

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AİLENİN İSTEĞİNE BAĞLI TIBBİ DÜŞÜKLERDE,  
KORİONİK VİLLİ KARYOTİPİNİN  
MATERNAL KAN FETAL KARYOTİPİ İLE  
KARŞILAŞTIRMALI ARAŞTIRILMASI**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**Biyolog Cumhuri GÜNDÜZ  
Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Cihangir ÖZKINAY**

**İZMİR - 1994**

## TEŐEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora yapmama olanak sağlayan Prof. Dr. Nejat TOPÇUOğLU' na tez çalışmalarımı yönlendiren, çalışmalarım süresince hiç bir yardımı esirgemeyen, tez danışmanım Prof. Dr. Cihangir ÖZKINAY' a ve çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan asistan arkadaşlarıma teőekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

### BÖLÜM I

Giriş ve Amaç \_\_\_\_\_ 1

Kaynak Bilgiler \_\_\_\_\_ 6

### BÖLÜM II

Gereç ve Yöntem \_\_\_\_\_ 21

### BÖLÜM III

Bulgular \_\_\_\_\_ 31

### BÖLÜM IV

Tartışma \_\_\_\_\_ 45

Sonuç \_\_\_\_\_ 54

Özet \_\_\_\_\_ 55

Summary \_\_\_\_\_ 57

Kaynaklar \_\_\_\_\_ 59

Özgeçmiş \_\_\_\_\_ 69

## GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde tıp bilimindeki ilerlemeler sayesinde, enfeksiyon ve diğer hastalıkların tedavisinin en iyi şekilde gerçekleştirilmesi ile genetik hastalıklar ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, araştırmalar bir çok hastalığın genomik kökenli olduğunu ortaya koymaktadır. Genetik hastalığı olan bireyin tedavisinin gerek aileye gerekse devlete büyük maliyetler oluşturması, ailenin böyle bir çocuğa sahip olması ile yaşadıkları üzüntü, stres ve psikolojik baskılar, hasta bir çocuğun, yaşam ile olan mücadelesi, maruz kaldığı psikolojik baskılar ve hasta bir çocuğa sahip ailelerin, bir sonraki gebeliklerinde sağlıklı bir çocuğa sahip olup olmayacağını belirlemesi isteği ile ilgili merkezlere yaptıkları başvurular, bu tür hastalıkların önceden belirlenmesi konusunda birçok araştırmaların yapılmasına neden olmuştur. Bunun sonucu olarak da, gebeliğin çeşitli evrelerinde fetüsün DNA, kromozomal ve gelişimsel defektlerini belirleyen intrauterin invaziv ve noninvaziv prenatal yöntemleri geliştirilmiştir.

Invaziv yöntemler; korion villi örnekleme, amniosentez, kordosentez, fetoskopi ve fetal deri biopsisi olarak, noninvaziv yöntemler; ultrason, radyografi, maternal serum incelemesi ve maternal kandan fetal hücre örnekleme olarak çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir.

Araştırmamızın ana iki yöntemi olan korion villi örnekleme ve maternal kandan fetal hücre örnekleme daha ileride ayrıntılı olarak bahsedilecektir. Diğer prenatal yöntemleri kısaca incelersek;

Amniosentez, gebeliğin 16. - 18. haftaları arasında, erken olarak da 12. - 14. haftalarında, ultrason kontrolü altında transabdominal olarak amnion sıvısının aspirasyonuna dayanan bir yöntemdir. Amniosentez ile fetal kromozom anomalilerinin, metabolik defektlerinin, nöral tüp defektlerinin, korion villus örneklemesinde mozaik durumun açıklığa kavuşturulmasının, genomik defektlerinin prenatal tanısı yapılabilmektedir.

Kordosentez ise, gebeliğin 18. haftasında veya daha geç döneminde ultrason kontrolünde umbilikal ven ponksiyonu ile yapılır. Fetal kan örneği, kalıtsal immün defektlerinin, trombosit düzensizliklerinin, fetal viral enfeksiyonların, kromozom aberasyonlarının ve genomik defektlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

Fetoskopi, gebeliğin 19. haftasından sonra yapılan, endoskobun optik limitlerinden dolayı sınırlı bir görüntü alanı olan ve ultrasonografi ile kolaylıkla belirlenmeyen fasial ve ekstremitte defektleriyle bağlantılı dismorfik sendromların prenatal tanısı için yapılmaktadır. Fetal doku örnekleme yönteminde, Epidermolisis bullosa gibi ağır deri defektlerinin tanısı için fetal deri biopsisi uygulanmaktadır. Nadir görülen bazı tip metabolik düzensizliklerin tanısı için de fetal karaciğer biopsisi yapılmaktadır.

Ultrasonografi, erken olarak gebeliğin 12. - 14. haftalarında, yaygın olarak 16. - 20. haftalarında yüksek rezolüsyonlu ultrason kullanarak, fetal gelişmedeki major ve minor defektleri ortaya koyan bir yöntemdir.

Radyografi, düşük dozlarda fetal iskelette defektlere neden olan genetiksel hastalıkların prenatal tanısında kullanılmaktadır.

Maternal serum incelemesi yönteminde, en yaygın olarak uygulanan yöntem  $\alpha$  Feto Protein ( AFP ) seviyesinin, 16. - 20. gebelik haftalarında maternal serumda belirlenmesi esasına dayanır. Fetal deri ve merkezi sinir sistemindeki açık defektler AFP Seviyesini yükseltir. Trizomi 21, 18, ve 13' te ise AFP seviyesi düşme gösterir. AFP değerlendirilirken anne yaşı, diabetli olup olmadığı ve ikizlik önemlidir. Ayrıca maternal serumda kromozom trizomileri için ankonjige östriol ve  $\beta$  hCG ( Human Korionik Gonatotropin ) seviyelerine bakılır. Down sendromunda östriol ve AFP seviyelerinde azalma  $\beta$  hCG seviyesinde ise artma gözlenmektedir ( 14 ).

Korionik villus örnekleme, gebeliğin 8. - 12. haftalarında, ideal olarak 10. haftasından sonra, erken olarak 6. ve 7. haftasında, geç olarak 12. haftadan sonra uygulanan, transservikal veya transabdominal olarak korion fondosum' dan, ultrason kontrolü altında villusların aspirasyonuna dayanan bir yöntemdir. Aspire edilen villuslara, direkt yöntem, kısa ve uzun süreli kültür yöntemleri ile DNA analizleri uygulanabilmektedir ( 4, 6, 14, 19, 21, 22, 25, 33, 34, 35, 40, 41, 51 ).

Korion villuslar, prenatal tanıda ilk olarak Çin' de fetal cinsiyeti belirlemek amacıyla kullanılmıştır ( 12 ). Villi' nin direkt incelenmesi ve kültüre edilmesi yöntemleri ile ilgili önemli çalışmalar, 1981 yılında Niazi ve arkadaşları ( 41 ) ve 1983 yılında Simoni ve arkadaşları ( 51 ) tarafından geliştirilmiştir.

Günümüzde ise birçok merkez tarafından genetik riskli gebeliklerde rutin olarak uygulanmaktadır. Bu risk grubunu oluşturan gebelikler şunlardır; anne yaşının 35' ten yukarı olması, bir önceki çocukta kromozom aberasyonunun bulunması, ailede X' e bağlı resesif ve / veya otozomal

ressesif hastalık anamnezi, parental kromozom translokasyonlarının bulunmasıdır ( 34 ).

Korion villus örneklemesinin avantajları, 8. - 12. haftalar gibi gebeliğin erken evresinde olması, ilk trimester' de olmasından dolayı terapötik düşük olayında, ailenin gebeliğe tam hazırlanamaması ve evebeynden başka bir kimsenin haberi olmaması nedeniyle psikolojik bir avantaj sağlaması, elde edilen villuslardan ( Langhans hücrelerinden ) 1 ile 3 gün arasında, kesin ve hızlı sonuç alınabilmesidir ( 14 ).

Dezavantajları ise, amniosenteze göre daha yüksek düşük oranı ( % 1 - 2 ), plasentaya ait yalancı mozaisizm göstermesi ( % 1.8 ), maternal hücre kontaminasyonu ( % 1.9 ), maternal Rh duyarlılığı ve erken korion örneklemesinde ekstremit malformasyonudur ( 4, 9, 33 ).

Maternal kandan fetal hücre örnekleme yöntemi, maternal dolaşıma geçen fetal lenfosit ve trofoblastların gerek kültüre edilerek fetal seks ve karyotipin elde edilmesine, gerekse moleküler genetik yöntemlerini kullanarak DNA analizi ile fetal seksin belirlenmesine olanak sağlayan noninvaziv bir yöntemdir.

Hücre kültürü ile fetal cinsiyetin elde edilmesi ile ilgili ilk araştırma 1969 yılında Walknowska ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Yaptıkları araştırmada, 14. - 18. haftalar arasındaki gebeliklerde, 5 küçük akrosentrik kromozom gösteren fetal hücrelerin maternal kandaki varlığının % 0.14 - % 1.5 arasında ve ortalama olarak % 0.6 oranında olduğunu, 18. - 37. haftaya kadar olan dönemde ise % 0.2 - 0.8 ve ortalama olarak % 0.4 oranında bulunduğunu, bu bulguların doğum sonrası cinsiyet ile de desteklendiğini göstermişlerdir ( 54 ).

Selypes ve Lorenz 1988 yılında yaptıkları çalışmada, 7. - 36. haftalar arasındaki 46 gebeyi incelemiş ve lenfosit kültürlerinin GTG bantlamasında, 38 vakada ( % 92.7 ) fetüsün cinsiyetini doğru olarak tanımlamışlardır. İki vakada ( % 4.78 ) yanlış negatif sonuç ve bir vakada ( % 2.4 ) yanlış pozitif sonuç elde etmişlerdir ( 48 ).

Moleküler genetik yöntemlerini kullanarak fetal seks belirtimi ile ilgili bir çok araştırma bulunmaktadır ( 11, 15, 19, 23, 31, 37, 40, 45 ). Bu araştırmalara göre maternal kanda, her 1.000 ile 40.000 maternal hücrede 1 fetal hücrenin bulunduğu bildirilmiştir ( 31 ).

Çalışmamızda, ilgili literatür bilgilerin ışığı altında, korion villus örneklemesinden direkt ve kültür yöntemlerini kullanarak elde edeceğimiz karyotipi, maternal kanda bulunan fetal hücrelerin kültüre edilmesi ve bunun sonucu olarak elde etmeyi planladığımız fetal karyotip ile karşılaştırmayı ve aralarındaki korelasyonu belirlemeyi amaçladık.

Araştırmamızla, maternal kandan fetal karyotipin elde edilmesi, bu yöntemin güvenilirliği, rutin bir yöntem olarak kabul edilen korion villus ile doğruluk derecesi, prenatal tanı yöntemi olarak uygulanabilirliği gösterilmek istendi.

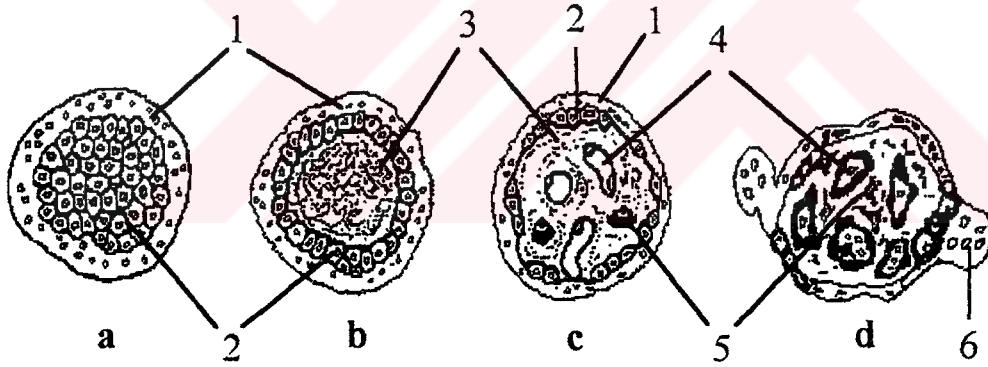


## KAYNAK BİLGİLER

### Korion

Plasentanın temelini oluşturan, amnion zarının dışında bulunan korion, Blastocyst' in dış tabakasını yapan trofoblast hücrelerinden oluşur. Önceleri embriyonun her tarafında hızlı gelişme gösteren bu zarın, bir süre sonra sadece plasentanın yapısına katılan Chorion fondosum bölümü kalır ve diğer bölümler atrofiye olur ve Chorion laeve' yi oluşturur.

Korion, embriyoda plaseenta yapısına iştirak eden bir oluşumdur ve birbirini izleyen 4 evreden oluşur ( Şekil 1 ).



Şekil 1. Korion villuslarının dört evresi. a: Primer, b - c: Sekonder, d: Tersiyer villuslarının enine kesitleri. 1: Sinsitiotrofoblast, 2: Sitotrofoblast, 3: Mezoderm, 4: Kapiller, 5: Hofbauer hücreleri, 6: Proliferasyon tomurcukları [ Petorak' tan değiştirilerek alınmıştır ( 44 ) ].

a) Laküner Evre: Embriyonun implante olduğu bölgede, 9. günde trofoblastlardan farklılaşan sinsitiotrofoblastların tümü çanağa benzer bir yapı oluşturur. Hücrelerin arasındaki boşluklar birleşerek lakünler oluşur ve sinsitiotrofoblastlar trabekül görünümünü alır. Sitotrofoblastlar bunların içine yerleşir.

b) Primer Villus: 11. ve 12. günlerde sinsitiotrofoblastların yaptığı trabeküller özellikle embriyonal kutupta gelişme göstererek parmaklı çıkıntılar halinde primer villusları oluşturur.

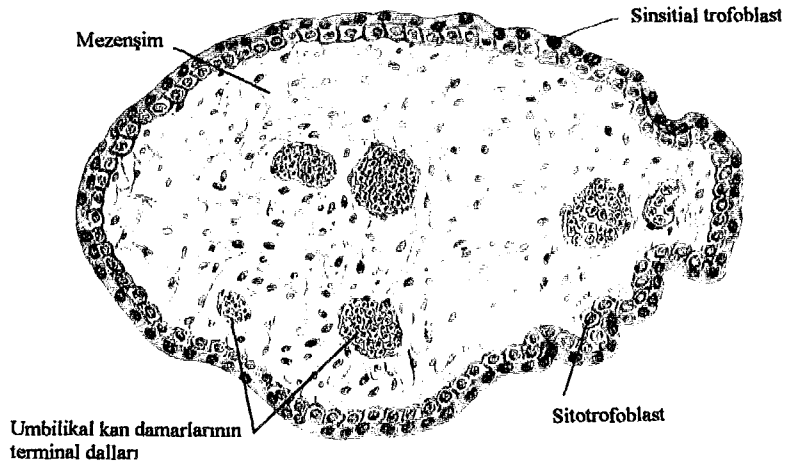
c) Sekonder Villus: 15. ve 16. günlerde dışta sinsitiotrofoblastlar, içte sitotrofoblastlar bulunan primer villusların içine henüz farklılaşmamış mezenşim hücrelerini içeren mezoderm' in girmesi ile sekonder villuslar oluşur.

d) Tersiyer Villus: 18. günden itibaren sekonder villus stromasında; kan odakları, kan taslakları oluşmasıyla tersiyer villuslar oluşur. Kan damarları sonradan embriyo damarları ile bağlantı sağlar ( 44 ).

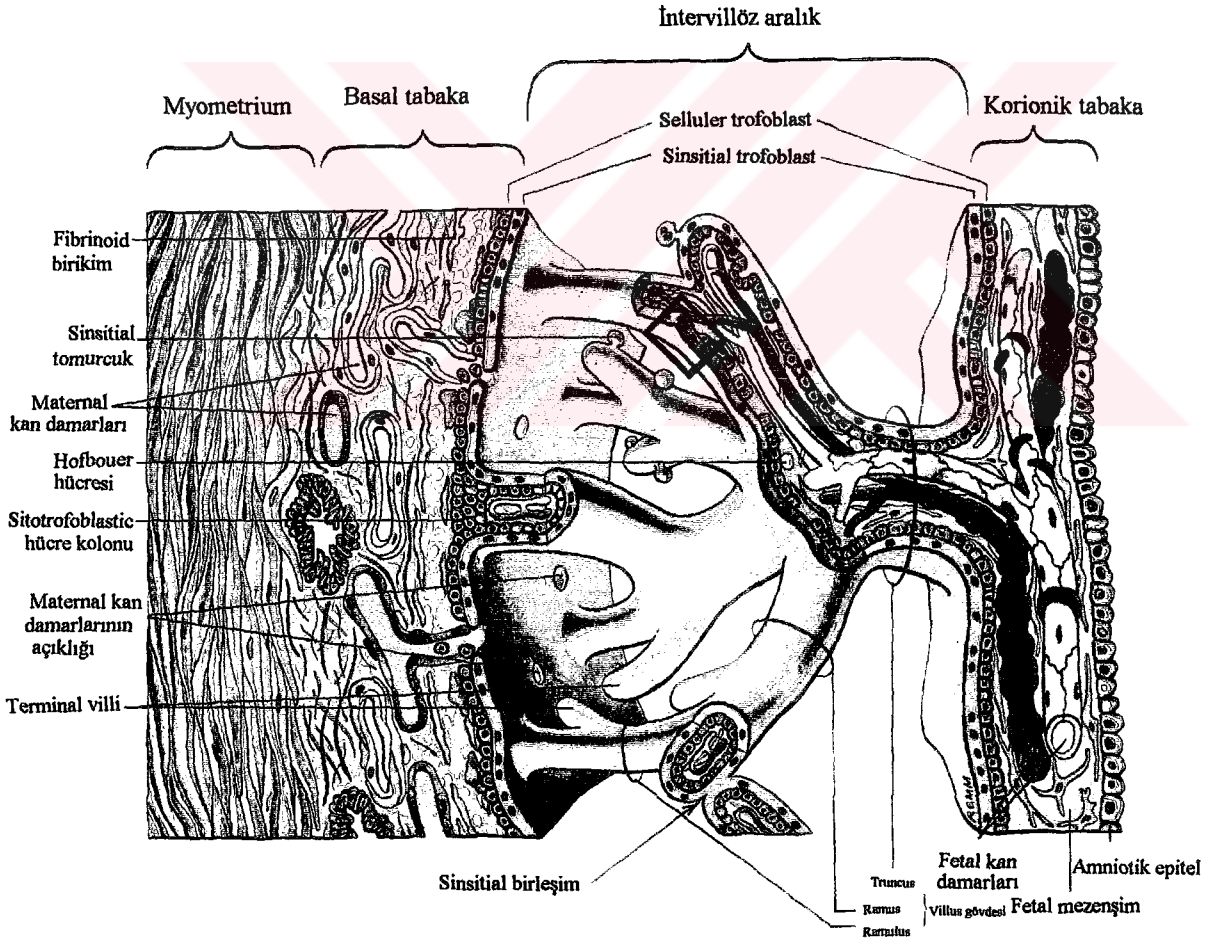
#### **Villusların yapısı**

Villuslar, anne ile fetüs arasındaki çeşitli maddelerin değişimini gerçekleştiren esas yapılardır. Bunun yanında fetüs ile anne kanını ayıran villus dokusu çok güvencelidir ve fonksiyonel önemi vardır. Plasentada fonksiyon gören villusların yüzeyi yaklaşık 14 -15 m<sup>2</sup> ve içlerindeki kapillerlerin uzunluğu ise 50 km kadar olduğu hesaplanmıştır.

Villuslar, içte mezenşimal öz ve bunu saran, üst yüzeyde sinsitiotrofoblastlar ile bunun altındaki sitotrofoblastlardan ( Langhans hücrelerinden ) oluşur ( Şekil 2 ).



Şekil 2. Korion Villusların histolojik kesiti ( 20 ).



Şekil 3. Plasentanın hücresel görünümü ( 20 ).

Mezenşimal öz, fibroblastları, gebeliğin erken evrelerinde daha çok sayıda olmak üzere büyük fagositik Hofbauer hücrelerini, çeşitli plazma hücrelerini ve serbest lipid granüllerini içerir. Ayrıca arterioller ve kapillerlerden oluşan fetal damarlar bulunur. Korion villusların büyük dallarına Truncus, bunlardan dallananlarına Ramus ve bunların da dallarına Ramulus adı verilir [ Şekil 3, ( 20, 44 ) ].

### **Korion Villus Örneklemesi**

Literatürde, korion villusların kültürü ile ilgili ilk çalışmaların, Jones ve arkadaşları ( 1943 ), Stewart ve arkadaşları ( 1948 ) ve Theide ( 1960 ) tarafından yapıldığı bildirilmiştir. Bu araştırmacıların gözlemlerine göre, olgunlaşmamış plasenta villusları in vitro olarak oldukça yavaş üremekteydi. Theide, korion villusların önce tripsinlenmesi ardından filtre edilmesi ile hücre proliferasyonunun hızlandığını göstermiştir ( 41 ).

Korion villuslar, prenatal tanıda ilk kez Çin' de ve Tietum Hastanesi kadın hastalıkları ve doğum kliniğinde, gebeliklerde fetal cinsiyeti belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Yapılan çalışmada, transservikal aspirasyon ile 47. - 100. günlerindeki gebelerden Korion villuslar elde edilmiştir. Bu villuslar, lamlara yayılmış ve Papanicolaou ile boyanarak seks kromatini incelenmiştir. Bu incelemeleriyle, prenatal olarak fetal cinsiyeti belirlemede başarı oranının % 93.9 ve düşük oranının % 5 civarında olduğu bildirilmiştir ( 12 ).

1981 yılında Niazi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, korion villus örneklemesine önemli ışık tutmuştur. Korion vilusları tripsinleyerek ve filtre ederek, elde ettiği üç tabakanın, sinsitiotrofoblast, sitotrofoblast ve mezenşimal özün özelliklerini tanımlamışlardır. Araştırmacılara göre,

sinsitotrofoblastlar, bölünme kapasitesi olmayan hücrelerden oluşmuştur. Sitotrofoblastlar, aktif olarak bölünen, in vitro olarak birkaç gün bölünmeye devam eden hücrelerden oluştuğunu ve mezenşimal öz hücreleri, aktif olarak bölünebilen ve kültürde bölünmeye devam eden hücrelerden oluştuğunu bildirmişlerdir ( 41 ).

Kromozom anomalilerinin analizi için karyotip elde edilmesi, bölünebilen sitotrofoblast hücrelerinin kullanıldığı kısa süreli kültür yöntemi ile, veya bölünebilen mezenşimal öz hücrelerinin kullanıldığı uzun süreli kültür yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kısa süreli inkübasyon, direkt yöntem olarak da adlandırılmıştır ve 1 - 4 saat veya 24 - 48 saat gibi nispeten kısa zaman içinde karyotip elde edilebilmiştir ( 52 ).

1982 yılında Yamamoto ve arkadaşları, çalışmalarında saptanan düşüklerin, kromozom anomalilerinin sebeplerini, korion villusların direkt yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmalarında, gebelerin son menstrasyonundan altı hafta önce ve üç hafta sonrasını içine alan 9 haftalık periyotta, üst solunum yolları enfeksiyonları nedeniyle analjezik ve antiemetik kullanan gebelerin % 13.8' inde ( 8 / 58 vaka ) kromozom anomalisinin olduğunu gözlemişlerdir. Tedavi görmeyen grupta ise bu oranı % 6.3 ( 71 / 1136 ) olarak bulmuşlar ve farkın istatistiksel olarak (  $p < 0.05$  ) anlamlı olduğunu saptamışlardır. Triploidi olgularının da ilaç kullanımıyla ilgili olduğunu ve tedavi gören grupta % 5.1 ( 3 / 58 ) ve tedavi görmeyen grupta ise % 0.5 ( 6 / 1136 ) ve (  $p=0.0074$  ) oranında olduğunu göstermişlerdir. Trizomi ile ilaç kullanımı ve anne yaşı arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Ayrıca maternal X irradiasyonu ile ve menstrual period düzensizlikleri ile de anlamlı bir fark gözlememişlerdir ( 55 ).

Korion villus örnekleme ile ilgili ilk çalışmalardan olan, Gosden ve arkadaşlarının 1982 yılında yaptıkları araştırmada, gebeliğin ilk trimestresinde alınan, korion biopsi örneklerinden elde edilen, DNA' nın moleküler analizi ile fetal cinsiyetin belirlenebileceğini açıklamışlardır. 13 gebenin biopsi örneklerini çalışmışlar ve Y kromozomu DNA' sını için spesifik restriksiyon endonükleaz kullanarak elde ettikleri sonuçlar ile fetal karyotip analiz sonuçlarının aynı paralellikte olduğunu bulmuşlardır. DNA analizi ile fetal cinsiyeti;4 erkek,9 dişi olarak belirlemişlerdir ( 19 ).

Old ve arkadaşları ( 1982 ), hemoglobinopatilerin ilk trimestrede fetal tanısı ile ilgili çalışmasında, talaseminin prenatal tanısında, fetal kan örnekleme yerine korion villuslardan DNA izolasyonu ve analizinin, gerek zaman açısından gerekse komplikasyonlar açısından daha geçerli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yaptıkları araştırmada 7. - 13. haftalar arasındaki 63 gebede başarı şansının % 30 ( ilk 26 vaka ) ile % 90 arasında olduğunu belirtmişlerdir ( 42 ).

Brambati ve Simoni 1983 yılında, Duchenne musküler distrofi bir çocuğundan dolayı zorunlu taşıyıcı olan 37 yaşındaki annenin ikinci gebeliğinde, fetüsün cinsiyetini belirlemek amacıyla korion biopsisi uygulamışlardır. Direkt kromozom analizi ile fetüs karyotipinin dişi olduğunu, bununla birlikte 21 trizomisi olduğunu göstermişlerdir ( 3 ).

Duchenne musküler distrofi hastalığı yönünden taşıyıcı olan annenin gebeliğinde, fetüs cinsiyetini belirlemek için korion biopsisi uygulanan bir diğer araştırma da Lilford ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Biopsi materyali hem direkt hemde kültüre edilerek incelemişler ve fetüsün cinsiyetinin normal bir dişi yapısında olduğunu bulmuşlardır ( 36 ).

Simoni ve arkadaşlarının 1983 yılında yapmış oldukları araştırma, bu konuda yapılan çalışmalara bir baz oluşturmuştur. Yaptıkları çalışmada, korion biopsisi için dört değişik transservikal yöntem denemişlerdir. Bunların içinden en iyisinin, direkt ultrason izleme altında esnek katater ile parça alınmasının olduğunu ve bu yöntemin % 96 oranında başarı ile gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, aspire edilen örneklerle, dokudaki spontan mitozun kullanıldığı direkt yöntem ve uzun süreli kültür yöntemi uygulamışlardır; Direkt yöntemin yapılışını kısaca şöyle tanımlamışlardır; Kolsemid ( 0.04 µg / ml ) içeren RPMI 1640 ortamı bulunan 60 mm' lik cam petride, korion villusları makasla parçalamışlar, 1 saat 37°C' de inkübe etmişlerdir. % 1' lik sodyum sitrat ile 10 dakika hipotonik şok uygulamışlar, 3 : 1 metanol : asetik asit ile fikse etmişlerdir. % 60' lık asetik asit ile hücrelerin dissosiye olmasını sağlamışlar ve üzerine metanol ilave etmişlerdir. Her lam için birkaç damla dissosiye hücre süspansiyonu kullanmışlardır. Havada kuruturken eğik tutulması ile daha iyi metafazlar elde edilebileceğini savunmuşlardır.

Araştırmacılar ayrıca, Niazi ve arkadaşlarının önermiş olduğu uzun süreli kültür yönteminde bazı modifikasyonlar yapmışlardır. Yöntemin uygulanışı şu şekilde tanımlamışlardır; Villuslar 3 ml % 0.25 tripsin bulunan plastik bir kaba almışlar ve oda ısısında, çalkalayıcıda nazik bir şekilde 25 dakika çalkalamışlardır. Hücre süspansiyonunu, steril Swinney filtesinden geçirilerek 5 ml' lik enjektöre çekmişlerdir. Filtrat atmışlar ve filtre yüzeyinde tutulmuş villuları 2 ml % 0.25 tripsin bulunan steril bir kaba almışlar ve 15 dakika nazik şekilde çalkalayarak tekrar tripsinize etmişlerdir. Hücre süspansiyonunu santrifüj etmişler, kalıntı tripsini

uzaklaştırarak petrilere aktarmışlardır. Kültür ortamı olarak, % 20 Fetal calf serum içeren RPMI 1640 ve Chang medium kullanmışlardır. Kültürleri % 5 CO<sub>2</sub>' li 37°C' deki etüvde inkübe etmişlerdir.

Kültür yönteminde iki ana problem ile karşılaşmışlardır. Bunlardan birincisi, RPMI 1640 ile yapılan kültürlerde, hücrelerin düşük büyüme potansiyeli gösterdiğini savunmuşlardır. Hormon katkılı Chang mediumun kullanılması ile, hücre büyümesinde dikkat çekici bir artış olduğunu gözlemişlerdir. Böylece, korion villus kullanılarak yapılan sitogenetik tanıda, yüksek verimi sağlamak için Chang mediumun kullanılmasını tavsiye etmişlerdir. Diğer problemin ise bazı kültürlerde, maternal hücre kontaminasyonunun olduğunu ve bu problemin, decidua hücrelerinin, villuslardan temizleme işlemindeki pratikliğin artması ile önlenebileceğini savunmuşlardır.

Sonuç olarak da rutin çalışma yükünü, analizlerin maliyetini ve sonucun verilme süresini oldukça azaltan direkt yöntemin fetal kromozom tanısında ilk trimestrede uygulanması gereken bir metod olduğunu ileri sürmüşlerdir ( 51 ).

Gregson ve Seabright ( 1983 ), Simoni ve arkadaşları tarafından rapor edilen korion villiden fetal kromozomları elde etmek için uygulanan direkt yöntemin iki dezavantajı bulunduğunu göstermişlerdir. Bunlar; örnekler, kısa bir süre içinde çalışılması gerektiğini ve kromozomların, tripsin bantlama tekniği ile G bantlanmasının çok zor olduğunu belirtmişlerdir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için şu modifikasyonları önermişlerdir; parçalanmış olan villusları 1 ml Chang ortamına almışlar ve 37°C' lik % 5' lik CO<sub>2</sub>' li etüvde bir gece preinkübasyona bırakmışlardır. Fiksasyona başlamadan



1.5 saat önce 0.05 ml kolşisin ( 0.2 mg / ml ) eklemişlerdir. 2 ml % 1' lik sodyum sitratla 3 dakika hipotonik şok uygulamışlardır. 2 ml 3 : 1 metanol : asetik asit ile fikse etmişler, fiksatif i iki kez değiştirmişler ve - 20°C' lik dipfrizde 24 saat tutmuşlardır. Dipfriz sonrası, fiksatif i taze fiksatif ile değiştirmişler, uzaklaştırmışlar ve kalan fiksatif i kağıt mendile emdirmişlerdir. % 70' lik asetik asitten birkaç damla damlatmışlar, 1 dakika beklemişler ve lamlara bir iki damla hücre süspansiyonu damlatmışlardır. Kuruyana kadar pastör pipeti ile lam üstünde yaymışlardır ( 21 ).

Simoni ve arkadaşlarının direkt yöntemi ile ilgili bir diğer modifikasyon, Ford ve Jahnke ( 1983 ) tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılara göre, metafazların frekansının kolşisin konsantrasyonuna ( 1 µg / ml ) oldukça bağlı olduğunu, azaltılmaması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. İkinci değişiklik olarak da, aspire edilen korion villusları 1 µg / ml kolşisin bulunan 5 cc' lik ortam içine almışlardır. Villusları 37°C' de 2 saat inkübe etmişlerdir. Biopsi materyalini parçalamışlar ve 1 mg / ml kollagenaz tip V ve 1 µg / ml kolşisin bulunan Ham' s F10 ortamında 1 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonrası, lenfosit kültürünün Harvest yöntemini uygulamışlardır. Uyguladıkları yöntemle göre, Simoni ve arkadaşlarının tanımladığı gibi, eşdeğer ölçüdeki örneklerden daha fazla sayıda metafaz elde etmişlerdir. Bu gelişmede iki faktörün önemli olduğu, bunların ise hücrelerin kolşisine ani maruz kalmaları ve dokunun ileri ayrıştırılması olduğunu savunmuşlardır ( 17 ).

Hogge ve arkadaşları 1985 yılında yaptıkları çalışmada, 600 gebeye ilk trimestrede korion biopsisi uygulamışlardır. Biopsi yapılan vakaların % 97' sinde yeterli materyal alabilmişler ve bu materyallerin % 98.7' sinden başarılı kültür elde ettiklerini açıklamışlardır. Elde ettikleri

sonuçlara göre; kromozom anomalilerinin, bu gebeliklerin % 5.9' unda ileri anne yaşı ( 35 yaş ve yukarısı ) sebebiyle olduğunu, villus karyotipi ile fetüs arasındaki uyumsuzluğun, vakaların % 2' sinde bulunduğunu ve korion villi örneklemesini izleyen spontan düşüklerin oranının % 6.3 olduğunu açıklamışlardır ( 22 ).

Eichenbaum ve arkadaşları ile Martin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, direkt yöntemde elde ettikleri normal erkek karyotipine karşın, kültür yönteminde, fetüs karyotipinin aneuploidi yapısında olduğunu bulmuşlardır. Bu aneuploid yapıyı, amniosentez veya fetal doku çalışmalarıyla da onaylamışlardır. Araştırmacılar; direkt metodun yanlış - negatif sonuç verebildiğini ve tanıda direkt metodun tek başına değil kültür metodu ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir ( 13, 38 ).

Terzoli ve arkadaşları, direkt preparasyonda metafazların kalitesini ve verimini, " lam-yapan " diye adlandırılan bir aletle arttırılacağını bildirmişlerdir. Bu alet iki kısımdan oluştuğunu ve bunlardan birincisinin, lamların yerleştirildiği ısıtılan hareketli tabla, ikincisinin ise lam üzerinde serbest hale geçmiş metafazları ayıran paslanmaz çelik tarak olduğunu tanımlamışlardır. Bu alet ile bir örnekten 6 - 7 dakikada, 5 - 10 lam yapabilmışlerdir. Bu araştırmacılar, direkt yöntemde de bazı değişiklikler yapmışlardır. Daha önceki çalışmalarda mediumdaki % 20 Fetal calf serumu % 5' e indirmişler ve inkübasyon süresini 48 saate çıkarmışlardır. Bu değişiklik ile her lamda analizi yapılabilecek metafaz sayısının iki üç misli, yaklaşık olarak her 10.000 nukleusta 30 metafazdan 80 metafaza kadar arttırılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca fiksatifin 3 : 1 oranını 1 : 4 ( metanol : asetik asit ) olarak değiştirmişlerdir. Bu oranın, alkolün

çabuk buharlaşmasına olanak verdiğini ve % 70' lik asetik asit eklemeyen önce, fiksasyon sonrası dokunun yeterli kurumasının, optimal hücre çözülmesi için gerekli olduğunu bulmuşlardır. Bu yöntem ile, korion villustan direkt sitogenetik analizler için preparat hazırlamada % 1' den az başarısızlık oranına ulaştıklarını bildirmişlerdir ( 52 ).

Cao ve arkadaşları, 1976 - 1983 yılları arasında, kliniklerine  $\beta$  Talaseminin prenatal tanısı için başvuran ailelerin, yöntem tercihleri ile ilgili yaptıkları incelemelerde, ailelerin, yöntem için fetal kan örnekleme kullandığı yıllarda, bu yöntemi tercih etmelerinin % 93.2 oranında olduğunu, amniosentez geliştirildikten sonra bu yöntemin tercihinin % 97.4 ve korion villus örnekleme rutin olarak uygulanmaya başladıktan sonra ise bu yöntemin kabul edilebilirliğinin % 99.1 oranında olduğunu belirtmişlerdir ( 7 ).

Hindistan' da yapılan iki ayrı araştırmada, kendi merkezlerinde uyguladıkları korion villus örneklemesinde elde ettikleri sonuçlara göre, başarılarının düşük olduğunu ve özellikle uzun süreli kültürde, maternal kontaminasyonun önlenemediğini bildirmişlerdir ( 32, 43 ).

Tonnesen ve arkadaşları, X' e bağlı resesif kalıtmalı Menkes hastalığının prenatal tanısı için, ilk trimestrede uyguladıkları korion biopsisinde, villuslardaki bakır içeriğine ve kültüre edilmesiyle verilen bakır izotoplarının ölçümlerine ve transmisyon elektron mikroskopik incelemede, villuslarda bakırın gösterilmesiyle prenatal tanısının konabileceğini göstermişlerdir ( 53 ).

Holzgreve ve Miny, kendilerinin geliştirdiği ekokateter ile korion biopsisi uyguladıkları 500 gebede, düşük oranının ( % 4.3 ) kataterin girme

sayısı ile direkt ilişkili olduğunu, maksimum 3 girme ile sınırlandırılması gerektiğini ifade etmişlerdir ( 24 ).

Leschot ve arkadaşları 1987 yılında, 500 gebelikte direkt yöntemi kullanarak ( başarı oranı % 96.2 ) yaptıkları çalışmada, korion villus örnekleme için endikasyonları şöyle açıklamışlardır; anne yaşının 36 ve yukarısı [ 412 gebelik ( % 82.4 ) ], bir önceki çocuğun mutant kromozom aberasyonu [ 42 gebelik ( % 8.4 ) ], X' e bağlı hastalıklar [ 30 gebelik ( % 6 ) ], parental kromozom translokasyonları [ 8 gebelik ( % 1.6 ) ] ve bu sınıflandırmaya girmeyen diğer endikasyonlar [ 8 gebelik ( % 1.6 ) ] dir. İleri anne yaşı grubunda 13 gebelikte ( % 3.2 ), hasta çocuğa sahip olan gruptaki 1 gebelikte ( 2.4 ), X' e bağlı hastalık grubunda 9 gebelikte ( % 30 ), translokasyonlu gruptaki 1 gebelikte ( % 12.5 ) ve toplam olarak 24 gebelikte ( % 4.8 ) kromozom aberasyonlarının olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca korionik villi hücreleriyle diğer fetal dokular arasındaki uyumsuzluğun, yanlış - pozitif bulguların % 3 oranında olduğunu, bundan dolayı mozaik yapı gözlenen bütün gebeliklerde amniosentez yapılmasının zorunlu olduğunu bildirmişlerdir ( 34 ).

Korion villus örneklemesinde, parazitik hastalıkların prenatal tanısının da yapılabileceği bildirilmiştir. Foulon ve arkadaşları 1990 yılında, konjenital Toksoplazmozis' in, korion biopsisi ve erken amniosentez ile prenatal tanısının yapılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Korion dokusunu ve amniotik sıvıyı, Toxoplasma gondii' nin fibroblastlarda kültürü için kullanmışlardır. Kültür yöntemi ile Toxoplasma gondii' yi tanımlamışlar ve bu yöntem kesinlik kazanana kadar kordosentez ile birlikte yürütülmesi gerektiğini savunmuşlardır ( 18 ).

Brambati ve Simoni ( 1991 ), transabdominal aspirasyon ile korion villus uygulamasını 6. ve 7. haftadaki gebelerde gerçekleştirmişlerdir. Erken korion villus örneklemesini, yüksek risk altındaki kadınlara, etkilenmemiş çocuk doğurması amacıyla yapmışlardır. Bu yöntemin, diğer korion villus uygulamalarından farklı olan tek komplikasyonun, intrauterin hematoma olduğunu bildirmişlerdir. Brambati ve Simoni erken korion villus örneklemesinin; gestasyonel kese anatomisinin yüksek rezolüsyonlu ultrason ile tam bir incelenmesinin yapıldığı koşullarda, gebeliğin 6. ve 7. haftalarındaki vakaların büyük bir çoğunluğunda transabdominal olarak yapılabileceğini savunmuşlardır. Örnekleme başarı oranının; tek iğne girmesiyle % 85' ten daha fazla ve iki iğne girişiyle % 100' e ulaştığını, 20 gauge spinal iğne ile aspire edilen dokunun miktarının herhangi bir tanı metodu için yeterli olduğunu ve daha ince ( 22 gauge ) iğnenin de başarı ile kullanılabileceğini ve komplikasyonların önemsiz nitelikte olduğunu göstermişlerdir ( 3 ).

#### **Maternal kandan fetal hücre örneklemesi**

Maternal kandan fetal hücre örneklemesinin lenfosit kültürü ile ilgili ilk araştırma, Walknowska ve arkadaşları tarafından 1969 yılında yapılmıştır. Klasik lenfosit kültürü ile 14.- 37. haftalar arasındaki 30 gebenin karyotipini incelemişler ve 21 olgudaki 5 küçük akrosentrik kromozom bulunan metafazların erkek fetüse ait olduğunu kabul etmişlerdir. Bu prenatal bulguları, doğum sonrası cinsiyet ile karşılaştırmışlardır. Karşılaştırma sonucuna göre, iki olguda 5 küçük akrosentrik kromozom bulunduğu halde kız çocuğu doğmuştur. XY karyotipi göstermeyen 3 olgu ise erkek olarak doğmuştur. 5 küçük akrosentrik kromozomun maternal kanda, 14. haftadan 18. haftaya kadar

olan gebeliklerde ortalama olarak % 0.6 oranında, 18. haftadan 37. haftaya kadar olan periyotta ise % 0.4 oranında bulunduğunu gözlemişlerdir ( 54 ).

Selyes ve Lorenz, maternal kandan fetal cinsiyet ve karyotipin elde edilmesi için " air - culturing " olarak adlandırdıkları hava kültür yöntemini geliştirmişlerdir. Elde ettikleri metafazlara, Y body fluoresans, GTG ve QFQ uygulamışlardır. Geleneksel yöntem ile 1 / 1250 olan erkek hücre / maternal hücre frekansının geliştirdikleri yöntem sayesinde 1 / 71 oranına düştüğünü belirtmişlerdir. Yaptıkları araştırmada, 7. - 36. haftalar arasındaki gebeliklerde, fetüsün cinsiyetini incelemişler ve 2 olguda ( % 4.87 ) yanlış negatif, 1 olguda ( % 2.4 ) yanlış pozitif ve 38 olguda ( % 92.7 ) doğru olarak belirlemişlerdir. Fetal karyotipi incelediklerin de ise 3 vakada kromozom aberasyonlarının olduğunu gözlemişlerdir ( 48 ).

Maternal kandaki fetal hücrelerin ve cinsiyetin belirlenmesi için, immunolojik ( 11, 45 ) ve moleküler genetik ( 15, 23, 31, 37, 40, 56 ) yöntemlerinin uygulandığı araştırmalar yapılmıştır. İnsan trofoblast membran antijenine karşı, monoklonal antikor ( H315 ) kullanarak, çeşitli gebelik haftalarında, maternal kan incelenmiş ve retroplasental kanda bulunan üç tür hücreden biri olan anükleer hücrelerin 3 / 1.000, diploid hücrelerin 8 / 1.000 ve polinükleer hücrelerin 1 / 1.000 ile 4 / 1.000 oranında olduğu ve dört gebelikte 7 / 1.000 oranına yükseldiğini bildirilmiştir ( 11 ).

Bu araştırmalar ile gebeliğin 6. haftasından itibaren, maternal kanda fetüse ait hücrelerin yaklaşık olarak 1 / 1.000 ile 1 / 40.000 oranında bulunduğu, moleküler genetik yöntemler kullanılarak ise fetal cinsiyetin belirlenebileceği de gösterilmiştir ( 31 ).



## GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda kullanılan korion villuslar ve maternal kan, SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesi ve E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından, ailenin isteğine bağlı olarak düşük yapacak olan 6. - 12. haftalar arasındaki 70 gebeden ve ayrıca belirli endikasyonlar nedeniyle 10. - 12. haftalardaki 5 gebeden prenatal tanı amacıyla alındı. Alınan örnekler en kısa zaman içinde E. Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik laboratuvarına getirildi ve korion villuslar ve maternal kan için ayrı prosedürler uygulandı.

### Ortamlar

Çalışmamızda kullandığımız ortamların hazırlanışı aşağıda verilmektedir.

#### Serumsuz RPMI 1640:

RPMI 1640 ( Seromed Kat. no: F 1233 )	100 ml
Penisilin Streptomisin ( Seromed Kat. no: A 2212 )	1 ml

#### % 20 Fetal Calf Serum' lu RPMI 1640:

RPMI 1640 ( Seromed Kat. no: F 1233 )	100 ml
Fetal Calf Serum ( Seromed Kat. no: S 0013 )	25 ml
L-Glutamin ( Seromed Kat. no: K 0281 )	1 ml
Penisilin Streptomisin ( Seromed Kat. no: A 2212)	1 ml



**Chang medium:**

Chang A ( Irvine Scientific Kat. no: C 103 )	10 ml
Chang B ( Irvine Scientific Kat. no: C 100 )	90 ml
L-Glutamin ( Seromed Kat. no: Kat. no: K 0281 )	1 ml
Penisilin Streptomisin ( Seromed Kat. no: A 2212 )	1 ml

Chang A ve Chang B birleştirildiğinde tavsiye edilen kullanma süresi 10 gündür. Bu nedenle, ortamala tüketim miktarına göre Chang A ve Chang B eşit küçük hacimlere bölünerek kullanıldı.

**Lenfosit kültür ortamı:**

RPMI 1640 ( Seromed Kat. no: F 1233 )	100 ml
Fetal Calf Serum ( Seromed Kat. no: S 0013 )	25 ml
Fitohemaglutinin M ( Difco Kat. no: 0228 )	3 ml
L-Glutamin ( Seromed Kat. no: K 0281 )	1 ml
Penisilin Streptomisin ( Seromed Kat. no: A 2212 )	1 ml

Bu ortam 5 ml' lik şişelere bölündü ve dondurularak saklandı.

**Korion Villi Örneklemesi**

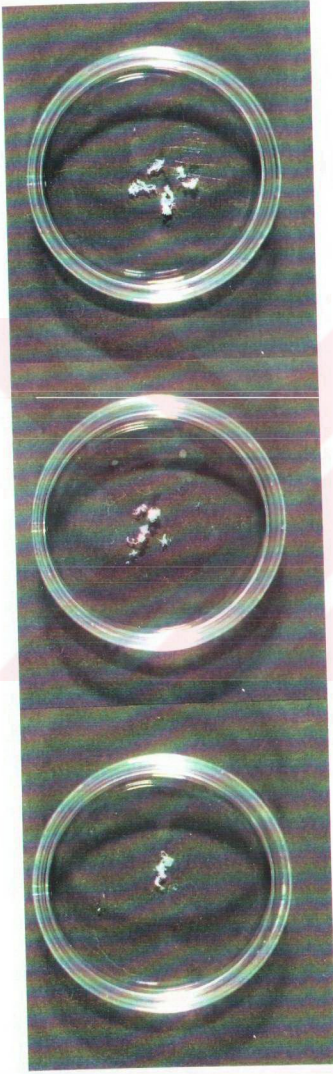
Korion villuslar, ilgili kadın hastalıkları ve doğum kliniği uzmanlarınca, grosses' lerde, tahliyeden önce küret ile kazınarak veya gebeye anlatılarak kürtajdan önce ve ayrıca prenatal tanı için devam eden canlı gebeliklerde, ultrason kontrolünde 16 guage polietilen kateter ile biopsi yapılarak elde edildi. Korion biopsisinde, heparinize edilmiş 20 ml' lik enjektör kullanıldı, 10 ml' lik negatif basınç uygulayarak villuslar aspire edildi ve bunu takiben enjektöre 5 ml serumsuz RPMI 1640 çekildi.

Kürtaj materyali ise 50 ml steril ağzı kapaklı ve içinde 10 ml serumsuz RPMI 1640 bulunan santrifüj tüpüne alındı.

Laboratuvarımıza getirilen materyal, steril ortamda, 60 mm' lik petriye alındı. Materyalden iyi olan korion villuslar seçilerek, içinde serumsuz RPMI 1640 bulunan bir diğer petriye alındı. Bu petride villi, makroskobik olarak temizlendi, iyice çalkalandı ve serumsuz ortam bulunan bir diğer petriye alındı. Disseksiyon mikroskobunda 20 X büyütmede, 2 adet 21 guage' lik enjektör iğnesi kullanılarak decidua korion villi' den çok dikkatli bir şekilde temizlendi. Decidua' dan tamamen temizlenmiş olduğuna karar verilen korionlar % 20 fetal calf serumlu RPMI 1640 bulunan petriye alındı. Oluşturduğumuz skala ile karşılaştırarak korion villus miktarı belirlendi ( Şekil 4 ). Cerrahi ince uçlu makas ile küçük parçalara ayrıldı. Bu villus parçalarına direkt ve kültür yöntemleri uygulandı. Araştırmamızda, direkt yöntem ve uzun süreli kültür yöntemlerin ( 2, 27, 46, 51 ) bazı modifikasyonları uygulandı.

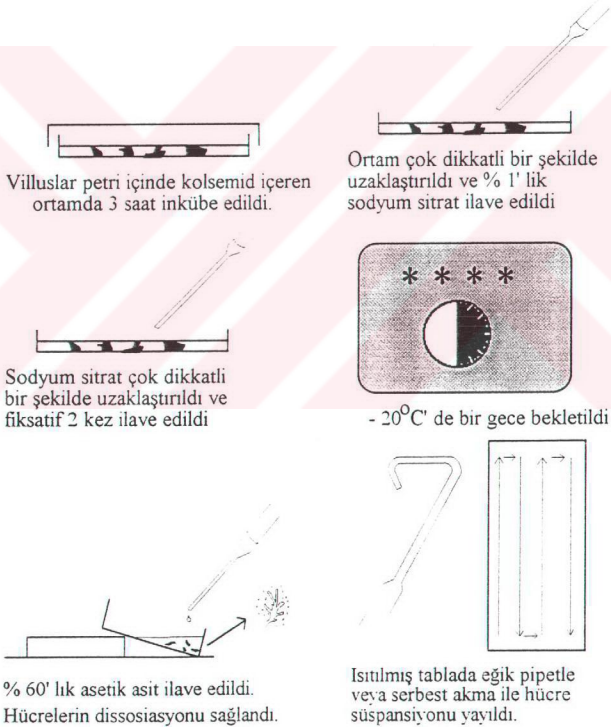
### **Direkt yöntem**

Küçük parçalara bölünmüş villuslar, direkt olarak içinde kolşisin [ 1 µg / ml ( Seromed Kat. no: L 6211 ) ] içeren 4 ml serumlu RPMI 1640 bulunan 35 mm' lik petriye ( Lux Kat. no: 5221 ) alındı ve 3 saat CO<sub>2</sub>' li etüvde 37°C' de inkübe edildi. Ayrıca 3, 24 ve 48 saatlik kısa süreli kültür yöntemi, 60 materyalde serumlu RPMI 1640 ile, 15 materyalde Chang medium ile gerçekleştirildi. Bu süre sonunda petriye kolşisin ( 1 µg / ml ) ilave edildi ve 3 saat CO<sub>2</sub>' li etüve 37°C' de inkübe edildi. Villusların harvest işlemi petri içinde yapıldı. Ortam, pipetle çok dikkatli bir şekilde alındıktan sonra 4 ml % 1' lik sodyum sitrat solüsyonundan ilave edildi ve



Şekil 4. Kortizon villusların çeşitli miligramlardaki görünümleri.

15 dakika  $37^{\circ}\text{C}$ ' lik etüvde bekletildi. Hipotonik uzaklaştırıldıktan sonra 3 : 1 metanol : asetik asit karışımından 4 ml ilave edildi ve fiksatif iki kez değiştirildi ( Şekil 5 ). İkinci fiksatifte  $- 20^{\circ}\text{C}$ ' lik derin dondurucuda bir gece bırakıldı. Bir sonraki gün fiksatifin tümü alındı ve 10 dakika villusların kuruması için beklenildi. % 60' lık asetik asitten villi miktarına göre 5 - 10 damla ilave edildi. Asetik asit ilavesi ile villusların dissosiyasyonu sağlandı. Dissosiasyon süresi inverted mikrospta gözlenerek belirlendi. Ortalama olarak 3 - 5 dakika beklenildi.



Şekil 5. Direkt yöntemin şematik diagramı. [ Roney ve Czepulkowski' den değişiklikle alınmıştır ( 46 ) ].

Preparasyonda kullanılacak lamalar, % 10' luk asit - alkolde en az 10 dakika tutuldu, distile sudan ve % 96' lik alkolden geçirildi ve havada kurutuldu. 40°C' ye ısıtılmış tabla üzerindeki lamlara hücre süspansiyonu içeren % 60' lik asetik asitten 4 - 5 damla damlatıldı. Solüsyon kuruyana kadar pastör pipeti ile lam üzerinde yayıldı veya eğim yapılarak lam üzerinde akması sağlandı.

Direkt yöntemde bir ikinci yöntem olarak, İsviçre' deki prenatal merkezinin uyguladığı metod izlendi. Bu yöntemde dissekte edilmiş villuslar, içinde Chang mediumu bulunan 35 mm' lik petrilere, 37°C de % 5' lik CO<sub>2</sub>' li etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 3 saat önce kolşisin ( 2 µg / ml ) ilave edildi. Bu süre sonunda, ortam uzaklaştırılarak 4 ml % 1' lik sodyum sitrat ilave edilerek 37°C' de 20 dakika bekletildi. Hipotonik solüsyon alınarak 1 ml fiksatif ( 3 metanol : 1 glasiyal asetik asit ) ile yıkandı ve 4 ml daha fiksatif ilave edilerek 15 dakika fikse edildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra 4 ml fiksatif eklendi ve az 30 dakika bekletildi. Fiksatifin tümü alınarak, fiksatifin villuslardan uzaklaşması için 5 dakika beklendi. Villusların üzerine % 60' lik asetik asitten 8 - 12 damla ilave edildi. Dissosiasyon inverted mikroskopta gözlenerek üzerine 2 damla metanol eklendi. Dissosiyeye olmuş hücreleri içeren fiksatif, 37°C' lik ısıtıcı tabla üzerindeki her bir lama 4 damla damlatılarak eğik pipet yardımıyla 5 kez lamın bir ucundan diğer ucuna yayıldı ve tozsuz bir ortamda kurumaya bırakıldı ( 58 ).

### **Kültür Yöntemi**

Kültür için farklı iki ortam ve etüv kullanıldı. Çalışmamızın başında villuslar, RPMI 1640 ve daha sonra Chang medium kültüre edildi.

RPMI 1640 kullanılarak yapılan kültürde, serumlu ortam içinde parçalanmış villuslar, 25 cm<sup>2</sup> lik flasklere ( Greiner Kat. no: 690 190) alındı ve üstlerine hafifçe bastırılarak ezildi. Flaskte yarım saat kadar kurumaları sağlandıktan sonra üzerine 2 ml serumlu RPMI 1640 ilave edildi. Bakteriolojik etüde 37°C' de inkübe edildi. Yeterli üreme elde edilinceye kadar her 3 günde bir ortam değiştirildi. Change mediumu kullanıldığı zaman korion villuslar, serumsuz RPMI 1640 içinde cerrahi ince uçlu makas ile parçalandı. Küçük parçalar, ortalama olarak her flaske 10 - 15 parça olmak üzere, flasklerin içine yerleştirildi. Hafifçe ezildi ve kuruyup yapışmaları için % 5 CO<sub>2</sub>' li etüde 37°C' de yarım saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 4 ml Chang ortamından ilave edildi. Üreme oluncaya kadar her dört günde bir ortam değiştirildi. İverted mikroskopta her gün izlenerek, ortalama olarak her mikroskop sahasında 1 - 2 mitotik hücre görüldüğünde, flaske kolşisin ( 0.4 µg / ml ) ilave edildi ve 3.5 saat % 5 CO<sub>2</sub>' li etüde 37°C' de inkübe edildi ve harvest işlemine geçildi. Harvest işlemine; flask içindeki ortam, 15 ml' lik , ağzı kapaklı, steril, plastik konik santrifüj tüpüne ( Falcon Kat. no: 5221 ) alındı. Flask 2 ml serumsuz RPMI 1640 ile yıkandı ve bu yıkama solüsyonu da santrifüj tüpüne eklendi. İki kez tripsin [ Seromed Kat no: L 2143 ( % 0.05 tripsin, % 0.02 EDTA ) ] ile yıkandı ve 5 dakika % 5 CO<sub>2</sub>' li etüde 37°C' de inkübe edildi. Süre sonunda inverted mikroskopta incelendi. Tüm hücrelerin yuvarlaşarak kalktığı görüldüğünde 2 ml % 20 fetal calf serumlu RPMI 1640 flaske ilave edildi. Hafif mekanik titreşimler ile hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Flaskteki ortam pipetle alınarak santrifüj tüpüne ilave edildi ve flaske 2 ml % 20 Fetal calf serumlu RPMI 1640 ilave edilerek tekrar yıkandı. Bu ortam da santrifüj tüpüne eklendi. Santrifüj tüpü 1000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant

atılarak üzerine hipotonik şok için % 0.5' lik KCl ilave edildi. 20 dakika % 5 CO<sub>2</sub>' li etüvde 37°C' de inkübe edildi ve 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üsteki kısım atıldı ve üzerine 3 : 1 oranındaki metanol : glacial asetik asit fiksatifinden 7 ml ilave edildi. 1000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı üzerine 7 ml fikatif ilave edildi. Bir gece -20°C' de bekletildi. Dipfrizden alındıktan sonra fiksatif ortam ısısına getirildi ve 1000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Fiksatif tekrar değiştirilerek santrifüjlendi. Preparasyonda kullanılacakamlar % 10' luk asit - alkolde en az 10 dakika tutuldu, distile sudan ve % 96' lık alkolden geçirildi ve havada kurutuldu ve kullanmadan önce, dipfrizde en az 10 dakika tutuldu. Süpernatant 0.5 ml kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Çökelti, pipete fiksatifin hafif çekilip verilmesi ile süspansiyon hale getirildi. Bu süspansiyon soğuk lama 3 damla olmak üzere yayıldı ve sallayarak havada kurutuldu.

Kültür yönteminde, mekanik parçalamaya ilave olarak enzimatik dissosiasyon ( 46 ) da uygulandı. Korion villuslar steril santrifüj tüpüne alındı ve üzerlerine 3 ml % 0.05 tripsin % 0.02 EDTA solüsyonundan ilave edilerek oda ısısında 25 dakika hafif çalkalanarak bırakıldı. Süpernatant atılarak 3 ml tripsin tekrar ilave edildi ve 25 oda ısısında beklenildi. Hücre süspansiyonu santrifüj edildi, serumlu ortam ile yıkandı tekrar santrifüj edildi. Çökelti, kullanılacak ortam ile resüspanse edilerek flaslere aktarıldı. Bundan sonra kültür yöntemindeki metod izlendi.

Direkt yöntem ile elde edilen preparatların boyanması, pH=7 Söransan tampon' lu % 5' lik Giemsa solüsyonunda 5 dakika tutularak gerçekleştirildi. Boyama sonrası preparatlar çeşme suyu, distile sudan

geçirilerek havada kurutuldu. Mikroskopta, 100 X objektif büyütmesinde ortalama 15 metafaz değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

Kültür yöntem ile elde edilen preparatlar, % 5' lik Giemsa solüsyonunda 5 dakika tutularak boyandı, çeşme suyu ve distile sudan geçirildi ve havada kurutuldu. Mikroskopta 100 X objektif büyütmesinde ortalama 15 metafaz değerlendirildi. Fotoğrafları çekildi.

Benet' in yönteminde ( 1 ) bazı modifikasyonlar yapılarak, 3 - 5 günlük yaşlanmış preparatlara GTG bantlama uygulandı. Bu amaçla preparatlar 2 x SSC' de 60°C' lik benmaride 10 dakika tutuldu, çeşme suyu ve distile sudan geçirildi. % 0.25' lik tripsinde [ % 5' lik Tripsin ( Difco 1 : 250 Kat. no: 0153 ) 5 ml, serum fizyolojik 95 ml ] 15°C' de 40 saniye tutuldu. pH=7 Söransan tampon' da 1 dakika bekletildi. % 10' lik Söransan tamponlu Leishman solüsyonunda [ % 1' lik Leishman' stain ( Sigma Kat no: L 6254 ) ] 20 dakika boyandı, çeşme suyu ve distile sudan geçirilerek havada kurutuldu. İmmersiyon büyütmesinde ortalama 15 metafaz değerlendirildi. Fotoğrafları çekildi.

### **Maternal kandan fetal karyotip belirlenmesi**

Korion biopsisi yapılan gebelerden alınan 5 ml heparinize periferik kana, rutin lenfosit kültürü bazı modifikasyonlar ile uygulandı. 5 ml heparinize periferik kan 15 ml' lik steril kapaklı santrifüj tüpüne alındı ve 30 dakika 37°C' lik etüvde bekletilerek eritrositlerin çökmesi sağlandı. Serumda süspansen lenfositler diğer bir steril santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken lenfositlerin üzerinde 0.5 ml süpernatant bırakıldı ve üzerine 1 ml lenfosit ortamından konarak hücreler süspansen edildi. Ortam içinde süspansen edilen lenfositler pastör pipeti ile



alınarak kültür şişelerine aktarıldı ve 37°C' de 72 saat inkübe edildi. Süre bitiminden bir saat önce lenfosit kültürüne kolşisin ( 0.3 µg /ml ) ilave edildi. Süre bitiminde, korion villusların kültür yönteminin hipotonik basamağından itibaren harvest işlemi uygulanarak preparasyonu yapıldı. % 5' lik Giemsa boyama ile boyanan preparatlarda ortalama 100 metafaz sayıldı. Ayrıca preparatlara, literatürde tanımlandığı gibi Y kromatini fluoresan boyama uygulandı ( 26 ).

Quinacrin boyama solüsyonu:

Quinacrin dihidrochlorit ( Sigma Kat no: Q 0250)	100 mg
MacIlvaine tampon ( pH=5.6 )	200 ml

MacIlvaine Tampon ( pH=5.6 ):

Sitrik asit	2.1 g
di Sodyum hidrojen fostaf	3.9 g
Distile su	500 ml

Preparatlar, Quinacrin solüsyonunda 15 dakika karanlıkta bırakıldı. Fazla Quinacrin uzaklaştırmak için çeşme suyunda yıkandı ve MacIlvaine tamponunda 1 dakika bekletildi. Lamların üzerine iki damla tampon konarak lamelle kapatıldı ve fluoresan mikroskopta 450 - 500 nm dalga boyunda incelendi. Fotoğrafları çekildi.

Fotoğraf çekimlerinde Kodak II 100 film kullanıldı. Preparatların aydınlık alan, karanlık alan, faz kontrast ve fluoresan mikroskobunda çeşitli mikroskop büyütmelerinde fotoğrafları çekildi.

## BULGULAR

Araştırmamızda çalışılan Korionik villuslar ve maternal kan, SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesi ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinden ilgili uzmanlarca, ailenin isteğine bağlı düşük yapacak gebelerden ve belirli endikasyonları nedeniyle prenatal tanı uygulanacak gebelerden alındı.

SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesinden düşük yapacak 60 gebeden ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinden 10 gebeden küretaj veya biyopsi yoluyla korion villuslar elde edildi.

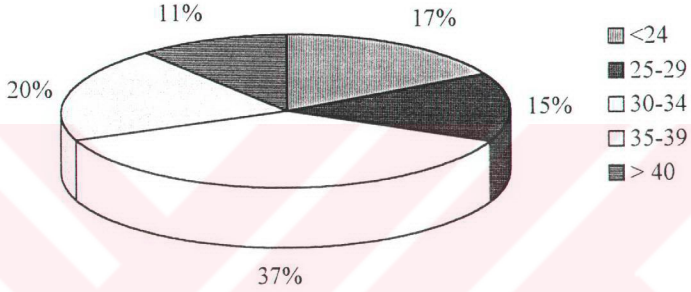
Prenatal tanı amacıyla korion biyopsisi, SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesinden 3 gebeden ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinden 2 gebeden elde edildi.

Tüm gebelerden korion villuslara ilaveten 5 ml heparinize periferik kan da alındı.

Çalışmamızda, korion villus örnekleme ve maternal kan çalışılan gebelerin yaş ortalaması 31.39 ve standart sapması 5.81 di. Materyal alınan gebelerin en genç olanı 21 yaşında ve en yaşlı olanı ise 42 yaşındaydı.

Yaş dağılımları incelendiğinde ( Tablo 1 ), 13 gebe 25 yaşın altında ve tüm gebelerin % 17' sini oluşturmaktadır. 25 - 29 yaş arasındaki gebelerin sayısı ise 11 olup yüzde olarak % 15 dir. Tüm gebelerin

% 37' sini oluşturan ve yaşları 30 ile 34 arasında olan 28 gebe en büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. 15 gebe ise 35 - 39 yaş grubunda olup % 20 oranında bir çoğunluğu oluşturmaktadır. 39 yaşından daha büyük olan gebelerin sayısı 8 dir ve bunların oranı ise % 11' dir.

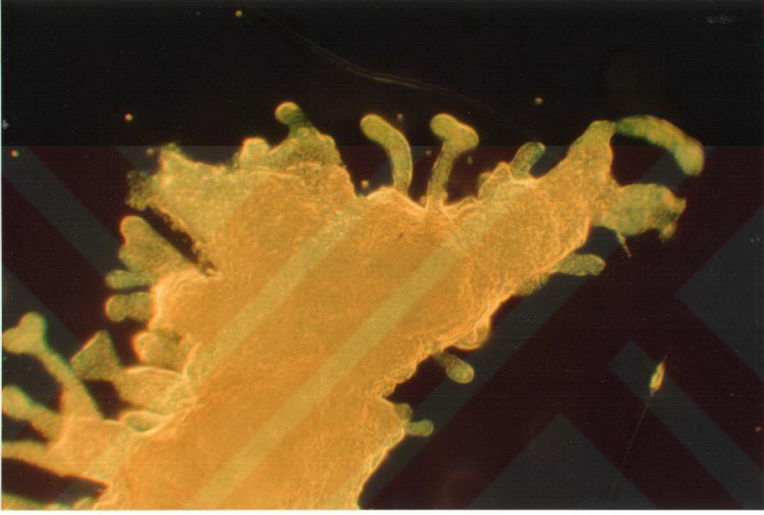


Tablo 1. Korion villus ve maternal kan alınan gebelerin yaş dağılımı.

Prenatal tanı amacıyla korion villus örnekleme uygulanan gebelerdeki endikasyonlar şunlardır. İleri yaş endikasyonu ( 10 haftalık gebe 40 yaşında ), bir önceki çocukta aneuploidi ( Down sendromunu bir çocuk sahibi 10 haftalık iki gebe ), ultrasonda gözlenen fetal anomali ( Ekstremitte anomalisi, nokal ödem gözlenen 12 haftalık iki gebe ) dir.

Bu beş gebeye, korion villus örnekleme için ilgili uzmanlarca, ultrason kontrolünde ve transservikal veya transabdominal olarak 1 veya 2 kez kateter ile girildi ve 30 - 50 mg korion villus materyali elde edildi. Düşük yapan gebelerden alınan korion villus materyalleri 50 mg üzerindedir.

Alınan Korion villuslar ve maternal kan en kısa zamanda E. Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalındaki laboratuvarımıza getirildi. Gereç ve yöntemdeki anlatılan işlemler uygulandı. Çalışmamızda ilk olarak Korion villus örnekleme ile ilgili bulgular verilmektedir.

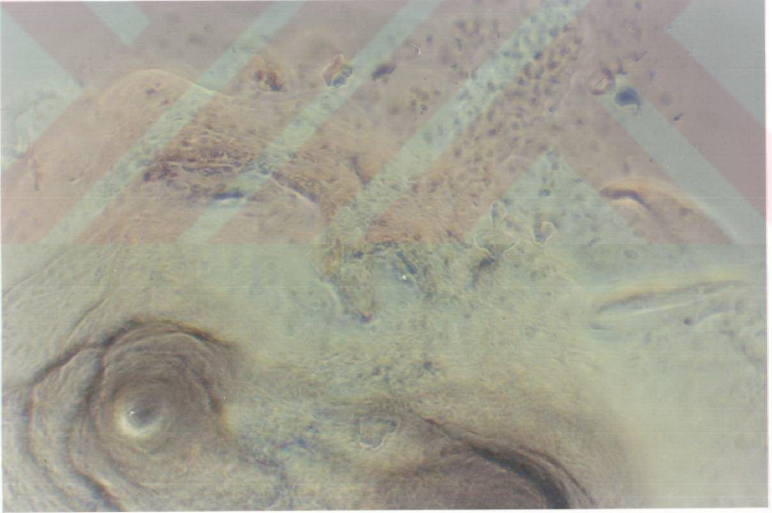


Resim 1. Dissekte edilmiş korion villus [ Karanlık alan ( 200 x ) ]

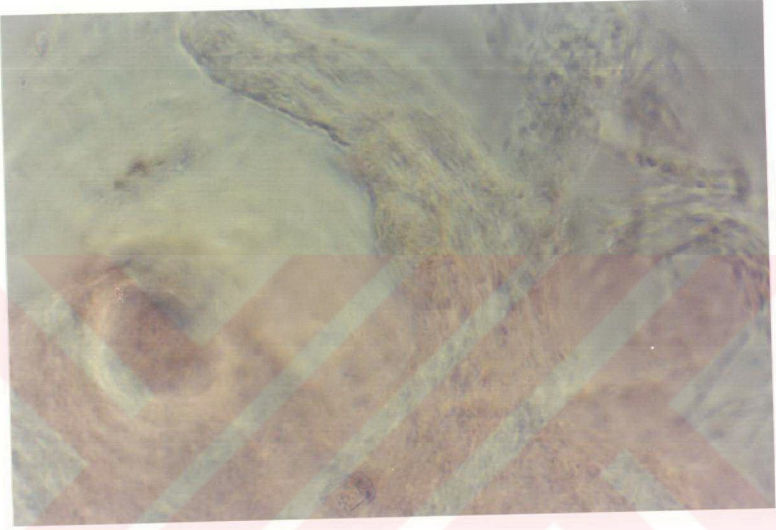
Resim 1' de Steromikroskopta iki adet enjektör iğnesi ile çok dikkatli bir şekilde dissekte edilerek deciduanın uzaklaştırıldığı ve karanlık alan fotoğrafı çekilen korion villus görülmektedir. Maternal kontaminasyonun önlenmesi için deciduanın uzaklaştırılması mutlaka gereklidir.

### Direkt yöntem

SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesinden alınan 57 korion villus materyali ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinden alınan 3 korion villus materyali, deciduadan temizlendikten sonra kolşisin içeren % 20 Fetal calf serum' lu RPMI 1640' a alındı ve 3, 24 ve 48 saatlik değişik sürelerde 37°C' lik bakteriyolojik etüde inkübe edildi. Harvest işlemindeki, korion villuslara % 60' lik glacial asetik asit ilave edilmesiyle, korionun sinsitiotrofoblast tabakasının eriyip sitotrofoblastların ortaya çıkışı Resim 2 ve 3' te gösterilmektedir.



Resim 2. Fiksatif içindeki Korion villusların görünümü [ Faz kontrast (260 X ) ].



Resim 3. % 60' lık glacial asetik asit ile Sinsitiotrofoblastların eriyişi  
[ Faz kontrast ( 260X)].

RPMI 1640 mediumu ile çalışılan, 60 gebeden elde edilen metafazların değerlendirilmesi sonucu, , korion villus materyalinden direkt yöntem ile 3 sonuç elde edilebildi. Bunlardan iki tanesi 46, XX karyotipinde ve bir tanesi 46, XY karyotipindedir. Başarı oranımız ise oldukça düşük olup % 5 tir.

Ayrıca 24 - 48 saatlik kısa süreli kültürlerde, SSK İzmır Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesinden alınan 3 korion villus

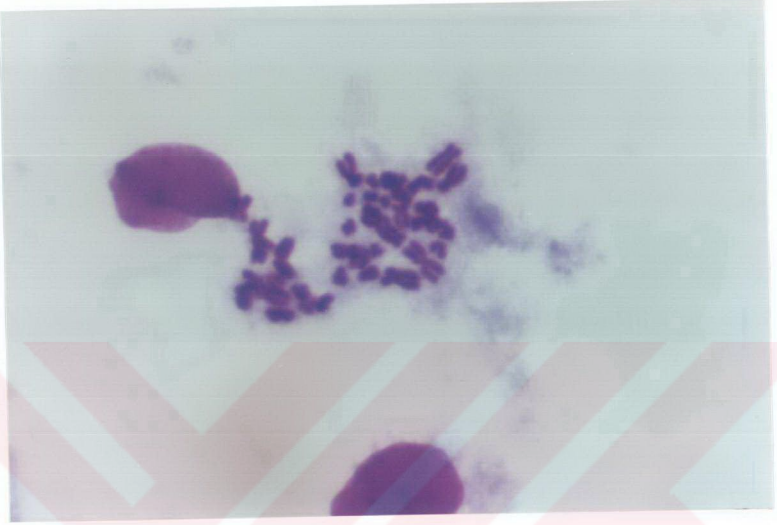
materyaline, E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinden alınan 7 materyale ve prenatal tanı için de alınan 5 materyale Chang mediumu kullanıldı ve % 5' lik CO<sub>2</sub>' li etüvde inkübe edildi. Direkt yöntemde bu materyallerden biri hariç diğerlerinden sonuç elde edilemedi .

Chang ortamında sonuç elde edilen villuslar, İsviçre' deki ( 58 ) merkezin uyguladığı metoda göre çalışıldı ve yeterli sayıda ve kaliteli metafazlar elde edildi. Chang ortamındaki direkt yöntemdeki başarılarımız, prenatal tanı için olanları da dahil ettiğimizde % 7 dir (Tablo 2 ).

	RPMI 1640	CHANG	Prenatal tanı
Gebe sayısı	60	10	5
Karyotip sonucu	2 ( 46, XX ) 1 ( 46, XY )	1 ( 46, XX )	-
Başarı yüzdesi	5	10	0

Tablo 2. Direkt yöntem ile çalışılan gebelerin sayısı ve başarı yüzdesi

Kısa süreli Chang mediumdaki kültürlerde hipomodal veya kalitesiz metafazlar elde edilebildi ( Resim 4. )



Resim 4. Kısa süreli kültürde elde edilen kalitesiz bir metafaz plağı ( 2600 X ).

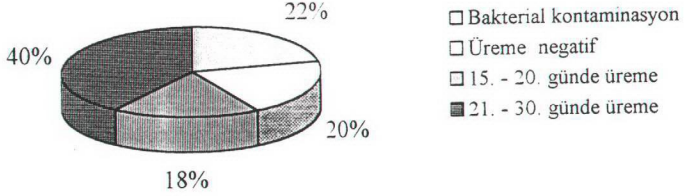
#### **Kültür Yöntemi**

Kültürü yapılan korion villuslara zorunluluktan dolayı iki farklı ortam ve iki farklı etüv kullanıldı. 60 korion villus materyali, % 20 Fetal calf serumlu RPMI 1640 ortamında ve 37°C' lik bakteriyolojik etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun 6. gününden itibaren her gün flaskler incelendi ve 3 günde bir 4 ml serumlu RPMI 1640 ile ortam değiştirildi.

Bu şekilde kültürü yapılan korion villusların 13' ünde ( % 22 ) bakterial kontaminasyon nedeniyle kültüre son verildi, 12' sinde ( % 20 ) hiç bir üreme gözlenmedi, 11' inde ( % 18 ) 15. - 20. günlerde üreme



görüldü ve 24' ünde ( % 40 ) ise 21. - 30. günlerde üreme görüldü ( Tablo 3 ).

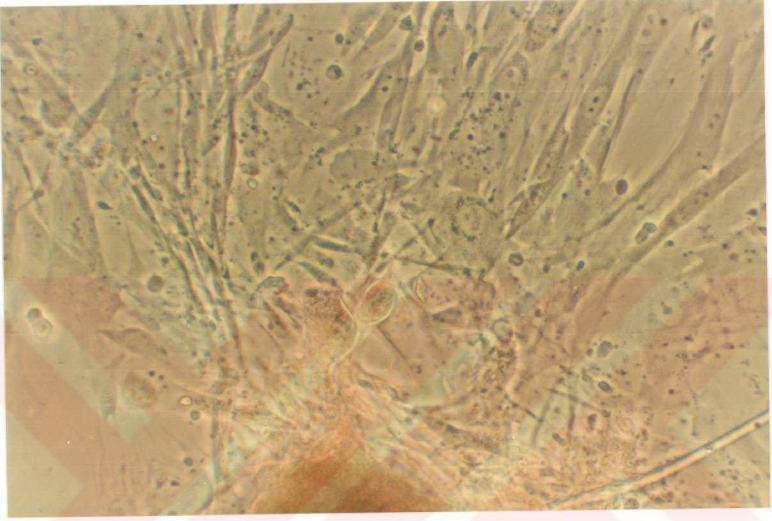


Tablo 3. Kültür gelişimi

Korion villuların flasklerdeki kültürde çok yavaş bir şekilde çoğalma gösterdiği gözlemlendi ve günlük gözlemlerde her bir flaskteki ortalama mitotik hücre sayısı 5' i geçmedi. Bunun sonucu olarak flasklerin harvestinde az ve hoploid sayıdan fazla fakat tam olmayan metafaz ( hipomodal ) plakları elde edildi ve 60 vakadan sadece 2' sinde sonuç elde edilebildi. Bunlar 46, XX karyotipindeydi.

Ayrıca korion villuslar % 0.05' lik tripsin ile diseksiyona uğratıldı ve elde edilen mezenşim hücrelerin kültüründe de üremenin yavaş olması nedeniyle başarılı sonuç elde edilemedi.

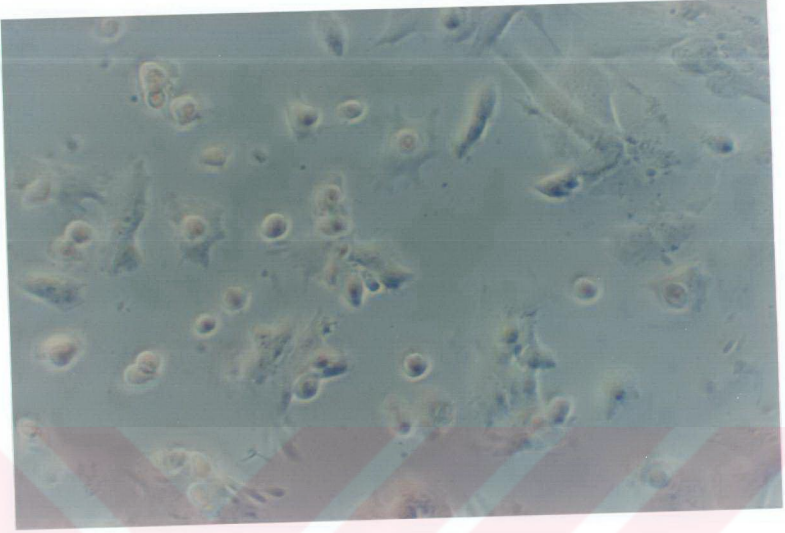
Kültür yönteminde, SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesinden alınan 3 korion villus materyaline, E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinden alınan 7 materyale ve prenatal tanı amacıyla alınan 5 materyale ortam olarak Chang medium ve etüv olarak % 5 CO<sub>2</sub>' li etüv kullanıldı. Bu şekilde kültürü yapılan korion villuslarda 5. - 7. günlerde belirgin bir üreme başladığı gözlemlendi ( Resim 5 ).



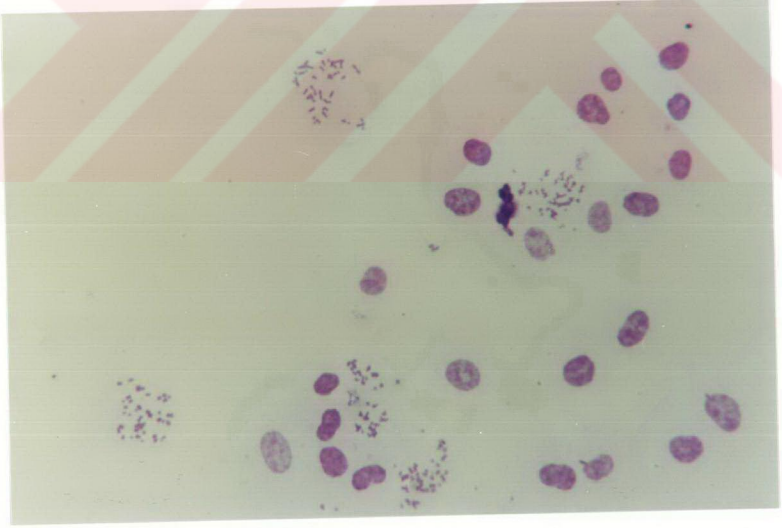
Resim 5. Chang mediyumu ile üremenin başladığı görülmektedir [ Faz kontrast ( 260 X ) ].

Her gün inverted mikroskopta gözlem yapılan kültürlerde, 12. - 16. günlerde her bir mikroskop alanında en az 1 - 3 mitotik hücre gözlemlendi. Bu seviyeye gelmiş kültürler durdurularak harveste geçildi ( Resim 6 ).

Yüksek sayıdaki mitotik hücrelerin bulunduğu flasklerin harvesti sonucu elde edilen preparatlar incelendiğinde bu aktivasyona paralel olarak lamlarda çok sayıda metafaz plakları bulunduğu gözlemlendi. Metafaz plakların açılması değerlendirmeye uygun, kromozom kalitesi iyi ve bir çoğu tam sayıda kromozom içeriyordu ( Resim 7 ).



Resim 6. Bir mikroskop alanında görülen mitotik hücreler [ Faz kontrast ( 260 X ) ].



Resim 7. Harvest sonucu fazla sayıda olan metafaz plaklarının görüntüsü ( 1060 X ).

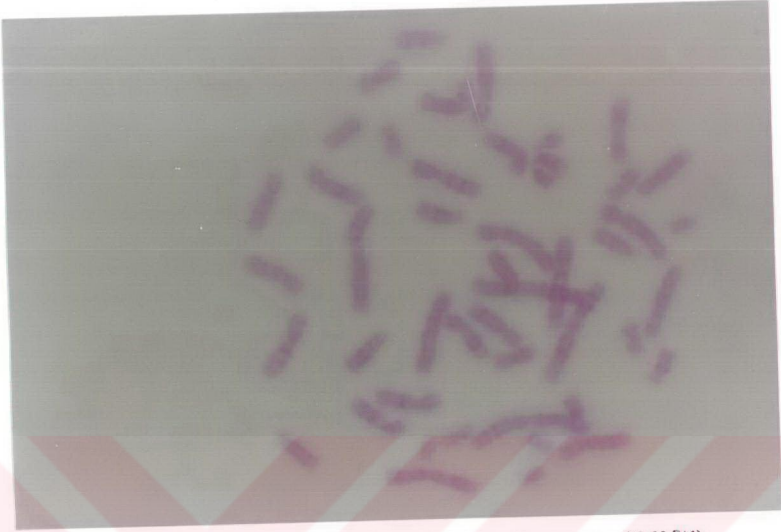
Her bir olguda, Giemsa boyalı 15 metafaz ve GTG bantlı 15 metafaz değerlendirildi. Elde edilen karyotip sonuçlarına göre; 46, XX karyotipinde 8 vaka ( % 53 ) ve 46, XY karyotipinde ise 7 vaka ( % 47 ) gözlemlendi.

Bu gruba dahil olan prenatal tanısı yapılan vakalar incelendiğinde, 2 gebenin 46, XX karyotipli ( % 40 ) ve 3 gebenin 46, XY ( % 60 ) karyotipli fetüsü olduğu bulundu ( Resim 8, 9 ). Bu karyotipleri doğum sonrası cinsiyetler de teyit etmektedir.

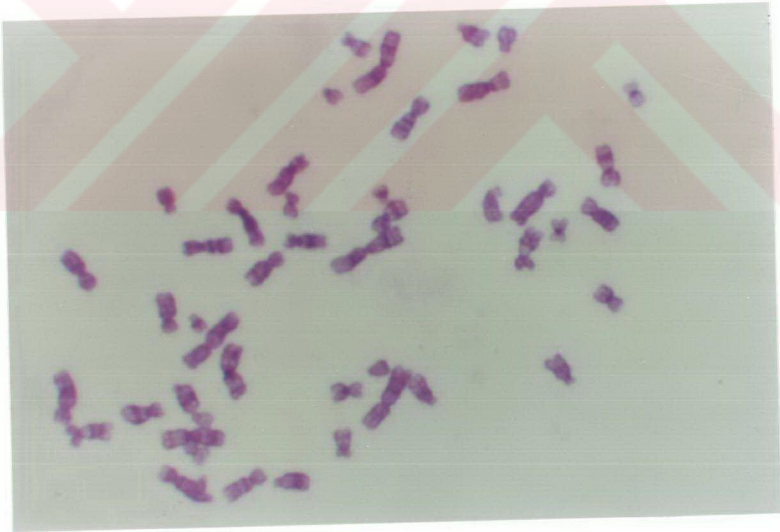
Chang mediumunun kullanıldığı 15 olguyu içeren grubun hiç birinde mozaikizme, maternal hücre kontaminasyonuna ve kromozom sayı ve şekil anomalisine rastlanılmadı. Başarı oranının Chang medium ile % 100' e ulaştığı gözlemlendi ( Tablo 4 ).

	Chang medium	Prenatal tanı
Gebe sayısı	10	4
46, XX' li fetüs sayısı	6	2
46, XY' li fetüs sayısı	4	3
Fetal anomali	-	-
Başarı yüzdesi	100	100

Tablo 4. Chang mediumu ile korion villusların kültüre edilmesinden elde edilen sonuçlar.



Resim 8. 46, XX genotipinde bir fetüsün GTG bantlı preparatı ( 2600X)

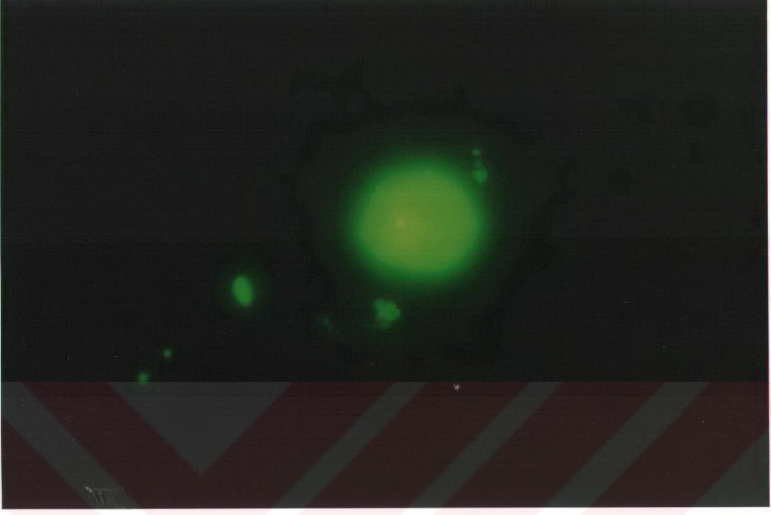


Resim 9. GTG bantlama ile 46, XY yapısındaki bir fetüsün kromozomları ( 2600 X).

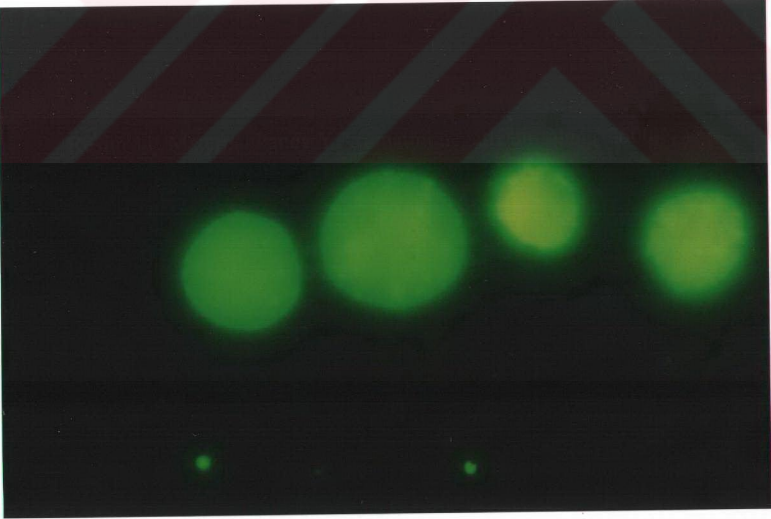
### **Maternal Kan**

Maternal kandan fetüs karyotipini elde edilmesi ile ilgili çalışmamızda, maternal kanın kültüre edilmesiyle, 75 olgudan metafaz elde edildi ve her bir bireyde en az 100 metafaz sayıldı ve özellikle korion villus örneklemesinde erkek fetüsü olduğu anlaşılan gebelerin kanında 200 metafaz değerlendirildi. İncelenen tüm olgularda, 46, XX karyotipindeki metafazlar gözlemlendi. Korion villus örnekleme sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, maternal kanda, erkek fetüsler ait metafazlara rastlanılmadı.

Ayrıca korion villus örneklemesinde erkek fetüsü olan gebelerin lenfosit kültürleri Y kromatini flouresans boyama yöntemi ile de incelendi. Bu çalışmada, normal erkek karyotipli lenfosit kültürü kontrol amacıyla kullanıldı. Anne lenfositlerinin flouresan mikroskopta incelenmesiyle Y kromatinini içeren fetal hücrelere rastlanılmadı ( Resim 10, 11 ) .



Resim 10. Y kromatini pozitif bir erkek birey ( 2600 X ).



Resim 11. Maternal kanda Y Kromatini negatif bir alan ( 2600 X ).

## TARTIŞMA

Korion villus örnekleme, Çin' de gebeliğin 47. - 100. günleri arasında korion villuslarda seks kromatinine bakarak fetüsün cinsiyetini tayin etme ( 12 ) ile başlayan ve günümüze kadar olan zamanda çeşitli araştırmacıların ( 2, 41, 51, 55 ) katkısıyla oldukça başarılı bir şekilde gelişen, gebeliğin 8. - 12. haftaları arasında fetal anomalilerin ortaya çıkarılması sağlayan rutin bir metod haline gelmiştir. Buna paralel olarak, bir çok araştırmacı, korion villus örneklemesinin çeşitli kriterleri ile ilgili olarak geniş kapsamlı araştırmalar da yapmışlardır ( 5, 7, 10, 13, 16, 22, 24, 33, 34, 35, 38, 39, 57 ).

Rutin uygulamalar dışında, gebeliğin çok daha erken evrelerinde erken korion villus örnekleme ( 3 ) ve oligohidroamniyoz veya anormal ultrason bulgularında hızlı sonuç alabilmek amacıyla ikinci veya üçüncü trimestrede geç korion villus örnekleme uygulamaları da ( 6, 25, 47 ) başarılı bir şekilde yapılmaktadır.

Korion villus örneklemesinde, yüksek başarıyı sağlayan Chang mediumu, Chang ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. 1982 yılında yaptıkları çalışmada Dulbecco - Vogt modified Eagle's medium ( DVME ) ile Ham' s F 12 mediumunun 1 : 1 karışımına 10 çeşit büyüme uyarıcı faktörlerin eklenmesiyle çoğalmanın % 313 kez arttığını ileri sürmüşlerdir. Bu 10 çeşit büyüme uyarıcı faktör ve konsantrasyonları aşağıda verilmiştir.



Transferrin 10 µg / ml, Selenium 40 nM, İnsulin 20 µg / ml, Triiodotironin 0.2 nM, Glukagon 2 µg / ml, Fibroblast growth faktor 20 ng / ml, Hidrokortizon 2 nM, Testesteron 2 nM, Estradiol 2 nM ve Progesteron 2 nM dir. Bu ortama % 4 Fetal bovin serum eklenmesiyle maksimum çoğalmanın elde edildiğini ileri sürmüşlerdir ( 8 ).

Simoni ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, korion villus örneklemede, Chang mediumu ile RPMI 1640 ortamını karşılaştırmışlardır. Petrilerdeki ortalama büyüme alanlarının, RPMI 1640 mediumunda 3 - 17 arasındayken Chang mediumunda 19 - 43 arasında değiştiğini ve kültür zamanının, RPMI 1640 mediumunda 8. - 16. günlerden 4. - 7. güne kıaldığını göstermişlerdir. Korion villus çalışmalarında, başarılı sonuç için mutlaka Chang mediumunun kullanılması gerektiğini tavsiye etmişlerdir ( 51 ).

Yaptığımız araştırmada, Korion villusların RPMI 1640 mediumunda en erken 15. günde üremeye başladığını, kültürün çok yavaş geliştiğini ve bu yüzden başarı oranının çok düşük kaldığını gördük. Başarı oranımızın düşük olmasında, ayrıca zorunluktan dolayı kullanılan bakteriyolojik etüvün de olumsuz etkisinin olduğu göz ardı edilmedi.

Çalışmamızda, Chang mediumunun korion villus kültüründe kullanılmasıyla, 6. günde hücre üremesinin mutlaka başladığını gözledik ve 12. - 16. günler arasında yeterli üreme sağlanarak % 100 başarı ile fetal karyotip elde ettik. Kültürün, gerektiği gibi, CO<sub>2</sub>' li etüvde yapılmasının da bu başarıda katkısı vardı.

Caccia ve arkadaşları araştırmalarında, maternal - fetal bağlanmanın en erken olarak gebeliğin 10. haftasında başladığı ve artmaya devam

ettiğini göstermişlerdir. Bu nedenle, gebelerin prenatal tanı için ilk trimestreyi tercih ettiklerini bildirmişlerdir ( 5 ).

Young ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, korion villus örneklemesinde kateter giriş sayısı ile fetal kayıp arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Kateterin bir kez girişinde, fetal kayıp oranını % 3.1, iki kez girişinde % 5.7 ve üç kez girişinde ise % 12.8'e yükseldiği ve kateter girişinden sonra en belirgin komplikasyonun kanama ( % 12 ) olduğunu belirtmişlerdir ( 57 ).

Araştırmamızda, prenatal tanı için korion villus biyopsisi uygulanan beş gebeye kateter ile 1 veya 2 kez girildi ve fetal kayıp gözlenmedi. Prenatal tanısı yapılan 5 gebelikte normal doğum ile sonuçlandı.

Silver ve arkadaşları 1990 yılında yaptıkları çalışmada, korion villus örnekleme çalışmalarına başladıkları 16 aylık dönemde öğrenme eğrilerini açıklamışlardır. Bu dönemde transservikal aspirasyondan transabdominal aspirasyona geçtiklerini, tek aspirasyon başarısının % 40' lardan % 80' lere yükseldiğini ve yeterli miktarda villi elde ettiklerini bildirmişlerdir ( 50 ).

Copeland ve arkadaşları transservikal ve transabdominal aspirasyonu karşılaştırmışlar ve transabdominal teknikle, tek kateter girişi ( % 98 oranında ) ile korion villus aspirasyonunun 10 mg ve daha fazla doku elde etmedeki başarılarının % 99 oranında olduğunu ve transabdominal aspirasyonun daha başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir ( 10 ).

Çalışmamızda, korion villusları elde etmek için, iki gebeye transservikal aspirasyon ve üç gebeye transabdominal aspirasyon uygulandı ve elde ettiğimiz korion villus materyali 30 - 50 mg kadardı.

Jonhson ve arkadaşları 1990 yılında yaptıkları çalışmada, 1983 - 1988 yılları arasında 4395 fetüsü ( 70 ikiz, 3 üçüz ) içeren 4319 gebelikte başarılı prenatal tanı yapmışlardır. Elde ettikleri verilere göre mezenşimal kor hücrelerinin ( kültür yöntemi ), fetüsün gerçek durumunu yansıtmada sitotrofoblastlara ( direkt yöntem ) oranla çok daha kesin sonuç verdiğini açıklamışlardır. Ayrıca plasental mozaik grup ( % 16.7 ) ile mozaik olmayan grubu ( % 2.7 ) karşılaştırdıklarında prenatal kayıp oranında belirgin bir artış (  $p=0.0001$  ) gözlemişlerdir ve buna dayanarak prenatal kayıpların sebepleri arasında plasental mozaisizmin olabileceğini de ileri sürmüşlerdir ( 29 ).

Leschot ve arkadaşları 1250 gebeliğe direkt yöntem kullanarak korion villus örnekleme uygulamışlar ve başarı oranlarının % 96.4 olarak tanımlamışlardır. Çalışmalarında % 4.8 oranında kromozomal anomali ve % 2.3 oranında yanlış pozitif sonuç bulmuşlardır ( 35 ).

İlk uyguladığımız direkt yöntemde başarı oranımız çok düşük oldu. Sonradan uyguladığımız direkt yöntem ( 58 ) ise laboratuvar koşullarımıza daha iyi uyum gösterdi ve başarılı sonuç elde ettik. Bu yöntemin, bazı değişiklikler ile rutin olarak laboratuvarımızda uygulanabileceği ve direkt yöntem ile tanı konusunda başarılı sonuçlar elde edeceğimize inanıyoruz. Bununla birlikte, bazı merkezler prenatal tanıda direkt yöntemi kullanmayıp sadece kültür yöntemini kullanmaktadır ( 33 ).

Bhatia ve arkadaşları, korion villus örneklemesinin direkt yöntemin preparasyonunda, standart teknik yerine gravite metodu diye adlandırdıkları bir metod geliştirmişlerdir. Bu metodun uygulamasını şöyle tanımlamışlardır; 10° eğimli 40° C ısıtılmış lama 6 damla hücre süspansiyonundan damlatmışlar ve lamenin karşı tarafına kadar yavaşça akmasını sağlamışlardır. Daha sonra lamlar 90° döndürülerek geri akması sağlanmıştır. Bu yöntemi klasik yöntemle karşılaştırdıklarında gravite metodunda, ortalama olarak her bir lamdaki metafaz sayısının 46.4, klasik metotta ise 14 olarak saptamışlardır. Ayrıca lam kalitesinin de tam metafaz sayısında önemli olduğunu savunmuşlardır. Standart lamlarda, başarı oranının % 42 ve yüksek kalite Carl - Ziess lamlarda ise % 74 oranında olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak metafaz sayısının arttırmada, gravite metodu ve yüksek kalite lam kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir ( 2 ).

Çalışmamızda gravite metodu da denenmiş olup direkt yöntemde başarılı sonuç alınmadı. Bununla birlikte yüksek kalite lam kullanılmadı.

Ledbetter ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, fetüs ile korion villus arasındaki uyumsuzluğun yüksek frekansı, postzigotik nondisjunction ile embriyonun karyotipinden farklılaşan ekstra embriyonik orjinli hücrelerde korion villus analizin yapılmasından dolayı oluştuğunu ileri sürmüşlerdir.

Korion villus örneklemesinde mozaisizmi, aynı aneuploidinin direkt yöntemde bir çok hücrede veya kültür yönteminde birden fazla kültürde ve ayrıca direkt ve kültür metodunun her ikisinde görülmesi olarak tanımlamışlardır. Korion villus örneklemesinde mozaisizm oranının % 0.83 oranında olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yaptıkları çalışmada, direkt metodun yanlış - pozitif sonuç verdiği ve buna dayanarak fetal durumu belirlemede, direkt metod sonuçlarının, kültür metodundan elde edilen sonuçlara oranla fetüsü daha az temsil ettiğini savunmuşlardır.

Tek kültürde tanımlanan aneuploidi veya tek hücre trizomilerini pseudomozaisizm olarak tanımlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, pseudomozaisizm oranını, korion villus örneklemesinde % 1.8 olarak bulmuşlardır ve bu vakaları onaylamak için ikinci bir sitogenetik analiz uygulamışlardır. Bu analiz sonuçlarına göre, hiç bir gebelik kaybı veya artmış major anomali frekansı görülmediğinden dolayı korion villus örneklemesinde, pseudomozaisizmin küçük bir klinik önemi olabileceğini savunmuşlardır.

Korion villus örneklemesinde, maternal hücre kontaminasyonu, direkt preparasyonlarda ender fakat kültürlerde % 0.93 oranında olduğunu göstermişlerdir. Dişi fetüslerde, maternal hücre kontaminasyonu gösterilemediğinden dolayı maternal hücre kontaminasyonunun toplam frekansına, XX / XY frekansının iki ile çarpılmasıyla yaklaşılabileceği ve bu oranın % 1.9 olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu insidansın kültür metodunda, sitogenetik hatalara veya yanlış cinsiyet tanımlamalarına yol açmada potansiyel bir problem oluşturduğunu ve buna ek olarak korion villus örnekleme materyalinin biyokimyasal ve DNA analizleri için önemli bir problem oluşturduğunu savunmuşlardır ( 33 ).

Araştırmamızda, başarılı sonuç elde edilen verilerin azlığından dolayı mozaisizm, pseudomozaisizm ve maternal hücre kontaminasyon oranlarını vermenin doğru olmayacağı kanısındayız.

Johnson ve arkadaşları, fetal kayıplardaki kromozomal anomalileri araştırmak için postmortem korion villus örnekleme uygulandı. Placentanın, fetüsün ölümünden sonra da canlılığını devam ettirdiğini ve korion villus örneklemesinin, diğer abortus materyallerinden ( deri kültürü, amniosentez ) daha hızlı ve güvenilir sonuç verdiğini açıklamışlardır. Yaptıkları çalışmada, fetal ölümlerin % 95.7' sinde kromozomal anomaliler bulmuşlardır. Bu anomalilerin % 69.56' i trizomiler, % 13' nü turner sendromu, % 4.3' nü triploidi ve % 4.3' nü multipli trizomi oluşturduğunu açıklamışlardır ( 30 ).

Sonuç olarak, korion villus örneklemesinde, kısa zamanda ve başarılı sonuç elde etmede Chang mediumunun kullanılmasının daha yararlı olduğu kanısındayız. Korion villusların, deciduadan iyice temizlendikten sonra Chang mediumunda kültüre edilmesiyle, kısa sürede hatasız prenatal tanı koyabileceğimize inanmaktayız.

Maternal kandan fetal hücre örneklemesinin lenfosit kültürü ile ilgili ilk araştırma, Walknowska ve arkadaşları tarafından 1969 yılında yapılmıştır. Çalışmalarında, klasik lenfosit kültürü ile gebelerin karyotipi incelemişler, 5 küçük akrosentrik kromozom bulunan metafazları erkek fetüse ait olduğunu kabul etmişler ve bu tür metafazlardan 21 olguda gözlemişlerdir. 5 küçük akrosentrik kromozomun maternal kanda bulunuşlarını incelediklerinde, 14. haftadan 18. haftaya kadar olan gebeliklerde ortalama olarak % 0.6 oranında, 18. haftadan 37. haftaya kadar olan periyotta ise % 0.4 oranında olduğunu gözlemişlerdir ( 54 ).

Aynı yıl, Jacobs ve Simith yayınladıkları makalede, Walknowska ve arkadaşlarının çalışmasındaki 5. küçük akrosentrik kromozomun her zaman

Y kromozomu olamayacağını belirtmişler ve merkezlerinde lenfosit kültürü yapılmış, hikayesinde teropötik irradiasyon hikayesi olmayan ve yaş dağılımı 1 hafta ile 77 yıl arasında olan 1285 bayanın, 17' sinde 5 küçük akrosentrik kromozom gözlendiğini bildirmişlerdir. Bu 17 bayandan iki tanesinin, ikiz gebelik olayının söz konusu olmadığı 1 haftalık bebek olduğunu, bir tanesinin asla hamile kalamayacak bir bayan olduğunu ve diğer tüm bayanlar ise kan alındığında hamile olmadığını açıklamışlardır ( 28 ).

Selypes ve Lorenz, maternal kandan fetal cinsiyet ve karyotipi elde etmek için yeni bir kültür yöntemi geliştirmişlerdir. Yaptıkları araştırmada, 7. - 36. haftalar arasındaki gebeleri incelemişler ve 2 olguda ( % 4.87 ) yanlış negatif, 1 olguda ( % 2.4 ) yanlış pozitif ve 38 olguda ( % 92.7 ) doğru olarak fetüsün cinsiyetini belirlemişlerdir. Fetal karyotipi incelediklerinde, 3 olguda kromozom anomalisi bulunduğunu saptamışlardır ( 48 ).

Çalışmamızda, 75 maternal kanın lenfosit kültürü yapıldı. Maternal kandan elde edilen metafazlar değerlendirildiğinde, özellikle korion villus örnekleme ile erkek fetüsü olduğu anlaşılanlar gebeler dahil hiç birinde 46, XY karyotipinde olan metafaza rastlanılmadı.

Selypes ve Lorenz, 1989 yılında editöre yazdıkları mektupta, 8. - 31. haftalık gebelerde, geliştirdikleri metodu kullanarak interfaz hücrelerinde X kromatin fluoresans pozitif hücreleri değerlendirdiklerini ve bu gebeliklerin hepsinde yeni doğan cinsiyetinin dişi olduğunu bildirmişlerdir ( 49 ).

Çalışmamızda, korion villus örnekleme ile erkek fetüsü olduğu anlaşılan gebelerin interfaz hücreleri Y kromatini yönünden de incelendi. Bununla birlikte, hiç bir interfaz hücresinde Y kromatini görülemedi.

Sonuç olarak, maternal kandan fetal karyotipe ait güvenilir sonuçlar elde edemediğimizden, bu yöntemin güvenilirliği hakkında ve korion villus örnekleme ile korelasyonu hakkında değerlendirme yapmamız mümkün değildir. Bununla birlikte, maternal kandan, immunolojik ve DNA analizleri ile fetüse ait bilgiler elde edilebilmektedir. Bu konuda çeşitli araştırmalar devam etmektedir ve gelecekte bu yöntemin de prenatal tanı yöntemleri içinde yer alacağına inanmaktayız.



## SONUÇ

Çalışmamızda, kadın hastalıkları ve doğum kliniklerinde, ilgili uzmanlarca, ailenin isteğine bağlı olarak düşük yapacak olan 6. - 12. haftalar arasındaki 70 gebeden küretaj veya biyopsi ile korion materyali elde edildi. Ayrıca belirli endikasyonlar nedeniyle, 10. - 12. haftalardaki 5 gebeden de prenatal tanı amacıyla transservikal veya transabdominal aspirasyon ile korion villuslar alındı. Tüm gebelerden 5 cc periferik kan da alındı.

Korion villus materyali, direkt ve kültür yöntemleri ile çalışıldı. Direkt yöntemde % 5 - 7 oranında başarı elde edildi. Kültür yönteminde, Chang mediumunun kullanılması ile % 100 başarı elde edildi. Prenatal tanı uygulanan gebelerin, 2 kız ve 3 erkek sağlıklı fetüse sahip olduğu ortaya kondu.

Maternal kandan fetüs karyotipini belirlemek amacıyla yapılan lenfosit kültüründeki incelemede, maternal kandan sadece annenin karyotipi içeren metafazlar elde edilebildi. Bundan dolayı korion villus örnekleme ile olan korelasyonu ortaya konamadı.

## ÖZET

Çalışmamızda, SSK İzmir Tepecik Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesi ve E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından ilgili uzmanlarca, ailenin isteğine bağlı olarak düşük yapacak olan 6. - 12. haftalar arasındaki 70 gebeden küretaj veya biyopsi ile ve ayrıca belirli endikasyonlar nedeniyle, 10. - 12. haftalardaki 5 gebeden de prenatal tanı amacıyla transservikal aspirasyon ile korion villuslar alındı. Maternal kandan fetüs karyotipini belirlemek amacıyla gebelerden 5 cc periferik kan da alındı.

Korion villus materyali, direkt ve kültür yöntemleri ile çalışıldı. Elde edilen preparatlara Giemsa boyama ve GTG bantlama yapıldı. Her ikisinden de ortalama 15 metafaz değerlendirildi. Direkt yöntemde, eksik metafazlar veya iyi kalitede olmayan kromozomlar elde edildi. Direkt yöntemde, % 5 - 7 oranında başarı elde edildi.

Kültür yönteminde, Chang mediumunun kullanıldığı 10 gebede ve prenatal tanı uygulanan 5 gebede başarı elde edildi. Gebelerin prenatal tanı endikasyonları şunlardır; ileri yaş endikasyonu ( 10 haftalık gebe 40 yaşında ), bir önceki çocukta aneuploidi ( Down sendromunlu bir çocuk sahibi 10 haftalık iki gebe ), ultrasonda gözlenen fetal anomali ( Ekstremitte anomalisi, nukal ödem gözlenen 12 haftalık iki gebe ) dir. Chang mediumu ile çalışılan olgulardan sekiz 46,XX ve yedi 46, XY karyotipi elde edildi. Prenatal tanı uygulanan gebelerin 2 kız ve 3 erkek sağlıklı fetüse sahip olduğu ortaya kondu.

Maternal kandan fetüs karyotipini belirlemek amacıyla yapılan lenfosit kültüründeki incelemede, preparatlar Giemsa ile boyandı ve ortalama 100 metafaz sayıldı. Sayım sonucunda maternal kanda sadece annenin karyotipini gösteren metafazlar elde edilebildi. Ayrıca preparatlarda Y kromatini de araştırıldı. Fakat Y Kromatini gösteren hücelere rastlanılmadı. Bundan dolayı korion villus örnekleme ile olan korelasyonu ortaya konamadı.



## SUMMARY

In this study, chorion villi were extracted by curettage and biopsy from 70 women in their 6. - 12. weeks of pregnancy and decided to have abortion, and by transcervical or transabdominal aspiration from 5 women in their 10. - 12. weeks of pregnancy decided to undergo prenatal diagnosis in Gynecology and Obstetrics clinics of two hospitals. Additionally, 5 cc blood was drawn from each patient for determining fetal karyotype.

Chorion villi material were examined by direct and culture methods. Preparations were Giemsa stained and banded by Trypsin using Giemsa. About 15 metaphases were evaluated from both preparations. In direct method, missing metaphases and unqualified chromosomes were observed. Only 5 - 7 % of the preparations gave satisfactory results.

Culture methods was successfully performed in Chang medium with the material from 10 pregnant who had abortion and five pregnant with prenatal diagnosis. Indications for prenatal diagnosis were: 1 - late pregnancy ( 10 weeks of pregnancy, 40 years old ), 2 - aneuploidy in the previous child (10 weeks of pregnancy, children with Down syndrome in two pregnant ), 3 - anomalia observed with ultrasonography (12 weeks of pregnancy, extremital anomalia or nuczal oedema in two pregnant )

In the preparations with Chang medium 8 female ( 46, XX ) and 7 male ( 46, XY ) karyotype were observed. Prenatal diagnosis indicated two pregnant have female and three pregnant have male fetuses.

In the lymphocyte culture to determine the fetal karyotype from maternal blood, preparations were Giemsa - stained and 100 metaphase were examined. Result only indicated the maternal karyotype. Y chromatin were also searched in the preparations. A correlation with chorion willi sampling could not be determined.



**KAYNAKLAR**

- 1-Benet, J., Genesca, A., Navarro, J., Egozcue, J., Templado, C.,  
" G-banding of Human Sperm Chromosomes ", Hum. Genet, 73,  
1986, 181 - 182.
- 2-Bhatia, R., Koppitch, F. C., Sokol, R. J., Evans, M. I., " Improving the  
Yields of Direct Chorionic Villus Slide Preparations ", Am. J.  
Obstet, 154, 1986, 408 - 411.
- 3-Brambati, B., Simoni, G., " Diagnosis of Fetal Trisomy 21 in First  
Trimester ", Lancet, I, 1983, 586.
- 4-Brambati, B., Tului, L., Simoni, G., Travi, M., " Genetic Diagnosis  
Before the Eighth Gestational Week ", Obstet. Gynecol., 77,  
1991, 318 - 321.
- 5-Caccia, N., Johnson, J., M., Robinson, G., E., Barna, T., " Impact of  
Prenatal Testing on Maternal-Fetal Bonding: Chorionic Villus  
Sampling versus amniocentesis ", Am. J. Obstet. Gynecol., 165,  
1991, 1122 - 1125.
- 6-Cameron, A., D., Mathers, A., M., Wisdom, S., Johnstone, J.,  
MacKenzie, J., R., M., Walker, J., J., Imrie, S., J., Lowther, G.,  
W., Connor, J., M., " Second-Trimester Placental Biopsy for  
Rapid Fetal Karyotyping ", Am. J. Obstet. Gynecol., 163, 1990,  
931 - 934.

- 7-Cao, A., Cossu, P., Monni, G., Rosatelli, M., C., " Chorionic Villus Sampling and Acceptance Rate of Prenatal Diagnosis ", *Prenat. Diagn.*, 7, 1987, 531 - 533.
- 8-Chang, H. C., Jones, O. W., Masu, H., " Human Amniotic Fluid Cells Grown in a Hormone-supplemented Medium: Suitability for Prenatal Diagnosis ", *Proc. Natl. Acad. Sci. [ USA ]*, 79, 1982, 4795 - 4799.
- 9-Chorionic Villus Sampling, , Diagnostic and Therapeutic Technology Assessment ( DATTA ), *JAMA*, 263 ( 2 ), 1990, 305 - 306
- 10-Copeland, K., L., Caepenter, R., J., Fenolio, K., R., Ledbetter, D., H., " Integration of the Transabdominal Technique into Ongoing Chorionic Villus Sampling Program ", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161, 1989, 1289 - 1294.
- 11-Covone, A., E., Mutton, D., Johnson, P., M., Adinolfi, M., " Trophoblast Cells in Peripheral Blood from Pregnant Women ", *Lancet*, II, 1984, 841 - 843.
- 12-Department of Obstetrics and Gynaecology, Tientung Hospital of Anshan Iron and Stell Company Ashan, " Fetal Sex Prediction by Sex Chromatin of Chorionic Villi during Early Pregnancy ", *Chin. Med. J. [ Eng ]*, 1, 1975, 117 - 120.
- 13-Eichenbaum, S. Z., Krumin, I. J., Fortuna, D. W., Duke, J., " False-negative Finding on Chorionic Villus Sampling ", *Lancet*, II, 1986, 391.

- 14-Ferguson-Smith, M., A., " 1990' lı Yıllarda Prenatal Tanı " Birinci Prenatal Teşhis ve Anadolu' nun Genetik Yapısı Sempozyumu, Sempozyum Tebliğ Özetleri, 5 - 7 Eylül 1989, Anadolu Üniversitesi, 3 - 9.
- 15-Ferguson-Smith, M., A., North, M., A., Affara, N., A., Briggs, H., " The Secret of Sex ", Lancet, 336, 1990, 809 - 810.
- 16-Ferguson, J., E., Vick, D., J., Hogge, J., S., " Transcervical Chorionic Villus Sampling and Amniocentesis: A Comparison of Reliability, Culture Finding, and Fetal Outcome ", Am. J. Obstet. Gynecol., 163, 1990, 926 - 931.
- 17-Ford, J., H., Jahnke, A., B., " Handling Chorionic Villi for Direct Chromosome Studies ", Lancet, II, 1983, 1491 - 1492.
- 18-Foulon, W., Naessens, A., Catte, L., Amy, J., " Detection of Congenital Toxoplasmosis by Chorion Villus Sampling and Early Amniocentesis " Am. J. Obstet. Gynecol., 163, 1990, 1511 - 1513.
- 19-Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Gosden, C.M., Rodeck, C.H., Morsman, J.M., " Direct vision chorion Biopsy and Chromosome - Specific DNA probes for Determination of Fetal Sex in First - Trimester Prenatal Diagnosis ", Lancet, II, 1982, 1416 - 1419.
- 20-Gray' s Anatomy, Edited by Williams, P., L., Warwick, R., Dyson, M., Bannister, L., H., Thirty-Seven Edition, Churchill Livingstone Press, Edinburg, London, Melbourne, New York, 1989, 145 - 155.



- 21-Gregson, N., M., Seabright, M., " Handling Chorionic Villi for Direct Chromosome Studies ", *Lancet*, II, 1983, 1491.
- 22-Hogge, W., A., Schonberg, S., A., Golbus, M., S., " Prenatal Diagnosis by Chorionic Villus Sampling: Lessons of the first 600 Cases " *Prenat. Diagn.*, 5, 1985, 393 - 400.
- 23-Holzgreve, W., Ganshirt-Ahlert, D., Horst, J., Miny, P., Gal, A., Pohlschmidt, M., " Detection of Fetal DNA in maternal Blood by PCR ", *Lancet*, 335, 1990, 1220 - 1221.
- 24-Holzgreve, W., Miny, P., " Chorionic Villi Sampling with an Echogenic Catheter: Experiences of the First 500 Cases ", *J. Perinat. Med.*, 15, 1987, 244 - 250.
- 25-Holzgreve, W., Miny, P., Gerlach, B., Westendorp, A., Ahlert, D., Horst, J., " Benefits of Placental Biopsies for Rapid Karyotyping in the Second and Third Trimester ( Late Chorionic Villus Sampling ) in High-risk Pregnancies ", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 162, 1990, 1188 - 1192.
- 26-Human Chromosomes, Human Chromosomes, Manual of Basic Techniques, Edited by Verma, R. S., Arvind, B., Pergamon Press, New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, 1989, 146 - 147.
- 27-Jackson, L., Gibas, L. M., " Chorionic Villus ", Human Chromosomes, Manual of Basic Techniques, Edited by Verma, R. S., Arvind, B., Pergamon Press, New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, 1989, 19 - 26.

- 28-Jacobs, P., A., Simith, P., G., " Pratical and Theoretical Implications of Fetal/Maternal Lymphocyte Transfer " Lancet, II, 1969, 745.
- 29-Johnson, A., Wapner, R., J., Davis, G., H., Jackson, L., G., " Mosaicism in Chorionic Villus Sampling: An Association with Poor Perinatal Outcome ", Obstet. Gynecol. 75 ( 4 ), 1990, 573 - 577.
- 30-Johnson, M., P., Drugan, A., Koppitch III, F., C., Uhlmann, W., R., Evans, M., I., " Postmortem Chorionic Villus Sampling is a Better Method for Cytogenetic Evaluation of Early Fetal Loss Than Culture of Abortus Material ", Am. J. Obstet. Gynecol., 163, 1990, 1505 - 1510.
- 31-Kao, S., Tang, G., Hsieh, T., Young, K., Wang, H., Pao, C., C., " Analysis of Peripheral Blood of Pregnant Women for the Presence of Fetal Y Chromosome-Specific ZFY Gene Deoxyribonucleic Acid Sequences ", Am. J. Obstet. Gynecol., 166, 1992, 1013 - 1019.
- 32-Kucheria, K., Taneja, N., Kulkarni, V., Agarwal, N., " Chromosomal Analysis of Chorionic Villi for Foetal Diagnosis in the First Trimester " Indian. J. Med. Res., 85, 1987, 589 - 591.

- 33-Ledbetter, D., H., Martin, A., O., Verlinsky, Y., Pergament, E., Jackson, L., Yang-Feng, T., Schoonberg, S., A., Gilbert, F., Zachary, J., M., Barr, M., Copeland, K., L., DiMaio M., S., Fine, B., Rosinsky, B., Schuette, J., De La Cruz, F., F., Desnick, R., J., Elias, S., Golbus, M., S., Goldberg, J., D., Lubs, H., A., Mahoney, M., J., Rhoads, G., G., Simpson, J., L., Schlesselman, S., E., " Cytogenetic Result of Chorionic Villus Sampling: High Success Rate and Diagnostic Accuracy in the United States Collaborative Study ", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 162, 1990, 495 - 501.
- 34-Leschot, N.J., Wolf, H., Verjaal, M., Van Prooijen Knegt, L., C., De Boer, E., G., Kanhai, H., H., H., Christiaens, G., C., M., L., " Chorionic Villi Sampling: Cytogenetic and Clinical Finding in 500 Pregnancies ", *Br. Med. J.*, 295, 1987, 407 - 410.
- 35-Leschot, N., J., Wolf, H., Van Prooijen-Knegt, A., C., Van Asperen, C., J., Verjaal, M., Schuring-Blom, G., H., Boer, K., Kanhal, H., H., Christiaens, G., C., M., L., " Cytogenetic Findings in 1250 Chorionic Villus Sampling Obtained in the First Trimester Clinical Follow-up of the First 1000 Pregnancies ", *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 96, 1989, 663 - 760.
- 36-Lilford, R., Maxwell, D., Coleman, D., Czepulkowski, B., Heaton D., " Diagnosis Four Hours After Chorion Biopsy, of Female Fetüs in Pregnancy at Risk of Duchenne Muscular Dystrophy ", *Lancet*, II, 1983, 1491.

- 37-Lo, Y., M., D., Patel, P., Sampietro, M., Gillmer, M., D., G., Fleming, K., A., Wainscoat, J., S., " Detection of Single-copy Fetal DNA Sequence from Maternal Blood ", *Lancet*, 335, 1990, 1463 - 1464.
- 38-Martin, A. D., Elias, S., Rosinsky, B., Bombard, A. T., Simpson, J. L., " False-negative finding on Chorionic Villus Sampling ", *Lancet*, II, 1986, 391 - 392.
- 39-Medical Research Council European Trial of Chorion Villus Sampling, *Lancet*, 337, 1991, 1491 - 1499.
- 40-Nakagome, Y., Nagafuchi, S., Nakahori, Y., " Prenatal Sex Determination ", *Lancet*, 335, 1990, 291.
- 41-Niazi, M., Loeffler, F., E., " Trophoblast Sampling in Early Pregnancy Culture of Rapidly Dividing Cells from Immature Placental Villi ", *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 88, 1981, 1081 - 1085.
- 42-Old, J., M., Ward, R.H.T., Petrou, M., Karagözlü, F., Modell, B., Weatherall, D.J., " First-Trimester Fetal Diagnosis for Haemoglobinopathies: Three Cases ", *Lancet*, II, 1982, 1413 - 1416.
- 43-Patel, Z., M., Mulye, V., R., Mhatre, M., C., Suchak, R., H., Pathak, V., B., " Chorionic Villus Sampling for First - Trimester Fetal Diagnosis: Preliminary Experience ", *Indian. J. Pediatr.*, 54, 1987, 685 - 688.

- 44-Petorak, İ., Medical Embriyoloji, Beta Basım Yayım Dağıtım AŞ, II. Baskı, İstanbul, 1986, 62 - 69.
- 45-Pool, C., Aplin, J., D., Taylor, G., M., Boyd, R., D., H., " Trophoblast Cells and Maternal Blood ", Lancet, I, 1987, 804 - 805.
- 46-Roney. D. E., Czepulkowski, B. H., " Prenatal Diagnosis and Tissue Culture", Human Genetics, Volum I, Constitutional Analysis, A Pratical Apporoach, Edited by Roney. D. E., Czepulkowski, B. H., Oxford Press, Oxford, New York, Tokyo, 1992, 75 - 85.
- 47-Saura, R., Longy, M., Horovitz, J., Vergnaud, A., Grison, O., " Direct Chromosome Analysis in the Second and Third Trimesters by Placental biopsy in 30 Pregnancies ", Br. J. Obstet. Gynecol., 96, 1989, 1215 - 1218.
- 48-Selypes, A., Lorencz, R., " A Noninvasive Method for Determination of the Se and Karyotype of the Fetüs from the Maternal Blood ", Hum. Genet., 79, 1988, 357 - 359.
- 49-Selypes, A., Lorencz, R., Takacs, S., " X - Chromatin fluorescence in Maternal Blood ", Hum. Genet., 82, 1989, 303.
- 50-Silver, R., K., MacGregor, S., N., Sholl, J., S., Hobart, E., D., Waldee, J., K., " An Evaluation of the Chorionic Villus Sampling Learning Curve ", Am. J. Obstet. Gynecol., 163, 1990, 917 - 922.

- 51-Simoni, G., Brambati, B., Danesino, C., Rosella, F., Terzoli, G., L., Ferrari, M., Fraccaro, M., " Efficient Direct Chromosome Analyses and Enzyme Determinations from Chorionic Villi Sampling in the First Trimester of Pregnancy ", *Hum. Genet.*, 63, 1983, 349 - 357.
- 52-Terzoli, G., L., Lalatta, F., Gilbert, F., " Chorionic Villus Sampling: Improved Method for Preparation of Karyotypes after Short - Term Incubation ", *Prenat. Diagn.*, 7, 1987, 389 - 394.
- 53-Tonnessen, T., Horn, N., Sondergaard, F., Jensen, O., A., Gerdes, A., M., Girard, S., Damsgaard, E., " Experience with First Trimester Prenatal Diagnosis of Menkes Disease ", *Prenat. Diagn.*, 7, 1987, 497 - 509.
- 54-Walknowska, J., Conte, F., A., Grumbach, M., M., " Pratical and Theoretical Implications of Fetal/Maternal Lymphocyte Transfer " *Lancet*, I, 1969, 1119 - 1120.
- 55-Yamamoto, M., Takashi, I., Masatomo W., Gen-ichi W., " Causes of Chromosome Anomalies Suggested by Cytogenetic Epidemiology of Induced Abortions ", *Hum. Genet.*, 60, 1982, 360 - 364.
- 56-Yeoh, S., C., Sargent, I., L., Redman, C., W., G., Thein, S., L., " Detecting Fetal Cells in Maternal Circulation ", *Lancet*, II, 1989, 869 - 870.

57-Young, S., R., Shipley, C., F., Wade, R., V., Edwards, J., G., Waters, M., B., Cantu, M., L., Best, R., G., Dennis, E., J., " Single-Center Comparison of result of 1000 Prenatal Diagnoses with Chorionic Villus Sampling and 1000 Diagnoses with Amniocentesis ", Am. J. Obstet. Gynecol., 165, 1991, 255 - 263.

58-\_\_\_\_\_, " Kinderspital Genetik Laboratuvarı Manualı", Basel İsviçre.



## ÖZGEÇMİŞ

1961 yılında Kars' ta doğdum. Bornova Yavuz Selim İlk okulunu, Malatya Hasan Varol Ortaokulunu ve Malatya Turan Emeksiz Lisesini bitirdim

1979 - 1980 öğretim yılında yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim ve 1983 yılında mezum oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Öğrenimime başladım. 1985 yılında yüksek lisans programını tamamladım. Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında 1985 yılından itibaren Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

1986 yılında Doktora programına başladım. Ekim 1994 tarihinde tez çalışmalarımı tamamladım. Evli ve bir çocuk babasıyım.