleri elde edilmiştir. Tablo 7'de de gösterildiği gibi, aynı kişiye ait ağız epitel yaymalarının sayımlarında, objektif olarak çok az farklılık bulunmuştur; elde edilen X kromatin değerleri birbirine çok yakındır.

30 normal dişiye uyguladığımız tüm boyama yöntemleri sonucunda en düşük X kromatin değerlerinin ortalaması % 15.2, en yüksek X kromatin değerlerinin ortalaması % 36.5, ortalama X kromatin değerleri ise % 25.3 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Guard ve Papanicolaou boyama metodlarında en düşük X kromatin değerleri eşit (% 18), en yüksek X kromatin değerleri ise birbirine çok yakın bulunmuştur (% 38-% 40). Buna rağmen Papanicolaou metodu ile ortalama X kromatin değeri daha yüksek bulunmuştur (% 28.2). Ayrıca bu iki boyama metodunun farklılıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda da Papanicolaou boyama metodunun, Guard boyama metoduna göre daha yüksek X kromatin sonuçları verdiği görülmüştür (Tablo 5).

Hematoxylin-Eozin metodu ile de en yüksek X kromatin değerinin % 38 bulunmasına rağmen, en düşük X kromatin değeri (% 10) ve en düşük ortalama X kromatin değeri (% 22.6) bu metodla elde edilmiştir. Feulgen boyama metodu ile en yüksek X kromatin değeri % 30 bulunurken ortalama X kromatin değeri % 25.3 bulunmuştur. Bu iki metodun farklılıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda da Hematoxylin-Eozin boyama metodunun Feulgen boyama metoduna göre daha düşük X kromatin sonuçları verdiği görülmüştür (Tablo 3).

Feulgen boyama metodu ile elde edilen ortalama X kromatin değeri, Guard boyama metodu ile elde edilen X kromatin değerine çok yakındır (% 25.3-% 25.2) (Tablo 2). Bu iki meto-

dun istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda da aralarında bir fark bulunamamıştır (Tablo 4).

Uyguladığımız 4 boyama metodu bir arada değerlendirildiğinde en sık % 21-30 değerleri arasında X kromatini saptanmıştır (Tablo 6). Guard boyama metodu ile 20 kişide, Papanicolaou boyama metodu ile 16 kişide, Feulgen boyama metodu ile 28 kişide, Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile ise 17 kişide % 21-30 arasında X kromatini sayılmıştır. Feulgen boyama metodu ile 28 kişide % 21-30 değerleri arasında X kromatini elde edilmesine rağmen, bu metod ile % 31-40 gibi yüksek değerler sayılamamıştır. Guard boyama metodu ile 4 kişide, Papanicolaou boyama metodu ile ise 10 kişide % 31-40 gibi yüksek değerler bulunmuştur (Tablo 6).

Tüm bu bulgular gözönüne alınarak % 21-30 arasındaki X kromatin bulguları laboratuvarımız için normal değerler olarak kabul edilmiştir. Bu değerler Barr'ın bulduğu % 25-30 X kromatini değerleri ile de uygunluk göstermektedir(9).

Sonuç olarak, çalışmamızda kullandığımız 4 boyama metodu ile de X kromatini sayımlarının yapılmasına rağmen, Papanicolaou boyama metodunun kullanımındaki çabukluk ve pratikliği, uygulanmasındaki kolaylığı, en yüksek değerleri vermesi, ayrıca normal erkeklerde hiç X kromatini görülmemesine karşın, normal dişilerde X kromatininin rahatça tanınması nedeniyle, bu yöntemin laboratuvar koşullarımız için en uygun boyama metodu olduğu kanısına varılmıştır.

## Ö Z E T

Bu çalışmada, değişik X kromatini boyama metodları kullanarak laboratuvarımız için en uygun olan metodu ve klinik materyelimizde cinsiyet kromatininin normal değerlerini saptamak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, sekonder seks karakterleri gelişmiş ve en az dört yıldır menstruasyon gören otuz normal dişinin yanak mukozalarından alınan epitel yaymaları kullanılmıştır. Kontrol olarak da on normal erkekte X kromatini boyaması uygulanmıştır.

Otuz normal dişinin yanak mukoza yayma preparatlarına; Guard, Papanicolaou, Feulgen ve Hematoxylin-Eozin boyama metodları uygulanmıştır.

Guard boyama metodu ile en düşük X kromatin değeri % 18, en yüksek X kromatin değeri % 38 ve ortalama değer % 25.2 bulunmuştur.

Papanicolaou boyama metodu ile, en düşük X kromatin değeri % 18, en yüksek X kromatin değeri % 40 ve ortalama değer % 28.2 bulunmuştur.

Feulgen boyama metodu ile, en düşük değer % 15, en yüksek değer % 30 ve ortalama X kromatin değeri % 25.3 bulunmuştur.

Hematoxylin-Eozin boyama metodu ile, en düşük X kromatin değeri % 10, en yüksek X kromatin değeri % 38 ve ortalama değer % 22.6 bulunmuştur.

Uyguladığımız dört boyama metodu birarada değerlendirildiğinde en sık % 21-30 değerleri arasında X kromatini saptanmış ve elde edilen bu X kromatin değerleri laboratuvarımız için normal değerler olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızda, dört boyama metodu ile de, X kromatini sayımları rahatça yapılmış olmasına rağmen, Papanicolaou boyama metodu ile en yüksek X kromatin değeri, en yüksek ortalama X kromatin değeri elde edilmiştir. Yine bu yöntemin pratik olması ve normal erkeklerde hiç X kromatini görülmemesi nedeniyle, laboratuvar koşullarımız için, en uygun metod olduğu kanısına varılmıştır.

### K A Y N A K L A R

- 1- Bartalos M, Baramki A T: Sex Chromatin and Nuclear Appendages, "Medical Cytogenetics" kitabında s.71, Baltimore (1967).
- 2- Başaran N: Tıbbi Genetik, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir (1984).
- 3- Belmont A S, Bignone F: The relative intranuclear positions of Barr bodies in XXX non-transformed human fibroblasts, Exp Cell Res 165:165 (1986).
- 4- Culling C F A: Handbook of Histopathological Techniques (Including Museum Technique), 2.baskı, London Butterworths, Co (Publishers) Ltd (1963).
- 5- Dixon A D, Torr J B D: Sex chromatin in oral smears, Brith Med J 2:799 (1956).
- 6- Dixon A D, Torr J B D: Sex chromatin as an aid to the identification of sex in forensic medicine, Nature 178: 797 (1956).
- 7- Epstein C J: Inactivation of the X-Chromosome, New Eng J Med 286:318 (1972).

- 8- Ferguson-Smith M A: Chromosomal abnormalities II: Sex chromosome defects, Hosp Pract 5:88 (1970).
- 9- Goldman L, Goldman J: Some studies of sex chromatin in dermatology, Dermatologica 127:445 (1963).
- 10- Gridley M F: Laboratory Hand Book; Çeviren O N Aker: Laboratuvar El Kitabı, Hususi Boyama Teknikleri, Örnek Matbaası, Ankara (1954).
- 11- Grob H S, Kupperman H S: Experiences with technics of chromatin sex determination, Am J Clin Pathol 36:132 (1961).
- 12- Guard H R: A new technic for differential staining of the sex chromatin, and the determination of its incidence in exfoliated vaginal epithelial cells, Am J Clin Pathol 32:145 (1959).
- 13- Kelly T E: Clinical Genetics and Genetic and Genetic counseling, 2.baskı, Chicago, London, Year book Medical Publishers (1986).
- 14- Klinger H P, Hammond D O: Rapid chromosome and sex-chromatin staining with pinacyanol, Stain Techn 46:43 (1971).
- 15- Klinger H P, Ludwig K S: A universal stain for the sex chromatin body, Stain Techn 32:235 (1957).
- 16- Konofsky K, Naumann G O H: Guggenmoos-Holzmann I: Cell density and sex chromatin in lens epithelium of human cataracts, Ophthalmology 94:875 (1987).
- 17- Levij I S, Mevlendijk P N: The localization of sex chromatin, Lab Inves 11:192 (1962).

- 18- Platt L I, Kailin E W Sex chromatin frequency, Jama 187:182 (1964).
- 19- Priest J H: Medical Cytogenetics and Cell Culture, 2. baskı, Lea Febiger, Philadelphia (1977).
- 20- Reed T E, Simpson N E, Chown B: The Lyon hypothesis, Lancet 2:467 (1963).
- 21- Roberts J A F, Pembrey M E: An Introduction to Medical Genetics, 8. baskı, Oxford University Press (1985).
- 22- Ross G T, Tijo J H: Cytogenetics in clinical endocrinology, Jama 192:977 (1965).
- 23- Schwarzacher H G, Wolf U: Methods in Human Cytogenetics, Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, Newyork (1974).
- 24- Soost H J: Barr-Körperchen bzw. X-Chromatin "Lehrbuch der Klinischen Zytodiagnostik (ed: H J Soost)" 2. baskı kitabında s.159, George Thieme Verlag Stuttgart (1976).
- 25- Şaylı B S: Midekal Sitogenetik, Yargıçoğlu matbaası Ankara (1986).
- 26- Tahahashi M: Colour Atlas of Cancer Cytology, 2. baskı, Igaku Shoin Ltd Tokyo (1981).
- 27- Taylor A I: Sex chromatin in the newborn, Lancet 1:912 (1963).
- 28- Tayşi K, Say B: Tibbi Genetik, Hacettepe Univ Yay A 12 (1975).



- 29- Therman E, Denniston C, Nieminen U, Buchler D A, Timonen S: X chromatin, endomitoses and mitotic abnormalities in human cervical cancer, Cancer Genetics and Cytogenetics 16:1 (1985).
- 30- Tsuang M T, Tsuang H S: A sex chromatin study of Chinese school children, J Med Gen 9:297 (1972).
- 31- Yüksel M, Uzunalimoğlu A, Oğur G: Turner sendromunda sitogenetik bulgular, Ank Tıp Bült 9:145 (1987).

**T. C.**  
**YÜKSEKÖĞRETİM KURULU**  
**Dokümantasyon Merkezi**