

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PRENATAL TANIDA SIK GÖRÜLEN ANÖPLOİDİLERİN
MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT AMPLIFICATION
(MLPA) YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

Hüseyin YURDAKUL

DANIŐMAN

Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK

2. DANIŐMAN

Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Mayıs, 2007

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PRENATAL TANIDA SIK GÖRÜLEN ANÖPLOİDİLERİN
MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT AMPLIFICATION
(MLPA) YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

Hüseyin YURDAKUL

DANIŐMAN

Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK


2. DANIŐMAN

Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

KABUL VE ONAY SAYFASI


Hüseyin YURDAKUL'un Doktora Tezi olarak hazırladığı “**Prenatal Tanıda Sık Görülen Aneuploidilerin Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi ile Saptanması**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

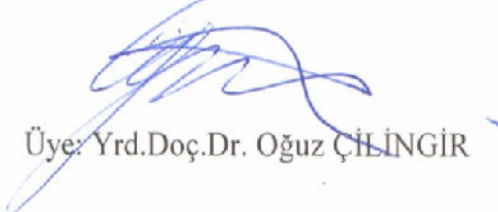
29.05.2007


Üye: Prof.Dr. Turgay ŞENER

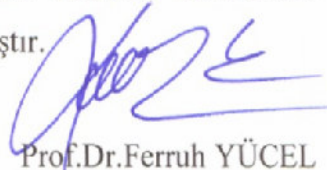

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN


Üye: Doç.Dr. Dilek AKTAŞ


Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK


Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/05/2007. tarih ve 300/2258. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Gelişmiş ülkelerde kromozom anomalilerinin sebep olduğu sendromların prenatal tanısı obstetrik takibin önemli bir parçasıdır. Anöploidi tanı testlerinde altın standart, klasik kromozom analizidir (karyotipleme). Bununla birlikte Florasan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve short tandem repeats (STRs) analizleri moleküler sitogenetik ve moleküler genetik testler olarak spesifik anomalilerin tanısında rutin uygulamada kullanılmaktadır.

MLPA; farklı DNA dizilerinin tek bir reaksiyonda relatif kantitasyonuna imkan veren yeni bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Retrospektif olarak yapılan çalışmamızda anöploidi riski taşıyan 500 gebeden alınan amniyon sıvısında MLPA tekniği kullanılarak 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının doz tayini yapılmıştır.

Çalışmamızda, riskli gebelerden alınarak Ana Bilim Dalı'mıza gönderilen amniyotik sıvıdan 2 cc ayrılarak fetal hücrelerin DNA ları ekstrakte edilmiştir. Fetal DNA daki 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının dozajlarının belirlenmesi amacı ile bu kromozomlara spesifik problemlerin PCR ile amplifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen PCR ürününde 310 Prizm Genetic Analyzer cihazında Gene Mapper programı kullanılarak amplifiye olan problemlerin miktarını gösteren pikler elde edilmiştir. Piklerin alanları Coffalyser programı ile analiz edilerek adı geçen kromozomların doz tayini yapılmıştır.

MLPA tekniği ile elde edilen sonuçlar rutin yöntemlerle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak testin sensitivitesi ve spesifitesi belirlenmiştir. MLPA tekniğinin rutinde kullanılabilirliği sınanmış ve yeni yöntemin rutinde kullanılan yöntemlere göre avantaj ve dezavantajları belirlenmiştir.

Yapılan çalışma sonrasında örneklerin 480 tanesinde MLPA yöntemi ile sonuçlar tayin edilebilmiştir. Triploidi saptanan bir olgu (69,XXX) dışındaki, tüm olgu örneklerinde karyotip sonuçları ile MLPA sonuçları uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Prenatal tanı, Kantitatif PCR, Anöploidi, MLPA

SUMMARY

Prenatal diagnosis of chromosome syndromes is a long established part of obstetric care in developed countries. Karyotyping has provided the gold standard as a diagnostic test. Nevertheless, molecular tests, such as fluorescent in situ hybridisation (FISH) and short tandem repeats (STRs) analysis, are now in common practice for the diagnosis of specific abnormalities.

MLPA is a new technique, that provides relative quantification of different DNA sequences by a single tube reaction. In our study, we determined retrospectively the dosages of 13., 18., 21., X and Y chromosomes from amniocentesis samples of 500 pregnant by using MLPA technique.

The DNA is extracted from 2 ml amniotic fluid samples of pregnancies at increased risk of aneuploidy that are referred to our department. The PCR reactions by using chromosomes 13., 18., 21., X and Y specific probes performed to quantify the amounts of these chromosomes in fetal DNAs. The amount of peaks related with the amplified probes analysed by using Gene Mapper Programme in 310 ABI Prism Genetic Analyser System and then each peak area analysed by the Coffalyser programme to determine doses of chromosomes 13., 18., 21., X and Y.

By comparing the MLPA-detected results and the findings from conventional cytogenetic analyses, we determined the specificity and sensitivity of the MLPA technique and the usage of the MLPA technique as a routine diagnostic method for aneuploidy detection.

There was 480 conclusive MLPA tests. Results were concordant with those of karyotyping with the exception of the 69, XXX karyotyped sample.

Keywords: Prenatal Diagnosis, Quantitative PCR, Aneuploidy, MLPA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prenatal Tanı	3
2.1.1. Prenatal Tanının Tarihiçesi	3
2.1.2. Prenatal Tanının Hedefleri	4
2.1.3. Prenatal Tanı Endikasyonları	4
2.1.4. Prenatal Tanı Testleri	5
2.1.4.1. Non-invaziv Prenatal Tanı Testleri	5
2.1.4.1.1. Biyokimyasal Tarama Testleri	5
2.1.4.1.1.1. Üçlü Test	5
2.1.4.1.1.2. İkili Test Ve USG	6
2.1.4.1.2. USG	6
2.1.4.2. İnvaziv Prenatal Tanı Testleri	7
2.1.4.2.1. Koryon Villus Örnekleme	7
2.1.4.2.2. Amniyosentez	8
2.1.4.2.3. Kordosentez	9
2.1.4.3. Prenatal Tanı İçin Yeni Gelişen Teknikler Ve Deneysel Uygulamalar	10
2.1.4.3.1. Preimplantasyon Genetik Tanı	10
2.1.4.3.2. Maternal Kandan Fetal DNA Ve Hücrelerin Ayrıştırılması	10
2.1.4.3.3. Servikal Fetal Hücrelerin Eldesi	11
2.2. Kromozom Düzensizlikleri	13

2.2.1. Sayısal Düzensizlikler	13
2.2.2. Yapısal Düzensizlikler	16
2.3. Anöploidi Tayininde Kullanılan Genetik Analiz Yöntemleri	17
2.3.1. Klasik Kromozom Analizi	17
2.3.2. Moleküler Sitogenetik Analiz	18
2.3.3. Moleküler Analiz	23
2.4. MLPA	25
2.4.1. MLPA Yönteminin Anöploidi Tayininde Kullanılması	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Gereçler	32
3.1.1. Kullanılan Gereçler	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	33
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Materyal Seçimi	33
3.2.2. Kültüre Edilmemiş Amniyon Sıvısının DNA Ekstraksiyonu İçin Hazırlanması	34
3.2.3. QIAmp DNA Mini Kiti Kullanarak Amniyon Sıvısından DNA İzolasyonu	34
3.2.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	35
3.2.4.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P095 Probe Miks İle Hibridizasyonu:	35
3.2.4.2. Ligasyon Reaksiyonu	36
3.2.4.3. PCR	36
3.2.4.4. ABI 310 Cihazına Yükleme	37
3.2.4.5. Değerlendirme	37
4. BULGULAR	39
4.1. Araştırma Grubu Sonuçları Ve Kontrol Grubu Sonuçları	39
4.1.1. Kontrol Grubu Sonuçları	40
4.1.2. Araştırma Grubu Sonuçları	41
4.2. Araştırma Grubu Sonuçlarının Detaylı Gösterimi	42

4.3. MLPA Analiz Sonuçlarının Rutin Test Sonuçları İle Karşılaştırılması Ve Yöntemin Güvenilirliğinin Hesaplanması	80
5. TARTIŞMA	82
5.1. MLPA Yönteminin Sensitivitesi	82
5.2. MLPA Yönteminin Spesifitesi	82
5.3. MLPA Yönteminin Başarısızlık Oranı	83
5.4. Anöploidi Tanısında Kullanılan Analiz Yöntemlerinin Karşılaştırılması	87
5.4.1. Klasik Kromozom Analizi İle Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması	87
5.4.2. MLPA Yönteminin Diğer Moleküler Analiz Yöntemleri İle Karşılaştırılması	89
5.5. MLPA Yönteminin Uygulamadaki Basamakları	94
6. SONUÇ	99
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	100
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.4.:	MLPA Reaksiyonunun İşleyişi	27
Şekil 4.2.1.:	Eksternal Normal Erkek Kontrollerin Pik Görüntülerine Örnek	43
Şekil 4.2.2.:	Eksternal Normal Kadın Kontrollerin Pik Görüntülerine Örnek	44
Şekil 4.2.3.:	Normal, Erkek Pik Görüntülerine Örnek	45
Şekil 4.2.4.:	Normal, Kadın Pik Görüntülerine Örnek	47
Şekil 4.2.5.:	Trizomi 21, Erkek ve Normal, Erkek Örnek Pik Görüntüleri	49
Şekil 4.2.6.:	Trizomi 21, Kadın ve Normal Kadın Örnek Pik Görüntüleri	52
Şekil 4.2.7.:	Trizomi 18, Erkek ve Normal Erkek Örnek Pik Görüntüleri	55
Şekil 4.2.8.:	Trizomi 18, Kadın ve Normal, Kadın Örnek Pik Görüntüleri	58
Şekil 4.2.9.:	Trizomi 13, Erkek ve Normal, Erkek Örnek Pik Görüntüleri	61
Şekil 4.2.10.:	XXY ve Normal Erkek Örnek Pik Görüntüleri	64
Şekil 4.2.11.:	Monozomi X ve Normal, Kadın Örnek Pik Görüntüleri	68
Şekil 4.2.12.:	Trizomi X ve Normal, Kadın Örneği Pik Görüntüleri	72
Şekil 4.2.13.:	69,XXX Karyotipli Hastanın MLPA Yöntemi ile Pik Görüntüleri	76
Şekil 4.2.14.:	Şekil 4.2.14.: Normal Erkek Örnekten ve Değerlendirmeye Alınamayan 47,XX,+13 Karyotipli Hastadan MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Pik Görüntüleri	79 ve 85

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1.4.1.: Anne Serum Taramasında Hastalıklar İle İlgili Beklenen Hormonal Seviye Değişiklikleri	6
Çizelge 2.1.4.2.: Gebelik Haftalarına Göre Amniyotik Sıvıdaki Hücre Sayıları	9
Çizelge 2.3.: FISH Tekniğinin Kullanım Alanları	19
Çizelge 2.4.1.: MLPA 095 Anöploidi Kitinde Kullanılan MLPA Problarının Özellikleri.	30
Çizelge 4.1.1.: Kontrol Grubu (Referans) Sonuçları	40
Çizelge 4.1.2.: MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Araştırma Grubu Sonuçları	41
Çizelge 4.2.1.: Eksternal Normal Erkek Kontrollerin Pik Alanlarına Örnek	43
Çizelge 4.2.2.: Eksternal Normal Kadın Kontrollerin Pik Alanlarına Örnek	44
Çizelge 4.2.3.: Normal Erkek Pik Alanlarına Örnek Değerler	46
Çizelge 4.2.4.: Normal Kadın Pik Alanlarına Örnek Değerler	47
Çizelge 4.2.5.A.: Trizomi 21, Erkek Pik Alan Değerleri	50
Çizelge 4.2.5.B.: Trizomi 21, Erkek Örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	51
Çizelge 4.2.6.A.: Trizomi 21, Kadın Pik Alan Değerleri	53
Çizelge 4.2.6.B.: Trizomi 21, Kadın örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	54
Çizelge 4.2.7.A.: Trizomi 18, Erkek Pik Alan Değerleri	56
Çizelge 4.2.7.B.: Trizomi 18, Erkek Örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	57
Çizelge 4.2.8.A.: Trizomi 18, Kadın Pik Alan Değerleri	59

Çizelge 4.2.8.B.:	Trizomi 18, Kadın Örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	60
Çizelge 4.2.9.A.:	Trizomi 13, Erkek Pik Alan Değerleri	62
Çizelge 4.2.9.B.:	Trizomi 13, Erkek Örnek Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	63
Çizelge 4.2.10.A.:	XXY Örneğinin Pik Alan Değerleri	65
Çizelge 4.2.10.B.:	XXY Örneğinin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	66
Çizelge 4.2.11.A.:	Monozomi X Örneğinin Pik Alan Değerleri	69
Çizelge 4.2.11.B.:	Monozomi X Örneğinin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	70
Çizelge 4.2.12.A.:	Trizomi X Örneği Pik Alan Değerleri	73
Çizelge 4.2.12.B.:	Trizomi X Örneği Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	74
Çizelge 4.2.13.A.:	69,XXX Karyotipli Hastanın MLPA Yöntemi İle Pik Alan Değerleri	77
Çizelge 4.2.13.B.:	69,XXX Karyotipli Hastanın MLPA Yöntemi İle Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları	78
Çizelge 4.3.1:	Medikal Testin Gerçek Durumu Yansıtması	80
Çizelge 4.3.2.:	Bulgularımızın Referans Sonuçlar İle Karşılaştırılması	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFAFP:	Amniotic Fluid Alfa Feto Protein
AFP:	Alfa Feto Protein
AST:	Anne Serum Taraması
CVS:	Chorion Villus Sampling
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
FISH:	Flourescent In Situ Hibridization
HCG:	Human Chorionic Gonodotropin
ISH:	In Situ Hibridization
IQ:	Zeka Katsayısı
IVP:	In Vitro Fertilizasyon
l:	Litre
ml:	Mililitre
MLPA:	Multiplex Ligation-dependent Prop Amplification
mRNA:	Messenger Ribo Nükleik Asit
MTH:	Maternal Hücre Kontaminasyonu
MSAFP:	Maternal Serum Alfa Feto Protein
ng:	Nanogram
nt.:	Nükleotid
NISH:	Non-izotopik In Situ Hibridizasyon
NTD:	Nöral Tüp Defekti
NT :	Nukkal Kalınlık
PAPP-A:	Pregnancy-Associated Plasma Protein A
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QF-PCR:	Quantative Florasan Polimeraz Zincir Reaksiyonu
STRs:	Small Tandem Repeats
uE₃:	Unconjugated Estriol
USG:	Ultrasonografi
T. P. A. D.:	Test Piki Alan Değeri
P. A. T. D.:	Pik Alanları Toplam Değeri
İ. P. A.:	İnternal Pik Alanları

E. P. A.:	Eksternal Pik Alanları
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kromozom anomalilerinin prenatal tanısı 1970 yılı öncesinden beri gebeliğin yaklaşık 16. haftasında yapılan amniyosentez sonrası amniyon sıvısından kültüre edilen hücreler ile yapılmaktadır. Prenatal tanıya yaklaşımda zaman içinde koryon villus örnekleme (CVS), fetal kan örnekleme, in vitro fertilizasyonu takiben preimplantasyon tanı ve bazı deneysel yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Doğal olarak ebeveynler testlerin sonucunu olabildiğince erken öğrenmek istemektedirler. Erken sonuç alma isteğine karşılık, prenatal tanıda kullanılacak yöntem; uygulama kolaylığı, gebede ve fetusta meydana gelebilecek travma ve riskler, elde edilecek sonucun güvenilirliği, maliyeti ve prenatal tanı endikasyonuna göre uygun bir şekilde seçilmelidir (18).

Prenatal tanıda temel felsefe, tedavisi olanaksız, yaşam süresi kısıtlı ve ağır bedensel ve zihinsel özürlere yol açan hastalıklar için yüksek riskli olan ailelere sağlıklı bir çocuk şansı verebilmektir (4).

Prenatal tanı sayesinde yüksek riskli çiftler sağlıklı çocuklara sahip olabilmişlerdir (31).

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları, son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tanımlamışlardır. Slater ve arkadaşları 2003 yılında yöntemin prenatal tanıda kullanılması konusunda ilk klinik verileri yayınlamışlardır (39, 40).

Prenatal tanı laboratuvarlarında kullanımı yaygınlaşmaya başlayan bu yöntemin ülkemizdeki klinik verileri ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla Ana Bilim Dalımıza başvuran prenatal tanı endikasyonu bulunan 500 gebeden alınan amniyon sıvılarında MLPA yöntemi kullanılarak fetuslara ait 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının doz tayinleri yapılmıştır. MLPA tekniği ile elde edilen sonuçlar rutin yöntemlerle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda testin sensitivitesi ve spesifitesinin belirlenmesi, MLPA yönteminin rutinde kullanılabilirliğinin sınanması

ve yeni yöntemin rutinde kullanılan yöntemlere göre avantaj ve dezavantajlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prenatal Tanı

Prenatal tanıda temel felsefe, tedavisi olanaksız, yaşam süresi kısıtlı ve ağır bedensel ve zihinsel özürlere yol açan hastalıklar için yüksek riskli olan ailelere sağlıklı bir çocuk için güvence verebilmektir (4).

Prenatal tanı multi-disipliner işbirliği gerektiren bir hizmettir. Prenatal tanı hizmeti; genetik, kadın doğum, ultrasonografi ve laboratuvar üniteleri işbirliği ile yürütülür (6, 31).

2.1.1. Prenatal Tanının Tarihçesi

Amniyosentez; ilk defa polihidramnion tedavisi için kullanıldığı 18. yüzyılda tanımlanmıştır. Amniyotik sıvıdaki hücrelerde seks kromatininin analiz edilmesi, hemofili ve musküler distrofi gibi X kromozomal resesif geçişli hastalıklara yaklaşımı radikal şekilde değiştirmiş, bazı metabolik hastalıkların prenatal tanısını mümkün kılmıştır (6).

1966 yılında Steele ve Breg, kültüre edilen amniyotik sıvı hücrelerini kullanarak fetusa ait kromozom yapısının belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Bu gelişme prenatal tanının başlangıcı olarak kabul görmektedir (6, 31, 42).

2.1.2. Prenatal Tanının Hedefleri

Prenatal tanının hedefleri içinde, uygulanabilecek tanı yöntemleri ile fetusta olası bir hasalığın tanısını en kısa sürede aileye bildirmek ve hastalığın intrauterin dönemde tedavisine olanak sağlamak yer almaktadır (31).

2.1.3. Prenatal Tanı Endikasyonları

1. İlerlemiş anne yaşı
2. Fetusda anormal USG bulgusu
3. Anne anksiyetesi
4. Ailenin önceki çocuklarında tespit edilmiş kromozom anomalisi bulunması
5. Ebeveynlerde (maternal ve/veya paternal) yapısal kromozom anomalisi bulunması
6. Bazı durumlarda X-kromozomal hastalık hikayesi
7. Artmış NTD riski
8. Anne serumunda tarama ile belirlenmiş yüksek risk
9. Anamnezinde ikiden fazla nedeni bilinmeyen ölü doğum ve / veya anomalili bebek öyküsü olan gebeler (4, 31).

2.1.4. Prenatal Tam Testleri

2.1.4.1. Non-invaziv Prenatal Tam Testleri

2.1.4.1.1. Biyokimyasal Tarama Testleri

AFP: Esas olarak fetus kaynaklı bir glikoproteindir. Anne serumunda (MSAFP) ve amniyotik sıvıda (AFAFP) seviyesi belirlenerek fetal NTD riskini saptamak amacı ile kullanılabilir. MSAFP ölçümü sayesinde fetal NTD riski, Down sendromu riski belirlenebilmektedir. İnvaziv olmayan yöntemler olan MSAFP ölçümü ve USG nin birlikte kullanımı testlerin geçerliliğini artırmaktadır (4, 31).

PAPP-A: Gebeliğin 16. haftasında anne serumunda seviyesine bakılan pregnancy-associated plasma protein A, üçlü testle beraber değerlendirildiğinde trizomi 18 li vakaların yaklaşık %100 ünde yüksek risk tayin eder (53).

Inhibin-A: Gebeliğin 16. haftasında anne serumunda seviyesine bakılan inhibin-A, üçlü test ile birlikte değerlendirildiğinde üçlü testin %60 olan trizomi 21 varlığı tarama başarısını teorik olarak %75 e yükseltecektir (53).

2.1.4.1.1.1. Üçlü Test

Üçlü tarama testi ve anne serumu taraması (AST) benzer anlamlarda kullanılırlar. Bu tarama testi; AFP, uE₃ ve hCG nin anne serum seviyelerinin ölçülmesi sayesinde yapılır. Üçlü test; fetusda Down Sendromu, Edwards Sendromu ve NTD bulunma riskini belirler. Bu test gebeliğin 15. ve 20. haftaları arasında yapılabilir (31).

Çizelge 2.1.4.1.: Anne Serum Taramasında Hastalıklar İle İlgili Beklenen Hormonal Seviye Değişiklikleri.

	AFP	uE₃	HCG
Artmış Down Send. Risk	↓	↓	↑
Trizomi 18	↓	↓	↓
NTD	↑	Uygulanmaz	Uygulanmaz

Çizelge, Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F.: Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6.baskı, Saunders, (Türkçe Çevirisi, Güneş Kitabevi, 2005) (31) den alınmıştır.

2.1.4.1.1.2. İkili Test Ve USG

Erken amniyosentez ve CVS tekniklerinin gelişmesi, üçlü tarama testinin ilk trimestere kaydırılmasını gündeme getirmiştir (4).

İkili testte; ilk trimestrdaki nukkal kalınlık, β -hCG ve PAPP-A'nın maternal serum seviyeleri kullanılır. İkili testte Down sendromu için β -hCG seviyesi tipik olarak ortancadan yüksek, PAPP-A seviyesi ise düşük bulunacaktır. Bu yöntemin başarı oranı %85-90 a kadar yüksek olabilmektedir, yanlış pozitiflik oranı ise \leq %5 tir (13, 18, 41).

2.1.4.1.2. USG

Fetusun genel durumunun değerlendirilmesi ile ilgili olarak USG'nin önemi giderek artmaktadır. Fetal yaş tayini, çoğul gebeliklerin ve fetusun canlı olduğunun saptanması, ikinci trimesterden itibaren fetal cinsiyetin saptanması USG ile mümkün olabilmektedir. Bir çok malformasyon USG ile saptanabilmektedir. Ultrasonografinin anneye ya da bebeğe zararlı olduğu gösterilmemiştir (31).

Anormal USG bulgularının bazıları kromozomal anöploidiler ile ilişkili olabilmektedir. NT ölçümü, fetal anöploidi riskini değerlendirmek için faydalanılan ultrasonografi ölçümlerinden biridir. Fetal anöploidilerde gebeliğin 10. ve 14. haftaları

arasında artmış NT saptanabilir. Artmış NT aynı zamanda fetal kalp hastalığının veya bir genetik sendromun işareti olabilir. Bu durumda kromozom analizi yapılarak kesin tanıya ulaşılabilmektedir. (31).

2.1.4.2. İnvaziv Prenatal Tanı Testleri

2.1.4.2.1. Koryon Villus Örnekleme

CVS, genellikle gebeliğin 10. ve 12. haftaları arasında uygulanmaktadır. Bu uygulamada koryon villuslarından USG eşliğinde transservikal veya transabdominal yolla biyopsi alınmaktadır. İlk defa Mohr tarafından 1968 yılında fetus ile aynı genetik yapıda olan plasentanın incelenmesi ile fetus hakkında karara varılabilmesi esasına dayanan bu yöntem amniyosentezin alternatifidir. CVS in en önemli avantajı, sonuçların gebeliğin daha erken döneminde elde edilebilmesidir. Ancak, AFP ye bu dönemde bakılmaz. NTD taraması için gebeliğin 16. haftasında anne serumu AFP düzeyi bakılması gereklidir. CVS işlemine bağlı düşük riski yaklaşık olarak %1 dir (29, 31).

Yamamoto ve arkadaşları 1975 yılında tıbbi tahliyelerden elde edilen trofoblast dokusuna uyarladıkları, kromozom elde etmek için son derece hızlı bir tekniği (direkt preparasyon) CVS materyalinde başarı ile uygulamışlardır. Bu teknik ile biyopsiyi takip eden birkaç saat içinde kromozom analizi mümkün olabilmektedir. Teknik, pek çok modifikasyonlarla düzeltilmesine rağmen elde edilen kromozomların bant kalitelerinin, kültürden elde edilenlere oranla daha kötü olması nedeniyle bazı durumlarda analiz problemleri yaşanmaktadır. Buna karşılık hızlı sonuç vermesi ve maternal hücre kontaminasyon tehlikesinin olmaması nedeniyle bu teknik pek çok büyük merkezde hücre kültürü ile paralel olarak uygulanmaktadır (4, 52).

CVS de materyalin direk preparasyon avantajı bulunmaktadır. CVS materyalinin kültüre edilmesi ile elde edilen kromozom analizindeki başarı oranı amniyosentezdeki gibi %90 dan yüksektir. Sonuçların yaklaşık %2 sinde kromozomal mozaikliğe bağlı belirsizlik vardır. Böyle bir durumda sonuçların amniyosentez ile kontrolü gerekmektedir (31).

2.1.4.2.2. Amniyosentez

Amniyosentez, amniyotik sıvı örneğinin bir enjektörle USG eşliğinde transabdominal olarak alınması işlemidir. Amniyotik sıvıda bulunan hücrelerin hepsi fetal hücrelerdir ve tanısal amaçlı kullanılabilirler. Amniyosentez genel olarak 15.-16. gebelik haftasında uygulanır (4, 31).

15.-17. haftalar arasında USG eşliğinde yapılan transabdominal amniyosentez anne ve fetus açısından yüksek seviyede güvenlidir. Bu işlem sırasında direk travmaya bağlı anneye ait komplikasyonlar ve fetal yaralanma pratik olarak bilinmemektedir. Avantajlarından bir tanesi yönteme bağlı sitogenetik sonuçların yüksek seviyede güvenilir olmasıdır. Standart amniyosentezin en belirgin dezavantajı yöntemin sitogenetik sonuçlarının geç elde edilmesidir. Yani amniyosentez için endikasyon; üçlü tarama testinde çıkan yüksek risk ise yöntem 16.-17. haftalardan önce uygulanamayacaktır (18).

İkinci trimesterde yapılan amniyosentez işleminde %0,5-1 oranında artmış düşük riski bulunmaktadır. Enfeksiyon ve bebek yaralanmaları gibi riskler nadir görülür. Amniyotik sıvı volümü ve içindeki hücre yoğunluğu gebelik haftasına göre önemli değişiklikler gösterir (Çizelge 2.1.4.2.). (4, 31)

Prenatal tanıyı gebeliğin erken safhalarında yapma çalışmaları hep var olmuştur. 11. gebelik haftasından önce yapılan amniyosentezlerde, amniyotik sıvı hacminin ve ml ye düşen hücre sayısının azlığı hücre kültüründe başarı oranının %68 lere kadar düşürmektedir. Erken amniyosentez (10.-14. gebelik haftasında) ile ikinci trimester amniyosentez işlemlerinin güvenliği ve fetal sonuçları karşılaştırıldığında, erken amniyosentezde kendiliğinden düşük oranının % 2.6, ikinci trimester amniyosentezdeki oranın ise % 0,8 olduğunu göstermiştir. Rh-negatif kadınlara bu invaziv girişimlerden sonra Rh immünglobulin rutin olarak uygulanmaktadır (4, 31).

İlerde bahsedileceği gibi amniyon sıvısı kullanılarak yapılan analiz yöntemleri için bu fetal hücrelerin sayıları önemlidirler.

Çizelge 2.1.4.2.: Gebelik Haftalarına Göre Amniyotik Sıvıdaki Hücre Sayıları

Gebelik Haftası	Hücre Sayısı/ml	Amniyotik Sıvı/ml
9	5.700	----
10	24.000	30
11	27.000	54
12	60.000	58
13	91.000	71
14	126.000	124
15	135.000	137
16	185.000	190
20		380

Çizelge, Elejalde R. B., Elejalde M. M., Acuna M. J., Thelen D., Trujillo C Karrmann M: Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation. Am. J. Med. Gen. 35: 188, 1990 den alınmıştır (15).

2.1.4.2.3. Kordosentez

Kordosentez işlemi; fetal kan örneğinin umbilikal kordondan ultrasonografi eşliğinde alınmasıdır. Kordosentez ile alınan fetal kan örneği ile, uygun hücre kültürleri ile kromozom elde etmek birkaç günde mümkün olabilmektedir. Amniyosentez sonucu kültür başarısının olmadığı veya çelişkili sonuçlar alındığı durumlarda kordosentez yapılır. 19. ile 21. gebelik haftalarında yapılan kordosenteze bağlı düşük oranı yaklaşık %2-3 tür (31).

2.1.4.3. Prenatal Tanı İçin Yeni Gelişen Teknikler Ve Deneysel Uygulamalar

2.1.4.3.1. Preimplantasyon Genetik Tanı

Preimplantasyon genetik tanıda IVF sonrası 6-8 hücreli embriyonun tek hücresine biyopsi yapılır. Bu hücrede genetik teknikler uygulanır ve embriyonun sağlıklı olduğu anlaşıldığında uterusu aktarımı gerçekleştirilir. Biyopsi hücresinde tek gen hastalığına yönelik moleküler analiz yapılabilmekte veya FISH ile fetal kromozomal anomaliler saptanabilmektedir. Biyopsi yapılmış embriyolarda herhangi bir kalıcı hasar gösterilmemiş olmakla birlikte bu teknik ile ilgili az miktarda veri vardır (31).

2.1.4.3.2. Maternal Kandan Fetal DNA Ve Hücrelerin Ayırıştırılması

Az miktarda fetal hücrenin anne dolaşımında bulunduğu 1969 gösterilmiş olup, anne kanında bulunan değişik tipteki fetal hücreler ayırıştırılabilmektedir. Bu durum Anne dolaşımında bulunan bu fetal hücrelerin prenatal tanı amaçlı kullanılmalarına neden olmuştur. Sözü edilen tekniğin yaygın olarak kullanımından önce, prenatal tanı için anne dolaşımında bulunan fetal lenfosit, nükleuslu eritrositler ve trofoblastlı fragmanların hangisinin ideal fetal hücre olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Fetal lenfositler maternal dolaşımında uzun süre kalıcıdır ve bu özellikleri ile sadece ilk gebeliklerde tanı amaçlı kullanılabilirlerdir. Trizomi 21 başta olmak üzere, birçok anöploidide anne dolaşımında bulunan fetal hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Maternal kan örneklemesinin gebeliğin hangi döneminde yapılması gerektiği konusunda çalışmalar sürmektedir. (31).

Fetal dokudan maternal dolaşıma salınan iki önemli hücre tipi çekirdekli kırmızı kan hücresi ve trofoblasttır. Maternal kan örneğinden bu hücrelerin ayrılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerden hiçbiri yeterince tatmin edici değildir (18, 47).

Çekirdekli kırmızı kan (Nucleated red blood cell) hücrelerinden fetal kaynaklı olanları, maternal kaynaklı çekirdekli kırmızı kan hücrelerinden ayırmak için gelişmiş yöntemler gereklidir. ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü himayesinde amniyosentez veya CVS sonuçlarını çekirdekli kırmızı kan hücreleri sonuçlarıyla kıyaslayan büyük bir araştırma hali hazırda devam etmektedir. İlk 5 yılda elde edilen verilere göre; FISH analizlerinde anöploidi için yanlış pozitif oranları düşük olarak bulunmuştur (%1). Fakat hassasiyeti düşüktür ve analiz kriterlerine göre trizomilerin yaklaşık dörtte birlik bölümünü saptamada yetersiz kaldığı gösterilmiştir (5, 18).

Trofoblast hücreleri erken hamilelik dönemi boyunca decidua ve myometriumu, uterus damarlarının içine sızmak suretiyle istila ederler. Bazıları maternal dolaşıma girer ve maternal kandaki konsantrasyonu mililitrede bir hücre civarındadır. Safaştırma yöntemleri trofoblast hücrelerinin ayrıştırılmasına izin verebilmektedir. Konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (18, 32).

2.1.4.3.3. Servikal Fetal Hücrelerin Eldesi

Trofoblast hücreleri, uterus kavitesinden endoservikal kanala girebilir ve endoservikal irrigasyon ve aspirasyon (lavaj) yoluyla moleküler analiz için toplanabilirler. Lavajın, erken CVS komplikasyonu olarak gelişebilecek defektlere benzer risk taşıdığı unutulmamalı ve lavaj tekniğinin detayları önemsenmelidir (8, 18).

Papanicolaou servikal örnekleme (Pap smear) yıllardır kullanılan rutin bir yöntemdir. Bazı trofoblastların serviks dışına kadar hareket etmelerinden faydalanarak bu hücrelerin prenatal tanıda kullanılması da başarılı olabilecektir. Bunlar muhtemelen direk CVS kültüründe test edilen hücreler gibi aynı hücre popülasyonu şeklinde olacaklardır. Bu yöntem sayesinde gebeliğin 7. haftasından başlayarak daha erken tanı mümkün olabilecektir (18).

Fejgin ve arkadaşları 2001 yılında servikal fetal hücrelerde FISH yöntemi kullanarak kesin olmayan fakat umut veren sonuçlar elde etmişlerdir, fakat Cioni ve arkadaşları tarafından 2003 yılında rapor edilen denemelerde ne FISH, ne de moleküler

yaklaşımın tatmin edici olmadığı sonucunu ortaya koyulmuştur. Bu hücelere tek hücre moleküler yönteminin uygulanmasının daha hassas olabileceği düşünülmüştür. Findlay 2003 yılında az miktarda elde edilebilen bu fetal hücreleri kültüre etmiş ve harvest aşamasından sonra önemli anöploidileri değerlendirmek için FISH yöntemini kullanmıştır. Tek hücreye uygulanacak moleküler metodolojinin daha doğru olabileceği ve prensip olarak trizomilerin tanınabileceği belirtilmiştir (10, 16, 17, 18).

2.2. Kromozom Düzensizlikleri

Kromozom anomalileri gebelik kaybı, doğumsal kusurlar ve mental retardasyonun önemli bir nedenidir. İnsan somatik hücrelerindeki kromozom sayısının 46 olduğunu ilk olarak 1956 yılında Tijo ve Levan bildirmişlerdir. Tüm özelliklerin kuşaktan kuşağa aktarılmasını sağlayan kromozomlar; şekil, büyüklük ve sayı gibi pek çok bakımdan her canlı türü için sabit ve özgündür. Bilindiği gibi, 23 çift olan insan kromozomlarının 22 çifti otozomal ve 1 çifti de gonozomal kromozomlardır. Kromozomlar sentromer lokalizasyonlarına göre metasentrik, submetasentrik ve akrosentrik kromozomlar olarak üçe ayrılır. Kromozom çiftinin kendine özgü bir büyüklüğü, morfolojisi ve boya alma özelliği vardır. Bu özelliklerine göre de kromozomlar; A (1-3), B (4-5), C (6-12 ve X), D (13-15), E (16-18), F (19-20), G (21-22 ve Y) olarak gruplandırılırlar. Kromozom sayısındaki ya da yapısındaki değişiklikler kromozom düzensizliklerini oluşturur (9, 12, 14, 34, 45).

2.2.1. Sayısal Düzensizlikler

İnsan germ hücrelerinde 23 adet kromozom bulunur. Bu sayı insan için haploid sayıdır. İnsan somatik hücrelerindeki kromozom sayısı ise germ hücrelerindeki sayının ya da haploid kromozom sayısının iki katıdır, yani diploiddir ve diploid bir hücrenin kromozom sayısı 46 dır (14, 34).

Öploidi: Hücredeki kromozom sayısının haploid sayının tam katı kadar olmasıdır.

1. Haploidi: ($n=23$) Germ hücrelerindeki kromozom sayısıdır.
2. Diploidi: ($2n=46$) Fertilizasyon sonrası somatik hücrenin kromozom sayısıdır.
3. Triploidi: ($3n=69$) Haploid kromozom sayısının üç katı artmasıdır.
4. Tetraploidi: ($4n=92$) Haploid kromozom sayısının dört katı artmasıdır.

Öploidide, hücre bölünmesi sırasındaki kusur nedeniyle ortaya çıkar. Öploidide temel kusur, hücrede nükleus bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır, iki farklı bölünme hatası tanımlanmıştır;

1. Endomitoz: Hücre bölünmesine hazırlık olarak kromozomlar katı kadar çoğalır. Mitoz bölünmenin ilk iki evresi (profaz ve metafaz) gerçekleşir fakat anafaz ve telofaz gerçekleşmeyerek sitoplazma bölünmesi oluşmaz. Böylece kromozom sayısı her bölünmede katı kadar artmış olur.

2. Endoreduplikasyon: Endomitozda olduğu gibi kromatidler bölünür ve kromozomlar katı kadar artar. Ancak hücre bölünmesi gerçekleşmez ve sentromerlerinden birbirine tutunmuş durumda çok sayıda kromatidden oluşmuş olan (4-8 kromatid) kromozomlar ortaya çıkar.

Anöploid: Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere denir. Anöploid kromozomlardaki artmayı ifade ediyorsa hiperploid, eksilmeyi ifade ediyorsa hipoploid adını alır. Gametik hücrelerde haploid sayının katı kadar olmayan artışı hiperhaploid, eksilmesi ise hipohaploid adını almaktadır.

1. Hiperploid: En çok gözlenen hiperploidiler;

Trizomi ($2n+1$): Kromozom çiftlerinden birinin 2 yerine 3 tane olmasıdır. Tetrazomi ($2n+2$): Aynı homolog kromozom çiftinden bir yerine iki çift bulunması ya da farklı iki homolog kromozom çiftinin trizomisini ifade eder.

2. Hipoploid:

Nullizomi ($2n-2$): Herhangi bir kromozom çiftinin bulunmaması durumudur.

Monozomi ($2n-1$): Bir çift homolog kromozomun bir üyesinin bulunmaması durumudur (14).

Anöploidinin oluş nedenleri hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan kusurlardır. Bunlar iki şekilde oluşmaktadır;

1. Kromozom Ayrılamaması (Nondisjunction): Bölünmeye hazırlık döneminde kendini iki katına çıkaran kromozomlar metafaz evresinde ekvatoriyal düzlemde toplanırlar, sentromerlerinden uzunlamasına ikiye bölünen her yarım ayrı bir kutba gider ve bölünme olgusu tamamlanır. Kimi zaman kromozom uzunlamasına bölünemez ve bir kutba iki yarım giderken diğer kutba kromozom gitmez. Bu olaya kromozom ayrılamaması (nondisjunction) denir. Hem mitoz hem de mayozda meydana gelebilir, ancak bölünme türüne göre ortaya çıkacak sonuç da değişik olacaktır. Kromozom ayrılamamasının en sık görüleni ve önemli olanı mayoz bölünme esnasında ortaya çıkanıdır. Kromozomun ikiye bölünüp ayrı kutplara gitmesi beklenirken bunun gerçekleşmemesi nedeniyle hücrelerden birinde söz konusu kromozom hiç bulunmazken (nullizomi) diğerinde aynı kromozomdan iki tane bulunacaktır (dizomi). Aynı iki kromozomu taşıyan gamet normal bir gametle birleşecek olursa zigot trizomik olacak, ilgili kromozomu taşımayan gamet normal gametle birleşecek olursa zigot monozomik olacaktır (14).

2. Anafazda Geri Kalma: Kromozom ayrılamamasına benzer. Burada uzunlamasına bölünerek kutplara çekilecek olan kromozomlardan biri anafaz evresinde geri kalır. Hareket etmekte geç kalan bu kromozom ya homologunun bulunduğu kromozom grubuna katılır ya da kaybolur. Homologunun bulunduğu hücreye katılırsa bir hücrede aynı kromozomdan iki tane bulunur, diğerinde hiç bulunmaz. Sonuç olarak kromozom ayrılamamasına benzer. Fakat sitoplazma bölünmesi sırasında kaybolacak olursa hücrelerden biri normal kromozom kuruluşuna sahipken diğerinde bir kromozom eksik olacaktır (14).

2.2.2. Yapısal Düzensizlikler

Kromozom kırıklarının tümü yapısal kromozom düzensizlikleriyle sonuçlanır. Bir kromozom kırığında iki yapışkan uç, DNA tamir mekanizmaları sayesinde bir araya getirilir. Ancak ortamda birden fazla kırık varsa, tamir mekanizmaları, kromozom fragmentlerini birbirlerinden ayıramadıkları için yanlış eşleşme meydana gelebilir. Bu durum kromozomların yapılarının ve kırık noktalarında bulunan genlerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Tüm bu normalden sapmalar da kendini fenotipe ifade eder. Yapısal kromozom anomali çeşitleri şunlardır;

Translokasyon: Kromozomal materyalin bir kromozomdan diğerine aktarılması ile oluşan yapısal düzensizliklerdir.

Delesyon: Kırılma nedeniyle bir kromozom parçasının kaybıdır. Çok büyük parça kayıpları yaşamla bağdaşmaz. Total haploid genomun %2 sinden fazla olan kayıplar letaldir.

İnversiyon: Bir kromozom üzerinde iki kırık noktası arasındaki kromozom parçasının kendi eksenini etrafında 180°dönerek yapışmasıyla oluşur. Sentromeri içeriyorsa perisentrik, içermiyorsa parasentrik inversiyon adını alır ve dengelidir. Kırılma noktalarındaki genlerin harabiyeti durumunda nadiren de olsa klinik problemlerle karşılaşılır.

İzokromozom: Bir kromozomun bir kolunun kaybı, diğer kolunun duplikasyonudur. Mayoz bölünmede sentromerin boyuna bölünmesi gerekirken enine bölünmesi sonucu oluşur. En sık görülen izokromozom; Turner sendromu ile sonuçlanan X kromozomunun uzun kol izokromozomudur.

Halka Kromozomu: Bir kromozomun her iki kolunda kırık oluşması ve yapışkan uçların birbirleriyle kaynaşması sonucu oluşur, ilgili kromozomun terminal uçları kaybolmuştur. Bu nedenle kromozom bir otozom ise etkileri ağır olur. En sık X kromozomunun halka formu gözlenir (14).

2.3. Anöploid Tayininde Kullanılan Genetik Analiz Yöntemleri

2.4.1. Klasik Kromozom Analizi

2.4.2. Moleküler Sitogenetik Analiz

2.4.3. Moleküler Analiz

2.3.1. Klasik Kromozom Analizi

Prenatal tanıda klasik kromozom analizi, kromozomların uygun şekilde kondanse oldukları metafaz safhasındaki hücrelere, genellikle G-bantlama uygulanarak yapılmaktadır. Amniyotik sıvıda bölünme aşamasında fetal hücre bulunmadığından metafaz safhasında hücreler elde etmek için kültür edilmelidir. CVS materyalindeki bazı fetal hücreler spontan olarak bölünmektedirler ve bunlardan metafaz safhasındakiler analiz için kullanılabilirler. Spontan bölünen bu hücrelerdeki kromozomlardan, kültüre edilen hücrelerdekine göre daha fazla kondanse olduklarından daha düşük resolüsyonda bantlar elde edilir (25).

Resolüsyon seviyesi yapısal anomalileri saptayabilmek için özellikle önemlidir. Yüksek resolüsyonda G-bantlamaya rağmen 5 Mb dan daha az büyüklükteki delesyon ya da dublikasyonlar bu yöntemle tespit edilemeyeceklerdir (25).

Amniyon sıvısı veya koryon villus hücrelerinin kültüre edilmesi ve kromozom analizi için 1-2 haftalık süre gereklidir. Koryon villuslar, kısa süreli veya uzun süreli kültürü takiben karyotipleme için kullanılabilirler. Kısa süreli kültür ile, çok daha çabuk sonuç verilebilmekle birlikte, kromozomlarda detaylı analiz için gereken yeterli bant rezolüsyonu olmayan, kötü kalitede preparatlar elde edilir. Çoğu laboratuvarında her iki teknik birlikte kullanılmaktadır, ancak kültür tekniklerinden sadece biri seçilecekse, tercihimiz mezankimal kor hücrelerinin uzun süreli kültür tekniğinden yana olmalıdır (31).

Kültür Başarısızlığı: Eğer fetusda anomali bulunduğu ebeveynler gebeliği sonlandırmayı düşünebilme şansına sahip olurlarsa, kendilerine mümkün olan en kısa

kısa zamanda bildirilmelidir. Çünkü, prenatal tanı her zaman zamana karşı bir yarışır: Gebelik sonlandırmanın 20. haftadaki tıbbi riski, 8. haftadaki sonlandırma riskinden 20 kat daha fazladır. Kültürün başarısızlık oranı az görülmekle birlikte, bir sorun teşkil edebilir. 1996 yılında Reid ve arkadaşları tarafından 4134 amniyon örneği çalışılmış, örneklerin %99 unda karyotipleme ile sonuç elde edilmiş ve anöploidili vaka oranı % 4 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada önemli nokta; karyotipleme ile sonuç elde edilemeyen %1 lik kısım (42 vaka) ileri tekniklerle takip edildiğinde bu grubun %19 unun kromozomal açıdan anomali saptanmış olmasıdır. CVS kültüründe üreme olmazsa kromozom çalışmasını amniyosentez ile tekrarlamak için zaman vardır. Eğer, amniyosentez sonrası hücre kültür başarısı olmaz ise, gebelik haftasına göre amniyosentez tekrarına gidilir, veya kordosentez önerilir (23, 31, 35, 37).

Dezavantajlarına rağmen prenatal takipte klasik kromozom analizi (karyotipleme) “Altın Standart” tır (21, 40).

2.3.2. Moleküler Sitogenetik Analiz

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskopik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskopik preparasyonlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya konulmuştur (12, 14, 26, 45).

In Situ Hibridizasyon, kısa adıyla ISH tekniği spesifik DNA veya RNA sekanslarının doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin kendi doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlayan, doku/hücre arkitektinin bozulmadığı bir tekniktir (3, 14, 45).

Herhangi bir kavram kargaşasını önlemek için terimler hakkında bilgi vermek yerinde olacaktır. In Situ Hibridizasyon (ISH), tekniğin genel adıdır ve prob DNA sı ile örnek/materyal DNA sının kendi ortamında hibridize edilmesini ifade eder. Non-

izotopik In Situ Hibridizasyon (NISH), radyoaktif olmayan bir madde ile işaretlenmiş prob kullanılarak yapılan ISH analizidir (3, 14, 45).

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir. Diğer bir deyişle NISH in bir alt dalıdır (3, 14, 45).

FISH tekniği duyarlılığı ve uygulanmasındaki kolaylık nedeniyle hem temel araştırma hem de diyagnostik alanda rutin olarak kullanılmaktadır. 1 Mb kadar küçük DNA problemleri ile metafaz kromozomları ve interfaz kromatini incelenebilmekte, prob üretiminde YAC klonlarının PCR ile amplifikasyonu, %99 etkinlikle interfaz tanıda kullanılabilir (Çizelge 2.4.) (3, 14, 45).

Çizelge 2.3.: FISH Tekniğinin Kullanım Alanları

DiAGNOSTİK	ARAŞTIRMA
-İnterfaz sitogenetiği	-Gen haritalaması
-Klinik sitogenetik ve prenatal tanı	-Gen ekspresyon analizi
--Anöploidi tayini	-Tümör biyolojisi
--Yapısal anomalilerin saptanması	-Mikrobiyoloji/viroloji
--Mikrodelesyon sendromları	-Somatik hücre hibridizasyonu
-Dokularda enfeksiyon ajanlarının tanısı	-Mayoz/Mitoz analizleri
-Kanser sitogenetiği	-Hücre tanımlama

Çizelge “Caferler, J.S.: Endoservikal örneklerde fetal hücrelerin tespiti, Doktora tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı na bağlı Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskişehir, 1996.” dan alınmıştır (9).

FISH tekniğinin tercih edilmesinin önemli nedenlerinden biri de interfaz nükleuslarında kromozom analizi yapma olanağını sağlamasıdır. Bu özelliği nedeniyle prenatal ve postnatal tanı ile kanser genetiğinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır. İnterfaz sitogenetiğinin prenatal tanıda uygulandığı diğer bir alan da preimplantasyon

embriyo genetiğidir. Preimplantasyon embriyoları FISH aracılığı ile sayısal anomaliler yönünden incelenebilmektedir ve fetal cinsiyet X ve Y kromozomlarına özgü problemler aracılığı ile interfaz nükleuslarında saptanabilmektedir. Translokasyon taşıyıcısı ebeveynlerin fetuslarının anöploidi açısından taranması hızlı şekilde yapılabilmektedir. X kromozomal hastalık riski halinde fetal cinsiyetin hızlı bir şekilde belirlenmesi, DNA ve biyokimyasal analiz endikasyonu olup olmadığının saptanması açısından önemlidir. Lokus spesifik problemler ile prenatal ve postnatal dönemlerde anöploidi tayımları, delesyon sendromları, XX erkeklerde SRY geni, XIST geninin varlığı ve benzeri durumlar yine interfaz nükleuslarında incelenebilirler (3, 14, 45).

Bunun yanında germ hücrelerindeki anöploidi ve yapısal yeniden düzenlenmelerinin tanısında alfa satelit, lokus spesifik ve tüm kromozom problemleri kullanılabilir (14).

FISH Tekniğinde Kullanılan Problemler ve Özellikleri: Nükleik asit problemlerinin sitolojik, hücresel veya kromozom preparatlarındaki denatüre edilmiş DNA veya RNA ile hibridizasyonuna dayanan moleküler bir teknik olan FISH e, belirli bir hücresel veya kromozomal bölgenin görünür hale gelmesi ancak o bölgeye spesifik olan bir problemin kullanılmasıyla gerçekleşebilir. Bu nedenle hibridizasyon tekniğinde en önemli aşamalardan biri problem seçimidir. Hibridizasyonun güvenilir ve duyarlı olmasında, kullanılan problemin amaca yönelik olması, uzunluğu, kalitesi, incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine (kromozom analizi) uygun olması ayrıca hapten molekülü ile tam olarak işaretlenmiş olması büyük önem taşımaktadır (14, 45).

FISH tekniğinin sitogenetik alanındaki kullanımında 4 farklı problem çeşidi vardır;

- a. Tekrarlayan dizi problemleri (satelit problemleri)
- b. Lokusa spesifik problemler
- c. Tüm kromozomu boyayan problemler (library problemleri)
- d. Banda özgü problemler
- e. Telomerik, subtelomerik problemler (14, 45).

a. Tekrarlayan dizi problemleri: Sentromerik ve perisentromerik bölgede bulunan tekrar dizilerine özgü problemler α , β ve klasik satelit problemleri olarak adlandırılır. Alfoid DNA dizileri kromozomlara özgü olup, sentromerik bölgede yer alırlar. Bu dizilere ait α satelit problemlerinin sinyalleri çok kuvvetlidir ve özellikle interfaz sitogenetiğinde anöploidilerin saptanmasında kullanılırlar. β satelit problemler akrosentrik kromozomların polimorfik satelit bölgelerinin, klasik satelit problemler ise 1., 9., 16. kromozomların heterokromatin alanları ile Y kromozomunun uzun kolunda yer alan tekrar dizilerinin gösterilmesi amacıyla kullanılırlar (14, 45).

b. Lokusa spesifik problemler: Klonlanmış genlere özgü dizileri içeren bu problemler ilgili bölgeye ilişkin amplifikasyon, yapısal düzensizlikler ve delesyon sendromlarının tanısında kullanılmaktadır. Hedefin 2 Mb dan uzun olması analiz başarısını arttırmaktadır (3, 14, 45).

c. Tüm kromozom boyama problemleri: Kromozom boyunca değişik bölgelere özgü DNA dizisi içeren prob karışımının kullanılması halinde, o dizilere özgü kromozom tümüyle boyanır. Hibridizasyonu takiben uygulanan görüntüleme basamakları ile incelenen kromozom son derece belirgin olarak gözlenir. Translokasyon değerlendirmesinde marker ve ring kromozom incelemelerinde tercih edilen problemlerdir (3, 14, 45).

d. Banda özgü problemler: Şüpheli görülen ve spesifik probun olmadığı durumlarda kullanılan bu yöntemde önce ilgili kromozom segmenti diseksiyonla alınır. DNA ekstraksiyonundan sonra PCR ile çoğaltılarak prob haline getirilir ve normal metafaz kromozomları ile hibridize edilir. Özellikle dengesiz translokasyonlarda, terminal delesyonların saptanmasında uygulanan bir yöntemdir (3, 14, 45).

e. Telomerik ve subtelomerik problemler, kromozom kollarının en uçunda yer alan tekrar dizilerine özgü problemler olup telomeri ve subtelomerik bölgeyi içeren yapısal kromozom anomalilerinde sık kullanım alanı bulmaktadır (14, 45).

Yukarıda ifade edilen problemlerin elde edilmesinde klasik klonlama tekniklerinden, PCR, flow sitometri ya da somatik hücre hibridizasyonu yöntemlerinden yararlanılmaktadır (14, 45).

Anöploidi taraması için FISH tekniğini fetal hücrelerin interfaz nükleuslarına, lam üzerine fikse kültüre edilmemiş veya kısa dönem kültürden sonra hücrelerin spesifik problemler ile hibridizasyonu şeklinde uygulamak mümkündür. Yüksek riskli gebeliklerden alınan fetal materyalde 13., 18., 21. ve cinsiyet kromozomlarının doz tayininde çok çabuk sonuç alınabilen, etkili ve güvenilir bir tekniktir. Klasik kromozom analizi ile doğrulandığı takdirde trizomi taramasında rutin olarak uygulabilecek bir prenatal tanı testidir. Yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır.

- a- İleri gebelik haftalarındaki örneklerde artmış ölü hücre ve hücre artıkları oranı sebebi ile zayıf hibridizasyon ve tersine 15. haftadan daha erken gebeliklerde bu teknik için hücre sayısının yetersiz olabilmesi,
- b- Kan ile kontamine materyalde düşük hibridizasyon etkinliğine eğilim ve maternal hücrelerin hibridizasyonuna bağlı olarak yanlış sonuç ihtimali,
- c- Klasik karyotiplemeye göre en önemli dezavantajı; karyotipleme ile saptanabilen anomalilerin FISH ile %70'inin saptanmasıdır.
- d- Hedefe yönelik analiz yapılabilmektedir (38).

Prenatal tanıda FISH tekniği; interfaz nükleusuna uygulanabilen, spesifik problemler ile kromozomun bir parçasında meydana gelebilecek doz değişikliklerini gösterebilen, 10 yılı aşkın süredir yaygın kullanım alanı bulmuş ve iyi denenmiş bir tekniktir. American College of Medical Genetics te 2000 yılında yayınlanan bir raporda, gebelik takibindeki kararların ve tanıdaki problemlerin sadece FISH sonucuna göre belirlenemeyeceği ve FISH sonuçlarının mutlaka konvensiyonel kromozom analizi ve klinik bulgularla anlam kazanacağı belirtilmektedir (2, 18, 30).

Waters ve Waters 1999 yılında yayınladıkları raporda 1987-1998 yılları arasında FISH tekniği uyguladıkları prenatal tanı örneklerinden aldıkları sonuca göre bu tekniği 1 gün gibi kısa bir sürede erken ve doğru sonuç alınabilecek bir test olarak

tanımlamışlardır. FISH tekniği daha çok anormal USG bulgusunu desteklemek için, “ertesı gün testi” olarak kullanılmaktadır (18, 48).

2.3.3. Moleküler Analiz

QF-PCR Yöntemi İle Anöploidi Tayini:

Lubin ve arkadaşları 1991 yılında X kromozom anöploidi tanısında ilk defa QF-PCR yöntemini uygulamışlardır. Bu çalışmayı 21., 13., ve 18. kromozom trizomilerinin tek ya da multiplex PCR reaksiyonu ile tanısına yönelik çalışmalar takip etmiştir (27).

QF-PCR uygulamasının en yaygın tipi; STRs olarak bilinen kromozom spesifik tekrarlayan DNA dizilerinin amplifikasyonunu içermektedir. STRs lar stabil ve polimorfiktirler ve üçlü, dörtlü, ya da beşli nükleotid tekrarlarına bağılı olarak uzunlukları değişmektedir. Örnek DNA, floresans primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Böylece PCR ürününde Gene Scan yazılımı bulunan otomatize DNA dizileme cihazı kullanılarak tekrarlayan dizilerin pik alanları görülebilir ve ölçülebilir.

Bir STRs bölgesi için heterozigot normal kişilerin DNA ları amplifiye edildiğinde, aynı alanda iki pik varlığının görülmesi beklenmektedir. Trizomik insanların DNA ları amplifiye edildiğinde aynı alanda; üç adet pik varlığı (üç farklı uzunlukta alel varlığı) ya da üç alelin ikisinde eşit uzunlukta STRs bulunması nedeni ile yalnızca iki pik (iki alel varlığındaki gibi) saptanabilecektir. İki piki bulunan dialelik örneklerde kısa ve uzun alellere ait pik alanları oranı 0.8 ile 1.4 arasında olan örnekler normal kabul edilmektedirler. İki piki bulunan dialelik örneklerde bu oran <0.65 ya da >1.8 ise örnek trizomik olarak düşünölmektedir (25).

QF-PCR ile prenatal taramada yaygın kullanılan güvenilir bir tekniktir. Cirigliano ve arkadaşlarının 2006 yılında yayınlanan bir çalışmasında 1999-2005 yılları arasında toplanan 30.000 örnekte (28.040 amniyon sıvıvı, 1100 adet koryonik villus örneği, 196 fetal kan örneği, 694 düşük materyali) QF-PCR yöntemiyle anöploidi taraması yapmışlardır. Bu çalışmada 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarına spesifik STR

markerleri kullanmışlardır. Bu çalışmada elde ettikleri sonuçları konvensiyonel sitogenetik analiz sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmada örneklerin %99,9 da DNA ekstraksiyonu ve QF- PCR amplikasyonu yapabilmışlardır. Yalnızca 18 örnekte sonuç alamamışlardır. Bunun sebebi olarak da sitogenetik kültürlerinde yoğun bakteri veya mantar hücresi kontaminasyonu gösterilmiştir. 42 vakanın 33 ünde hücre kültürü başarısızlığı, 9 unda maternal hücre kontaminasyonu sebebiyle sitogenetik analizleri yapılamamıştır. Bu 42 vakanın hepsinde QF- PCR ile başarılı sonuçlar elde edilmiş ve bu sonuçlar daha sonra yapılan invaziv girişimlerle doğrulanmıştır. Çalışmanın sonucunda bütün örnekler değerlendirildiğinde QF-PCR yönteminin sensitivitesini % 92.3, spesifitesini de % 100 olarak bulmuşlardır (11).

Slater ve arkadaşlarının çalışmalarından bildirdikleri üzere, QF-PCR yönteminde multiplex PCR kullanıldığından her test için ancak 13 ya da daha az lokus değerlendirilebilmektedir. QF-PCR yönteminde kullanılan markerler her test için informatif olmayabilmektedir (40).

2.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Yöntemi

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları, son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir. Yöntemin prenatal tanıda kullanılması konusunda ilk klinik verileri 2003 yılında Slater ve arkadaşları yayınlamışlardır (39, 40).

MLPA; 45 taneye kadar spesifik dizinin, bir multiplex PCR dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir metottur. Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130 - 490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon / insersiyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri (bağlanma bölgesindeki) görülebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunur (50).

Tekniğe; kolay uygulanabilir, üretken, sensitif olması ve doğru multipleks analiz sonucu verebilmesi için birçok modifikasyon yapılmıştır. Her bir MLPA probu hedef diziyeye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış probalar 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probu diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziyeye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerinin sentezi

için M13 klonlarının tek zincirli DNA sı kullanılmıştır. M13 DNA sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle proplar arasında 6 ya da 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün proplar farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı propların birbirleri ile heterodubleks formasyonunu önlemek için propların sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotitler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki proplar amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı oligonükleotid proplarının hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları bize amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri sayesinde avantaj sağlamıştır. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (39).

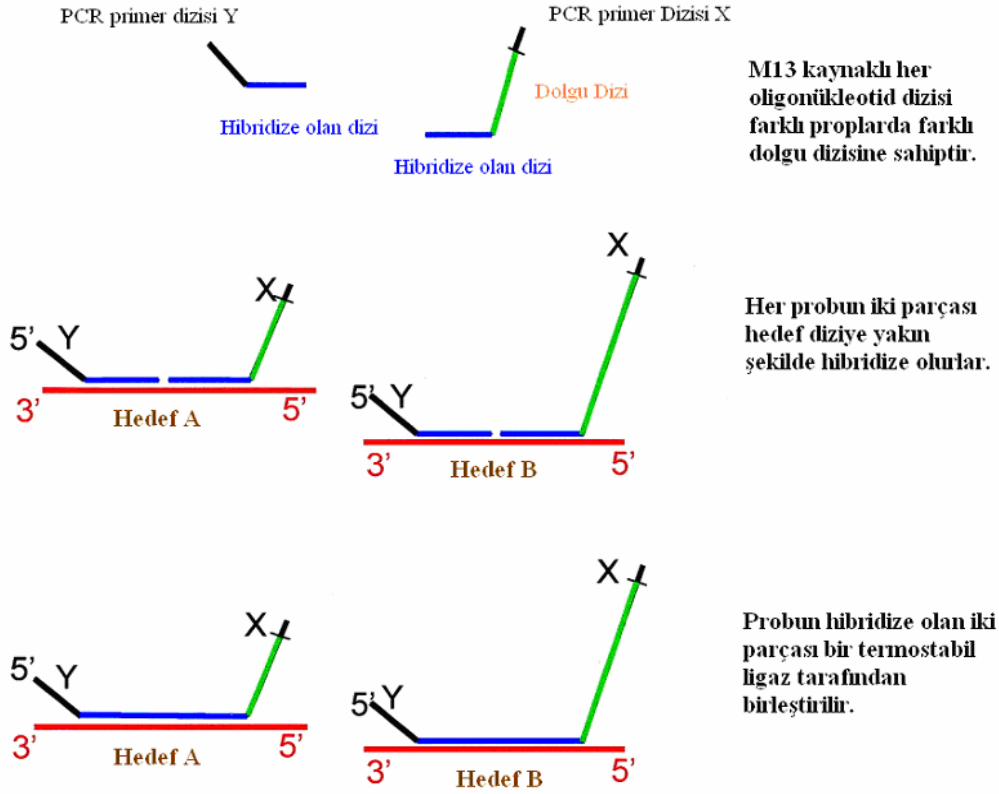
Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün proplar için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N-(3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (40).

Genomik DNA da olduğu gibi mRNA araştırmalarında da kullanılabilir. MLPA yöntemi ile CpG metilasyon paterninin multiplex kantitasyonunu da mümkündür. Günümüzde 300 den fazla laboratuvarında, MLPA yöntemiyle çeşitli genlerin, delesyon ve amplifikasyonları araştırılmaktadır (50).

Şekil 2.4.: MLPA Reaksiyonunun İşleyişi

MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

- Denatüre genomik DNA 40 ayrı prob ile hibridize edilir.
- Her bir MLPA probu, biri sentetik, diğeri M13 kaynaklıdır.



Bütün prob ligasyon ürünleri tek bir primer çifti kullanılarak PCR ile amplifiye edilirler.



Amplifikasyon ürünleri elektroforez ile ayrıştırılır. Prop amplifikasyon ürünlerinin göreceli miktarları hedef dizinin göreceli doz miktarını belirler.

Şekil "Schouten, J.P., McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Research, 2002; 30: e57." den alınmıştır (39).

2.4.1. MLPA Yönteminin Anöploidi Tayininde Kullanılması

Bu konuda yapılmış sınırlı sayıdaki çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. Yapılan çalışmaların tümü MLPA yönteminin anöploidiye spesifik problemleri ile gerçekleştirildiğinden bu yöntemle güvenilir sonuç alınamayacak örnekler (anne kanı ile görünür şekilde kontamine olan örnekler, öploidik kromozom anomalileri, mozaik karyotipe sahip örnekler, kromozomal dengeli/dengesiz yeniden düzenlenmelerin mevcut olduğu vakalar) çalışmaya alınmamıştır ve/veya testin güvenilirliği ilgili hesaplamalara dahil edilmemiştir.

Slater ve arkadaşları 2003 yılında MLPA tekniği ile yaptıkları anöploidi tarama çalışmasında; 1 ml amniyon sıvısını 50 mmol/ l NaOH ile muamele ederek, toplam 30 µl lik hücre lizatından 5 µl sini MLPA tekniği için kullanmışlardır. Toplam 18 anöploidi vakasında yanlış negatif sonuç olmaksızın doğru sonuçlar elde edilmiştir. Testin sensitivitesi % 100 olarak bulunmuştur. Buna rağmen çalışılan anöploidi vakası sayısal olarak yetersiz bulunarak testin spesifitesinin %95-100 arasında kabul etmenin daha uygun olacağını belirtilmiştir. Aynı çalışmada 474 normal örnekten yanlış pozitif sonuç olmaksızın doğru sonuçlar elde edilmiştir. Testin spesifitesi %100 olarak bulunmuştur. Çalışılan örneklerin hepsinden anlamlı sonuç alınmıştır, testin başarısızlık oranı %0 olarak bulunmuştur (40).

Gerdes ve arkadaşları 2004 yılında MLPA tekniği ile yaptıkları anöploidi tarama çalışmasında; 809 amniyotik sıvı örneğinden 3-4 ml, 784 koryonik villüs örneğinden 5 er mg örnek alınarak (toplam vaka sayısı 1593) QIAamp kit ile DNA ekstraksiyonu yapılmışlardır. 27 anöploidi vakasının tümünde doğru sonuçlar elde edilmiştir. Testin sensitivitesi %100 olarak bulunmuştur. Normal örneklerin tümünde doğru sonuçlar elde edilmiştir. Testin spesifitesi %100 olarak bulunmuştur. 51 örnekte sonuç alınamamıştır, testin başarısızlık oranı %3.2 olarak bulunmuştur. Buna gerekçe olarak; pratik uygulamadaki ve sonuçların değerlendirilmesindeki deneyimsizlik gösterilmiştir (19).

Hochstenbach ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları MLPA ile anöploidi taraması çalışmasında; 1 ml amniyotik sıvıya 1.5 µL Proteinaz K (10 mg/mL) ile

muamele ederek elde ettikleri hücre lizatından 5 µl si ile MLPA tekniğine başlanmıştır. 24 anöploidi vakasının tümünde doğru sonuçlar elde edilmiştir. Testin sensitivitesi %100 olarak bulunmuştur. 480 normal örnekte sonuçlar doğru olarak bulunmuşken, karyotipi 46,XY olan bir vakada MLPA ile sonuç 47,XXY olarak yanlış bulunmuştur. Testin spesifitesi %99.8 olarak bulunmuştur. 10 örnekte sonuç alınamamıştır (%1.9). Buna sebep olarak yetersiz DNA miktarı gösterilmiştir. Testte sonuç alınamayan örnekler ile bu örneklerin gebelik haftaları arasında DNA yetersizliği ile ilgili bağlantı bulunmadığı saptanmıştır (22).

MLPA yöntemi ile kromozom dozu hesap edilirken internal ve eksternal kontrol pikleri birlikte kullanılarak kromozomların relatif doz tayini yapılmaktadır. Gerdes ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada 2000 den fazla örnekte, sadece internal kontrol pikleri kullanılarak kromozom doz tayinini başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir (20).

MLPA anöploidi kitinde; 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının doz tayinlerinin yapılmasına imkan sağlayan bu kromozomlara spesifik olarak dizayn edilmiş proplar kullanılmaktadır. Kit içinde; Y kromozomunun 4 farklı hedef bölgesine, diğer kromozomların 8 er farklı hedef bölgelerine spesifik 32 prob ve ayrıca yöntemin hibridizasyon basamağını ve DNA yeterliliğini kontrol amacı ile kullanılan 5 adet daha kontrol probu mevcuttur. Her bir probun genomik hedef bölgesi ve ayrıca uzunluğu birbirinden farklıdır. Çizelge 2.5.1. de propların özellikleri detaylı olarak gösterilmiştir (50).

Çizelge 2.4.1.: MLPA 095 Anöploidide Kullanılan MLPA Problemlerinin Özellikleri

Uzunluk	Kromozom	Prob	GEN	Krm. Yerleşimi
64-70-76-82		DQ Kontrol Problemleri		
94		Sentetik Kontrol Probu		Chr. 2q14
136	21	0815-L0333	SIM2	21q22.2
142	18	2127-L1638	MADH4	18q21.1
148	13	0798-L0316	ABCC4	13q32
154	X	0652-L0637	AR	Xq11.2
160	Y	2153-L0596	SRY	Yp11.3
166	21	0813-L0636	NCAM2	21q21.1
172	18	0808-L0326	PMAIP1	18q21
178	13	0799-L0317	CCNA1	13q12.3
184	X	2155-L1607	FACL4	Xq23
193	Y	2152-L0592	SRY	Yp11.3
202	21	2115-L1605	USP25	21q11.2
211	18	2845-L2275	SS18	18q11.2
220	13	0582-L0147	RB1	13q14.3
229	X	2898-L2369	ARX	Xp22.1
238	Y	1071-L0464	UTY	Yq11
247	21	0816-L0334	STCH	21q11
256	18	0807-L0325	NFATC1	18q23
265	13	2125-L1636	DACH	13q21.3
274	X	2904-L2370	TM4SF2	Xp11.4
283	Y	4189-L3982	ZFY	Yp11.3
292	21	2116-L1604	SOD1	21q22.1
301	18	0811-L0329	TYMS	18p11.3
310	13	0871-L0461	P85SPR	13q34
319	X	0819-L0337	L1CAM	Xq28
337	21	0812-L0330	APP	21q21.3
346	18	0810-L0328	SERPINB2	18q21.3
355	13	0452-L0360	BRCA2	13q12.3
364	X	2906-L2300	RPS6KA3	Xp22.2
382	21	2834-L2265	TFF1	21q22.3
391	18	2846-L2276	SS18	18q11.2
400	13	0801-L0639	DLEU1	13q14.3
409	X	0820-L0338	PDCD8	Xq25
427	21	0817-L0335	TIAM1	21q22.1
436	18	2847-L2277	MC2R	18p11.2
445	13	0802-L0320	ING1	13q34
454	X	1388-L2509	DMD	Xp21.2

Çizelge “www.mlpa.com” wep adresinden alınmıştır (50).

Amniyositlerin hücre bütünlüğünün bozulduğu ve/veya hücre sayısının diğer yöntemler için yetersiz olduğu durumlarda MLPA yöntemi ile nispeten daha stabil olan genomik DNA varlığı sonuç vermek için yeterli olabilecektir. 20 ng DNA miktarı MLPA tekniği ile sonuç vermeye yeterli olabilmektedir. Teorik olarak 3500 e yakın sayıdaki amniyosit bu yöntem için yeterli DNA miktarını sağlayabilecektir (21, 25, 36, 38).

Winsor ve arkadaşlarının 1996 da yayınladıkları bir çalışmada; amniyosentez sonucu elde edilen amniyotik sıvıların %21.4 ünde (miktarları değişik olmakla birlikte) anne kanı kontaminasyonuna rastlandığını, bunların sadece %1-2 sinde makroskopik olarak anne kanı kontaminasyonunun fark edilebileceğini belirtmişlerdir. Anne kanı kontaminasyonu prenatal tanıda fetal anöploidi açısından yanlış pozitifliğe sebep olabilecek önemli bir problemdir. Makroskopik olarak anne kanı ile kontamine amniyosentez sıvısına MLPA kiti ile anöploidi taraması yapılmamaktadır (49, 50).

Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında; FISH yönteminin anöploidi tanısında tek örnek için sarf malzeme maliyetinin QF-PCR yöntemindekine göre yaklaşık 5 kat fazla olduğu, MLPA yönteminin ise test başına sarf maliyeti olarak en avantajlı yöntem olduğu belirtilmiştir (Örnek başına düşen sarf malzeme maliyeti Euro cinsinden; MLPA için 12, QF PCR için 14, FISH için 50 olarak bildirilmiştir.). Bu yöntemlerin kullanımının yaygınlaşması ve yöntem basamaklarında uygulanabilecek iyileştirmeler sebebi ile örnek başına düşen sarf malzeme maliyetlerinin zaman içinde azalması beklenmektedir (22, 50, 51)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Gereçler

3.1.1.Kullanılan Gereçler

Spektrofotometre (Eppendorf)
Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 310)
Spektrofotometre Küvetleri (Eppendorf)
Mikro Pipet takımı (Gilson)
Santrifüj (Eppendorf 5415C)
Mikrosantrifüj (Eppendorf)
Pastör pipeti
Thermal cycler (PE GenAmp PCR System 9700)
Su banyosu (Nüve)
Etüv (Inducell)
Vorteks (Heidolph)
Deep-freeze (Meraeus)
Buzdolabı (Arçelik)
Santrifüj tüpleri
Eppendorf Tüpü (1,5 ml lik)
PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
ABI 310 yükleme tüpleri (ABI)
ABI 310 47 cm Kapiller (ABI)
Toplama tüpü (QIAGEN)
Spin kolonu (QIAGEN)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen QIAmp DNA Mini Kit)
MLPA Anöploidi Kiti (Salsa P095- MRC Holland)
Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)
10X EDTA lı Buffer (ABI)
Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)
Hi-Di Formamide (ABI)
Mineral Yağ (Roche)
Etanol
Distile Su

3.2. Yöntemler

3.2.1. Materyal Seçimi

Çalışmamıza prenatal tanı amacıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı na 2000-2006 yılları arasında başvuran hastalardan alınarak saklanmış örneklerden seçilerek, 500 amniyosentez sıvısı dahil edilmiştir.

Anne kanyla kontamine amniyosentez sıvıları, konvansiyonel karyotipi mozaik bulunan hastalar ve kromozomal dengeli/dengesiz yeniden düzenlenimi olan örnekler çalışmamıza alınmamıştır.

69,XXX triploidi vakası, MLPA anöploidi kiti ile muamele edilerek sonucun değerlendirilmesi amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çalışmamızın amaçlarına yönelik olarak, MLPA tekniği ile elde edilecek sonuçların karşılaştırılması için karyotip ve FISH sonuçları mevcut olan örnekler çalışmaya alınmıştır.

3.2.2. Kültüre Edilmemiş Amniyon Sıvısının DNA Ekstraksiyonu İçin Hazırlanması

- 2 ml amniyon sıvısı 12 ml lik santrifüj tüpüne alındı.
- 13.000 rpm de 8 dk. santrifuj edildi. Süpernatant, pastör pipetle pellete zarar vermeden alınarak atıldı.
- Pelletin üzerine 1.5 ml PBS solüsyonu eklendi. Çok kısa süreli vortekslendi. Pipetajla homojenize edilerek 1.5 luk ependorf tüpüne aktarıldı.
- Ependorf tüpü mikrosantrifuj cihazında 14.000 rpm de 5 dk. Santrifuj edildi.
- Pelete zarar vermeden mikropipet ile süpernatant alınarak atıldı.

3.2.3 QIAmp DNA Mini Kiti Kullanarak Amniyon Sıvısından DNA İzolasyonu

- Peletin üstüne 200 µl lik Buffer AL eklenip ependorf tüpü 15 saniye vortekslendi.
- Sonrasında tüpe 20 µl QIAGEN proteinaz K konarak kısa süreli pipetaj yapıldı.
- 56°C de 60 dakika inkübe edildi.
- 1.5 ml lik ependorf tüpünün kapağında oluşan damlacıkların düşmesi için kısa süreli santrifüj yapıldı.
- %100 lük 200 µl etanol eklenip, 15 saniye vortekslendikten sonra kısa süreli santrifüj yapıldı.
- Karışım dikkatli bir şekilde ependorf tüpünden alınıp QIAamp spin kolonuna (spin kolonlar 2 ml lik toplama tüplerine yerleştirilmiştir) aktarıldı ve 1 dakika 8000 rpm de santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu 2 ml lik temiz bir toplama tüpüne aktarıldı ve filtratı içeren toplama tüpü atıldı.
- QIAamp spin kolonuna 500 µl AW1 solüsyonu eklenip 8000 rpm de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtratlı tüp atıldı, spin kolonu yeni bir toplama tüpünün içerisine yerleştirildi.
- QIAamp spin kolonuna 500 µl AW2 solüsyonu eklendi. 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
- Filtratlı toplama tüpü atıldı. Spin kolonu 1.5 ml lik temiz ependorf tüpüne yerleştirilip, QIAamp spin kolonuna 100 µl Buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip

daha sonra 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. 100 µl lik son miktardan 5 µl alınarak spektrometre ile DNA miktarı tayini yapıldı.

- Geriye kalan 95 µl lik sıvı içindeki DNA yı yoğunlaştırmak için ependorf tüpü 14.000 rpm de 5 dk. santrifüj edilerek kapakları açık şekilde 80 °C de ki etüve alındı. Süpernatant buharlaştırılarak uzaklaştırıldı. Tüp, etüvden alınarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Peletin üzerine 10 µl distile su ilave edildi. Tüp 30 sn. vortekslendi, çok kısa süreli santrifüj edildi. Tüp içinden 5 µl sıvı mikropipet ile alınarak sıvıda daha yoğun hale gelen örnek DNA MLPA yöntemi ile analiz edildi.

3.2.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

3.2.4.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA P095 Probe Miks İle Hibridizasyonu

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan 5 µl (45-150 ng DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler 25 °C ye soğutuldu.
- 25 °C deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (P095) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklendi.
- Daha sonra 95 °C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

3.2.4.2. Ligasyon Reaksiyonu

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Örnekler 54 °C ye geldikten sonra strip tüplerden mineral yağ dikkatli şekilde pipet ile alındı.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 miks ilave edildi.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

3.2.4.3. PCR

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
 - 4 µl 10XSALSA PCR Buffer
 - 26 µl distile su
 - 10 µl Polimeraz miks,konularak PCR başlatıldı.

-PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn	95 °C	} 35 döngü
Annealing	30 sn	60 °C	
Ekstansiyon	60 sn	72 °C	
Final Ekstansiyon	20 dk	72 °C	

3.2.4.4. ABI 310 Cihazına Yükleme

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 2 µl alınarak ABI 310 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra üzerlerine:
 - 0.5 µl internal size standart (Rox 500)
 - 12 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildi.
 - Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.
 - Devamında örnekler buz üzerine alındı.
 - ABI 310 cihazında; 15 kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV de 25 dakika yürütme zamanı, filtre C şartları sağlandı.
 - Daha sonrasında ABI cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
 - Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.

3.2.4.5. Değerlendirme

- Okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları excel dosyası formatında kaydedildi.
- Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları Coffalyser versiyon 1.4 programına aktarıldı. Normal örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi. Coffalyser programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, her bir pik alanının (internal kontrol pikleri) o çizgideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesiyle birbirlerine göre oranları tayin edildi. Bu oranlar, pik alanları normal karyotipe sahip olduğu bilinen ve test örneklerle aynı testte çalışılmış 3 örneğin amniyotik sıvılardan elde edilen pik alanlarının (eksternal kontrol pikleri) ortalama sonuçları ile kıyaslandı ve doz tayinine gidildi.
- Kontrol olarak kromozomal açıdan normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı. Her testte 3 erkek ve 3 kadın eksternal kontroller test örnekleri

ile birlikte çalışıldı. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken Coffalyser programı otomatik olarak internal kontrol ve ekstrenal kontrol pik değerleri ile aşağıdaki formülü kullanarak her bir prob spesifik bölge için doz tayini yapmaktadır:

$$\text{Doz Oranı} = \frac{\text{Hasta T. P. A. D.}}{\text{Hasta P. A. T. D. (İ.P.A.)} + \frac{1. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{1. \text{ Kontrol P. A. T. D.}} + \frac{2. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{2. \text{ Kontrol P. A. T. D.}} + \frac{3. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{3. \text{ Kontrol P. A. T. D. (E.P.A.)}}}$$

3

T. P. A.D.: Test Piki Alan Değeri
P. A. T.D.: Pik Alanları Toplam Değeri
İ. P. A.: İnternal Pik Alanları
E. P. A.: Eksternal Pik Alanları

-Yöntem gereği olarak, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, ≤ 0.7 değerlerinde bölgede delesyon yani doz eksikliği olduğu, ≥ 1.3 değerlerinde ise amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirlenmektedir. Coffalyser programından alınan sonuçlar çalışmamızın araştırma grubu sonuçları olduğundan karyotipleme ve FISH kontrol sonuçları ile “Medikal Testlerin Gerçek Durumu Yansıtması” formülü ile karşılaştırmak üzere kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. Araştırma Grubu Sonuçları Ve Kontrol Grubu Sonuçları

Çalışmamıza prenatal tanı amacıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı na 2000-2006 yılları arasında başvuran hastalardan alınmış 500 amniyosentez sıvısı dahil edilmiştir.

Ana Bilim Dalı mız tarafından bu amniyon sıvılarına rutin olarak uygulanan karyotipleme ve FISH yöntemi analiz sonuçları “gerçek durum, referans” olarak belirlenmiştir ve bu sonuçlar kontrol grubu sonuçlarını oluşturmaktadırlar. Aynı amniyon sıvılarına uyguladığımız MLPA yöntemi ile elde edilen sonuçlar araştırma grubu sonuçlarını oluşturmuşlardır.

Kontrol grubu doğru sonuçları ile araştırma grubu sonuçları karşılaştırılarak MLPA yönteminin güvenilirliği hesaplanmıştır.

4.1.1. Kontrol Grubu Sonuçları

Kontrol grubu sonuçlarını oluşturan sonuçlar (referans); amniyosentez sıvılarında rutin uygulamamız olan klasik kromozom analizi sonuçları ve AneuVysion Prob Set (Vysis) ile 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarına spesifik olarak yapılan FISH analizi sonuçları arşiv bilgilerinden alınmıştır ve Çizelge 4.1.1. deki gibidir.

Çizelge 4.1.1: Kontrol Grubu (Referans) Sonuçları

Karyotip	FISH Sonuçları (13, 18, 21, X, Y krm. İçin)	Örnek Sayısı
46, XX	Normal, Kadın	240
46, XY	Normal, Erkek	232
47, XY, +21	Trizomi 21, Erkek	11
47, XX, +21	Trizomi 21, Kadın	7
47, XY, +18	Trizomi 18, Erkek	2
47, XX, +18	Trizomi 18, Kadın	2
47, XY, +13	Trizomi 13, Erkek	1
47, XX, +13	Trizomi 13, Kadın	1
47, XXY	XXY	1
45, X	Monozomi X	1
47, XXX	Trizomi X	1
69, XXX	Triploidi, XXX	1

4.1.2. Araştırma Grubu Sonuçları

Çalışmamız, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına 2000-2006 yılları arasında prenatal tanı amacıyla başvuran amniyosentez yapılmış hastaları kapsamaktadır. Bu hastalara ait 500 amniyon sıvısından elde edilen fetal hücelere MLPA Salsa P095 Anöploidi Kiti kullanılarak 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarına ilişkin doz tayini yapılmıştır. Elde ettiğimiz araştırma grubu sonuçları izelge 4.1.2. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.2.: MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Araştırma Grubu Sonuçları

Referans	MLPA Analiz Sonuçları (Kromozom 13., 18., 21., X ve Y için doz tayinleri)	rnek Sayısı
46, XX	Normal, Kadın	233
46, XX	Sonuç Yok	7
46, XY	Normal, Erkek	220
46, XY	Sonuç Yok	12
47, XY, +21	Trizomi 21, Erkek	11
47, XX, +21	Trizomi 21, Kadın	7
47, XY, +18	Trizomi 18, Erkek	2
47, XX, +18	Trizomi 18, Kadın	2
47, XY, +13	Trizomi 13, Erkek	1
47, XX, +13	Sonuç yok.	1
47, XXY	XXY	1
45, X	Monozomi X	1
47, XXX	Trizomi X	1
69, XXX	Normal, Kadın	1

47, XX,+13 karyotipine ait örnekte MLPA yöntemi ile sonuç elde edilememiştir. 69,XXX karyotipine ait örnekte MLPA ile doz tayininde sonuç yanlış negatif olarak “Normal, Kadın” olarak bulunmuştur. Karyotipi normal 12 erkek ve 7 kadın örnekte MLPA ile sonuç elde edilememiştir. Sonuç elde edemediğimiz 20 amniyotik sıvı örneğinde, yöntem başarısızlığı ile bu örneklerin gebelik haftaları arasında korelasyon saptanmamıştır.

4.2. Araştırma Grubu Sonuçlarının Detaylı Gösterimi

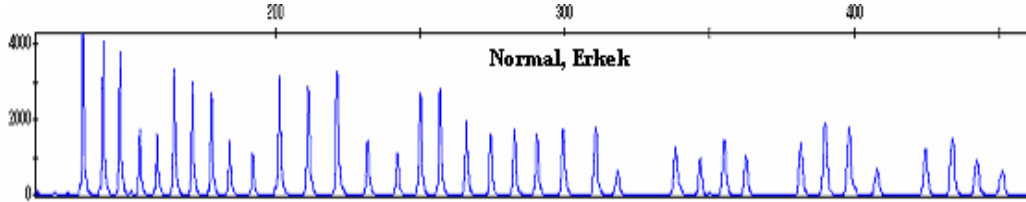
Çalışmamız, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına 2000-2006 yılları arasında prenatal tanı amacıyla başvuran amniyosentez yapılmış hastaları kapsamaktadır. Bu hastalara ait 500 amniyon sıvısından elde edilen fetal hücrelere MLPA Salsa P095 Anöploidi Kiti kullanılarak 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarına ilişkin doz tayini yapılmıştır.

Çalışmamızda 20 örnekte kaliteli pikler elde edilememiştir (Şekil 4.2.14). Bu sonuç alınamayan örnekler içerisindeki 1 hastanın karyotipi sitogenetik analizinde 47,XX,+13 olarak bulunmuştur. Toplam olarak hastaların, MLPA yöntemiyle %96 sından sonuç alınabilmiştir.

Çalışmamızda örnekler, kromozomal açıdan sağlıklı olduğunu bildiğimiz vakalardan en az 3 kadın ve 3 erkek, eksternal kontrol olarak kullanılmak üzere her testte örneklerle birlikte çalışılmışlardır.

Kullanılan Eksternal Kontrollere Örnekler:

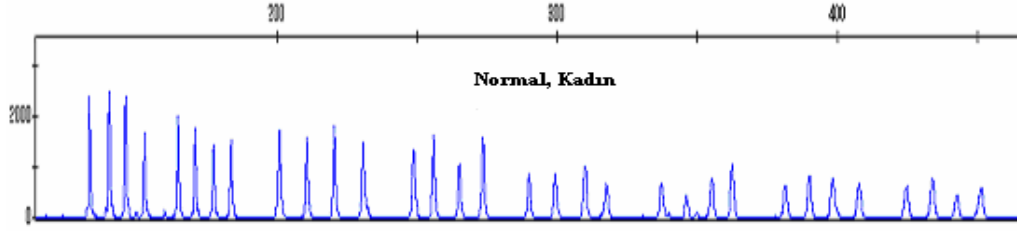
Şekil 4.2.1.: Eksternal Normal Erkek Kontrollerin Pik Görüntülerine Örnek



Çizelge 4.2.1.: Eksternal Normal Erkek Kontrollerin Pik Alanlarına Örnek

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,19	35179	Krom.X	274,07	18393
Krom.18	140,28	33689	Krom.Y	282,36	20435
Krom.13	146,24	30463	Krom.21	290,25	19893
Krom.X	152,98	14319	Krom.18	299,25	22663
Krom.Y	158,88	15021	Krom.13	310,36	22250
Krom.21	164,82	29182	Krom.X	317,99	9158
Krom.18	171,04	26423	Krom.21	337,96	18665
Krom.13	177,68	24773	Krom.18	346,4	12575
Krom.X	184,01	13379	Krom.13	355	20273
Krom.Y	191,95	10653	Krom.X	362,43	14687
Krom.21	201,31	31786	Krom.21	381,47	19668
Krom.18	211,22	29555	Krom.18	389,85	27515
Krom.13	221,12	33096	Krom.13	398,15	25706
Krom.X	231,61	15663	Krom.X	407,86	9864
Krom.Y	241,87	11965	Krom.21	424,52	17964
Krom.21	249,76	29776	Krom.18	433,83	22097
Krom.18	256,53	31467	Krom.13	442,33	14112
Krom.13	265,71	23014	Krom.X	451,09	11213

Şekil 4.2.2.: Eksternal Normal Kadın Kontrollerin Pik Görüntülerine Örnek



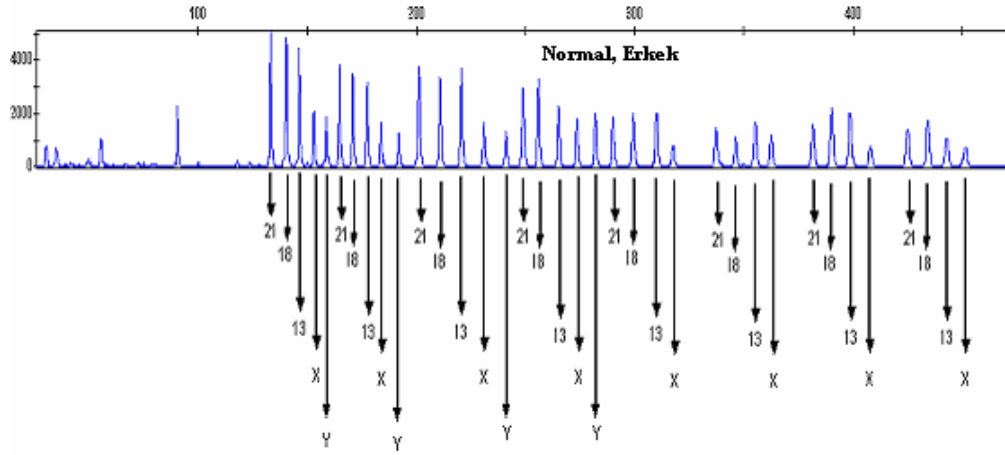
Çizelge 4.2.2.: Eksternal Normal Kadın Kontrollerin Pik Alanlarına Örnek

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,29	16490	Krom.X	273,66	15877
Krom.18	140,36	17067	Krom.Y	283	0
Krom.13	146,1	16126	Krom.21	290,06	9167
Krom.X	152,98	11763	Krom.18	299,28	10221
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,08	11095
Krom.21	164,78	14591	Krom.X	317,58	7897
Krom.18	170,96	13106	Krom.21	337,47	7500
Krom.13	177,49	11101	Krom.18	346,31	4983
Krom.X	183,78	12279	Krom.13	355,26	9553
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,6	12401
Krom.21	201,16	15212	Krom.21	381,61	8220
Krom.18	210,8	13036	Krom.18	390,07	10198
Krom.13	220,59	16002	Krom.13	398,38	10504
Krom.X	230,93	14981	Krom.X	407,82	8802
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,76	8151
Krom.21	248,96	14264	Krom.18	434,04	9728
Krom.18	255,98	16100	Krom.13	442,7	5543
Krom.13	265,28	10681	Krom.X	451,5	8472

Normal, Erkek Örnekler:

Değerlendirilen hastalar içerisinde 220 olguda MLPA yöntemi ile Normal, Erkek sonucu elde edilmiştir. Bu olgulara ait pik dizilimlerinin bir örneği Şekil 4.2.3. de verilmiştir.

Şekil 4.2.3.: Normal, Erkek Pik Görüntülerine Örnek



Elde edilen bu piklerin bp uzunlukları ve pik alanları Gene Mapper programından excel dosyasına kaydedildi ve spesifik olmayan pik alanları silindi. Bu değerler Çizelge 4.2.3 de verilmiştir. Bu pik alanları daha sonra yine excel tabanlı çalışan Coffalyser v1.4b programında değerlendirmeye alındı. Bu program kullanılarak eksternal kontrol pikleri ile hasta pikleri karşılaştırılarak bir ortalama değer elde edildi. Prosedür gereği olarak, her pik alanı için ortalama değer ≤ 0.7 ise delesyon yönünde, ≥ 1.3 ise amplifikasyon yönünde değerlendirildi.

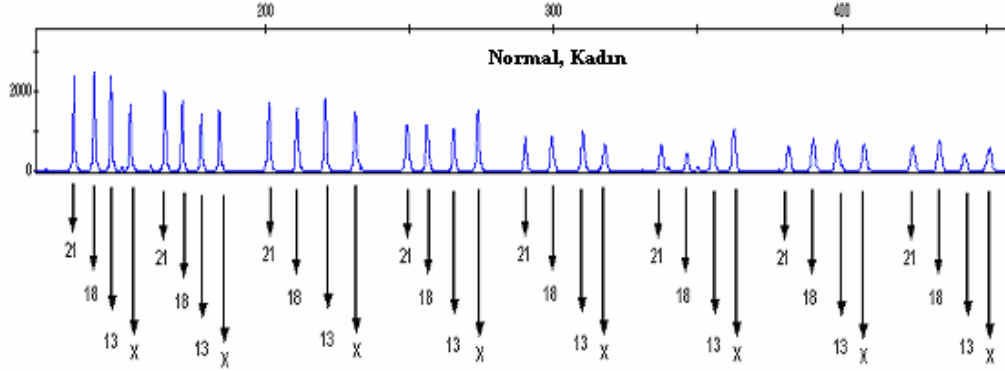
Çizelge 4.2.3.: Normal Erkek Pik Alanlarına Örnek Değerler

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom. 21	133,29	10664	Krom. X	274,23	3965
Krom. 18	140,35	10401	Krom. Y	282,44	5990
Krom. 13	146,23	8499	Krom. 21	290,18	5845
Krom. X	152,94	3980	Krom. 18	299,18	7498
Krom. Y	159	5446	Krom. 13	310,33	6431
Krom. 21	164,9	8476	Krom. X	318,11	2498
Krom. 18	171,24	8364	Krom. 21	338,26	4719
Krom. 13	177,78	7011	Krom. 18	346,79	3975
Krom. X	183,99	2136	Krom. 13	354,94	5970
Krom. Y	191,95	3363	Krom. X	362,41	4234
Krom. 21	201,29	8434	Krom. 21	381,12	5045
Krom. 18	211,21	6858	Krom. 18	389,65	6157
Krom. 13	221,35	9873	Krom. 13	397,77	6163
Krom. X	231,83	3658	Krom. X	407,32	2853
Krom. Y	242,19	2904	Krom. 21	424,4	5119
Krom. 21	250,1	8917	Krom. 18	433,72	5314
Krom. 18	256,76	9905	Krom. 13	442,13	4323
Krom. 13	265,84	6645	Krom. X	450,23	4722

Normal Kadın Örnekler:

Çalışma grubu içerisinde 234 olguda 46,XX karyotipi ile uyumlu pikler elde edilmiştir. Bu sonuçlardan bir tanesi 69,XXX öploidi vakasına ait yanlış negatif Normal, Kadın sonucunu içermektedir. Normal Kadın pik görüntülerine örnek Şekil 4.2.4. de verilmiştir.

Şekil 4.2.4.: Normal, Kadın Pik Görüntülerine Örnek



Bu hastalarda elde edilen pik alanlarından bir örnek Çizelge 4.2.4. de belirtilmiştir. Bu hastalarda dikkat edilmesi gereken nokta, Y kromozomunun karşılığı olan piklerin olmaması ve bu pikler değerlendirilirken bunların sayısal değerinin sıfır olarak belirtilmesidir.

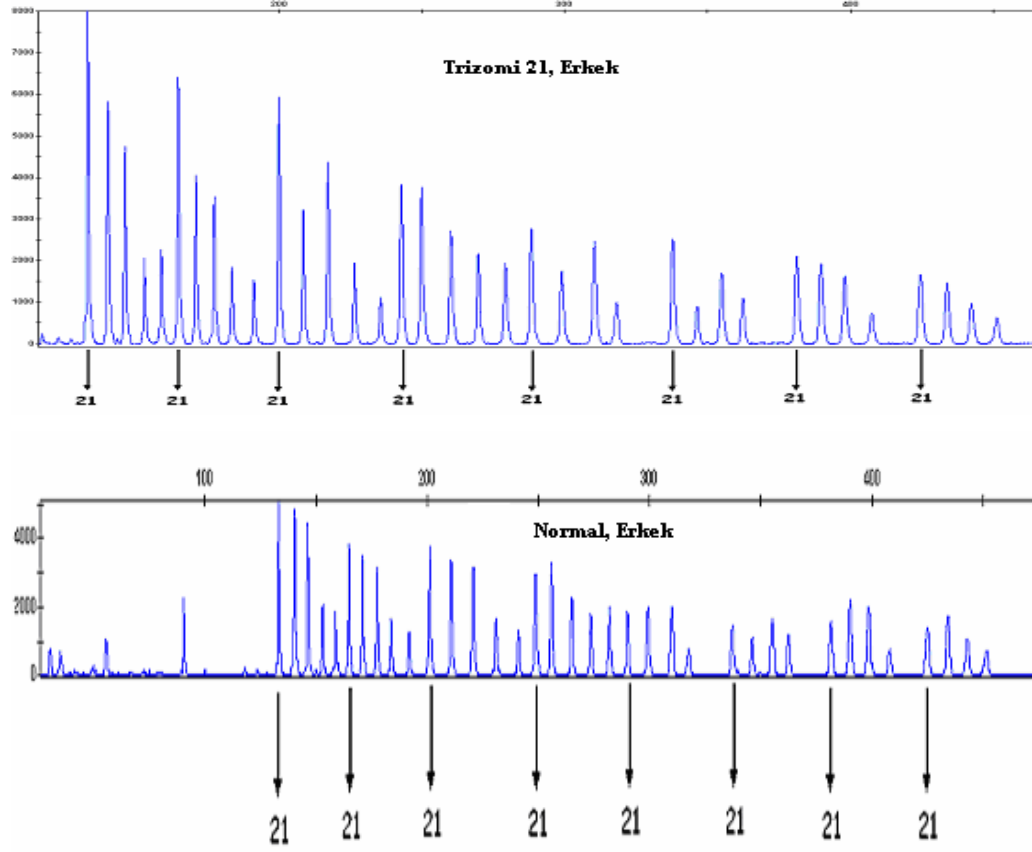
Çizelge 4.2.4.: Normal Kadın Pik Alanlarına Örnek Değerler

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,28	9583	Krom.X	274,24	8071
Krom.18	140,39	8974	Krom.Y	283	0
Krom.13	146,23	7651	Krom.21	290,08	4951
Krom.X	153,04	4625	Krom.18	299,35	6324
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,32	4883
Krom.21	164,87	7617	Krom.X	318,14	4678
Krom.18	171,12	6736	Krom.21	337,94	5089
Krom.13	177,68	6620	Krom.18	346,68	4300
Krom.X	184,02	6858	Krom.13	355,13	5611
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,59	7443
Krom.21	201,21	8620	Krom.21	381,68	4125
Krom.18	211,11	5730	Krom.18	389,84	6829
Krom.13	221,12	8437	Krom.13	398,15	8269
Krom.X	231,62	4210	Krom.X	407,83	5313
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,66	5191
Krom.21	249,88	8708	Krom.18	434,07	5496
Krom.18	256,58	7587	Krom.13	442,52	4647
Krom.13	265,72	5382	Krom.X	451,34	5290

Trizomi 21, Erkek Örnekler:

Yine çalışma grubunda değerlendirilen hastalardan 11 inde 47,XY,+21 ile uyumlu pik alan değerleri saptanmıştır. Bu pikler Gene Mapper programında değerlendirilirken 21. kromozoma karşılık gelen piklerin komşu piklere göre görünür şekilde uzun olduğu ve eksternal normal kontrollerde 21. kromozoma ait piklerin komşu pikler ile orantılı olduğu yine görünür şekildedir. Bu karşılaştırma görüntüsü Şekil 4.2.5. de verilmiştir. Ama kesin verileri elde etmek için piklerin alanları Gene Mapper programından excel dosyasına aktarılarak, Cofalyser programında değerlendirilmiştir. Bu programa göre 21. kromozomun karşılığı olan piklerin ortalama değerlerinde, kontrol hastalarına göre 1.3 ve üzerinde artış görülmesi beklenmektedir. Bu analiz sonuçları toplu olarak Çizelge 4.2.5.B. de verilmiştir.

Şekil 4.2.5.: Trizomi 21, Erkek ve Normal, Erkek Örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.5.A.: Trizomi 21, Erkek Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,23	70768	Krom.X	269,88	22935
Krom.18	140,32	42020	Krom.Y	279,27	21936
Krom.13	146,24	34242	Krom.21	288,39	40745
Krom.X	153,09	16551	Krom.18	299,08	20792
Krom.Y	158,84	19273	Krom.13	310,47	29447
Krom.21	164,89	65428	Krom.X	318,23	12872
Krom.18	171,05	33326	Krom.21	337,94	41296
Krom.13	177,48	29461	Krom.18	346,46	14868
Krom.X	183,64	16877	Krom.13	355,07	23648
Krom.Y	191,34	13905	Krom.X	362,43	13440
Krom.21	200,11	63775	Krom.21	381,32	47561
Krom.18	208,51	29759	Krom.18	389,87	25804
Krom.13	217,26	42142	Krom.13	398,08	24537
Krom.X	226,57	19413	Krom.X	407,58	10259
Krom.Y	235,7	11927	Krom.21	424,6	33798
Krom.21	242,92	60985	Krom.18	433,8	19966
Krom.18	250	40029	Krom.13	442,4	13680
Krom.13	260,25	28768	Krom.X	451,24	13924

Çizelge 4.2.5.B.: Trizomi 21, Erkek Örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204				s-803	s-811	s-1128	s-1415	s-1868	s-1591	s-1770	s-1864	s-1499	s-1948	s-1954
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,570	1,420	1,380	1,800	1,340	1,400	1,350	1,340	1,340	1,380	1,40
MADH4	18q21.1	142	18	1,020	0,980	0,800	0,980	1,230	1,100	1,300	1,100	1,000	0,980	1,200
ABCC4	13q32	148	13	0,900	0,990	0,900	0,890	0,850	0,950	0,850	0,780	0,850	0,890	0,950
AR	Xq11.2	154	X	0,900	0,920	0,940	0,920	1,010	1,000	1,210	1,010	1,010	0,920	1,210
SRY	Yp11.3	160	Y	1,030	1,200	1,020	1,020	1,110	1,230	1,150	1,000	1,110	1,020	1,24
NCAM2	21q21.1	166	21	1,74	1,47	1,37	1,70	1,92	1,52	1,40	1,42	1,92	1,37	1,82
PMAIP1	18q21	172	18	0,97	0,99	0,89	0,99	0,90	0,74	0,90	1,00	0,90	0,99	0,90
CCNA1	13q12.3	178	13	0,940	0,940	0,840	0,940	0,870	0,870	0,870	1,200	0,870	0,940	0,870
FACL4	Xq23	184	X	0,960	0,990	0,900	0,990	1,070	1,210	1,000	1,070	1,070	0,990	1,270
SRY	Yp11.3	193	Y	1,050	1,050	1,150	1,050	1,270	1,170	1,300	1,100	1,270	1,050	1,240
USP25	21q11.2	202	21	1,590	1,460	1,360	1,600	1,600	1,360	1,460	1,850	1,600	1,360	1,480
SS18	18q11.2	211	18	0,800	0,790	0,900	0,790	0,990	1,190	0,790	0,790	0,990	0,890	0,960
RB1	13q14.3	220	13	0,970	1,000	1,100	1,000	1,200	1,000	1,200	1,220	1,200	1,100	1,240
ARX	Xp22.1	229	X	0,990	0,960	0,960	0,960	0,730	0,930	0,930	0,730	0,730	0,860	0,930
UTY	Yq11	238	Y	0,76	0,78	0,80	0,78	0,90	0,90	0,85	0,90	0,90	0,70	0,96
STCH	21q11	247	21	1,600	1,290	1,400	1,830	1,320	1,580	1,390	1,420	1,370	1,090	1,370
NFATC1	18q23	256	18	1,000	1,010	1,100	1,010	1,060	1,000	1,260	0,960	1,260	1,010	1,260
DACH	13q21.3	265	13	1,01	1,00	1,20	1,00	1,00	1,21	1,00	1,26	1,00	1,30	1,10
TM4SF2	Xp11.4	274	X	0,970	0,990	0,990	0,990	1,210	1,210	1,100	1,210	1,200	0,790	1,10
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,83	0,85	0,75	0,850	0,92	0,86	0,90	0,92	0,82	0,850	0,82
SOD1	21q22.1	292	21	1,610	1,320	1,420	1,420	1,350	1,500	1,500	1,200	1,560	1,520	1,560
TYMS	18p11.3	301	18	0,720	0,820	0,720	0,720	0,920	1,200	0,820	0,78	0,820	0,820	0,820
P85SPR	13q34	310	13	1,040	1,140	1,240	1,040	0,870	0,700	0,950	0,92	0,870	1,140	0,760
L1CAM	Xq28	319	X	1,090	1,140	1,140	1,140	1,010	1,010	1,210	1,20	1,210	1,140	1,210
APP	21q21.3	337	21	1,700	1,430	1,330	1,530	1,430	1,350	1,530	1,42	1,340	1,300	1,340
SERPINB2	18q21.3	346	18	0,94	0,89	0,81	0,79	0,76	0,96	0,83	0,92	0,76	0,90	0,78
BRCA2	13q12.3	355	13	0,91	0,90	0,79	0,90	0,95	0,75	0,90	0,84	0,95	0,90	0,95
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	0,720	0,720	0,700	0,720	0,820	0,960	0,760	1,02	0,820	0,720	0,720
TFF1	21q22.3	382	21	1,870	1,320	1,520	1,420	1,510	1,390	1,450	1,38	1,800	1,420	1,800
SS18	18q11.2	391	18	0,730	0,730	0,730	0,730	0,730	0,930	0,830	0,92	0,730	0,730	0,730
DLEU1	13q14.3	400	13	0,74	0,86	0,76	0,76	0,82	0,82	0,96	0,94	0,92	0,78	0,92
PDCD8	Xq25	409	X	0,810	0,840	0,800	0,840	0,970	0,710	0,970	0,96	0,970	0,800	0,970
TIAM1	21q22.1	427	21	1,450	1,500	1,450	1,450	1,330	1,500	1,530	1,42	1,380	1,420	1,380
MC2R	18p11.2	436	18	0,73	0,71	0,91	0,71	0,79	0,90	0,90	0,92	0,79	0,81	0,79
ING1	13q34	445	13	0,750	0,760	0,960	0,760	0,830	0,860	0,730	1,10	0,830	0,760	0,930
DMD	Xp21.2	454	X	0,960	0,730	0,830	0,730	0,730	0,930	0,930	1,00	0,730	0,730	0,880

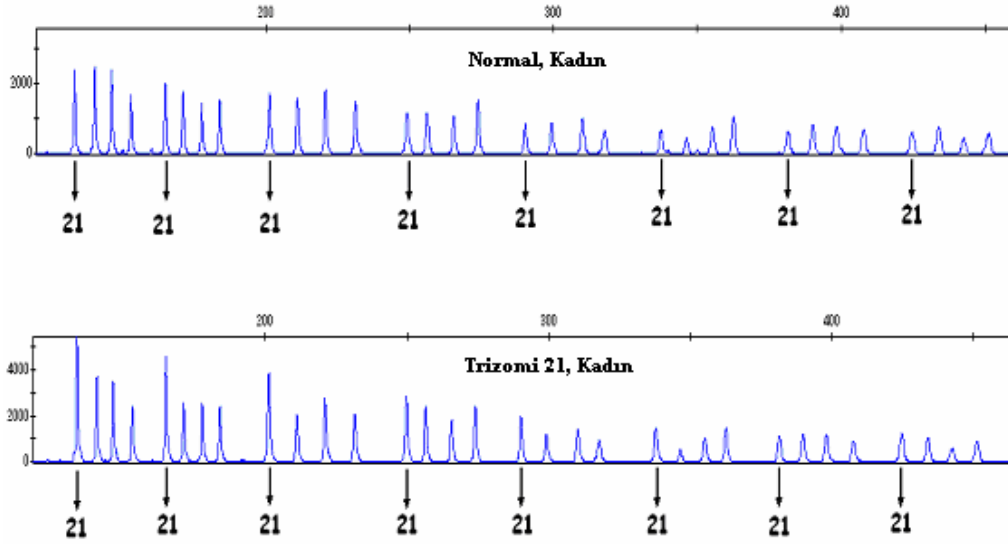
Coffalyser programının bu tablosunda, renkli alanda her sütun bir hastayı göstermektedir. İlk sütunda yer alan hasta daha önce pik görüntüsü ve pik alan değerleri verilen hastadır. Diğer sütunlarda yer alan hastalarda trizomi 21 ile uyumlu diğer erkek hastalardır. Bu değerlendirmede dikkat edilmesi gereken nokta mavi olarak görünen alanlarda (>0.7 - <1.3) kontrollerle karşılaştırıldığında herhangi bir delesyon veya amplifikasyon olmayan prob bölgeleri olup, kırmızı görünen alanlar (≥ 1.3) ise amplifikasyonla uyumlu prob bölgelerini göstermektedir. Şekil 4.2.5 de verilen sonuçları incelediğimizde kromozom 21 üzerindeki prob bölgelerinin amplifikasyonu görülmektedir. Kullandığımız anöploid kitinde 21. kromozom üzerinde 8 ayrı prob

bölgesi incelenmektedir. Ayrıca erkek hastalar için erkek kontroller kullandığımız için, X ve Y kromozomuna ait herhangi bir delesyon veya amplifikasyon saptanmamıştır.

Trizomi 21, Kadın Örnekler:

Yine çalışma grubundaki hastalarda MLPA yöntemi ile elde edilen analiz sonuçları içerisinde 7 olguda Trizomi 21, Kadın sonuçları ile uyumlu pikler elde edilmiştir. Bu sonuçlar da kontrol hastaları ile Cofalyser programında karşılaştırılmıştır. Elde edilen pik görüntüleri ve kontrol hastaları ile karşılaştırılması Şekil 4.2.6. da verilmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken 21. kromozoma karşılık gelen piklerin diğer kromozomların pikleri (komşu pikler) ile orantısındaki gözle görünür artıştır. Kontrol hastalarında bu uzunluk sabit iken, örneğin 21. kromozom piki ile 18. kromozom pikinin birbiri ile uzunlukları yaklaşık iken, trizomi 21 hastasında uzunluk 21. kromozom lehine artmış şekildedir. Bu fark Şekil 4.2.6. da net bir şekilde değerlendirilebilir. Ama yine kesin tanı için mutlaka sayısal değerlerin, Cofalyser programı kullanılarak karşılaştırılması gerekmektedir.

Şekil 4.2.6.: Trizomi 21, Kadın ve Normal Kadın Örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.6.A.:Trizomi 21, Kadın Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,46	44356	Krom.X	274,13	25338
Krom.18	140,51	27094	Krom.Y	283	0
Krom.13	146,23	25579	Krom.21	290,21	30268
Krom.X	153,04	18971	Krom.18	299,24	14505
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,34	16251
Krom.21	164,89	40560	Krom.X	317,82	12209
Krom.18	171,08	21314	Krom.21	337,8	25774
Krom.13	177,69	21632	Krom.18	346,5	8572
Krom.X	183,97	21543	Krom.13	355,18	13633
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,59	17875
Krom.21	201,22	37756	Krom.21	381,43	23421
Krom.18	211,06	18902	Krom.18	389,84	18452
Krom.13	221,03	26444	Krom.13	398,03	17544
Krom.X	231,48	20448	Krom.X	407,54	12210
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,67	20997
Krom.21	249,76	32773	Krom.18	433,91	13780
Krom.18	256,53	25094	Krom.13	442,58	11041
Krom.13	265,75	18944	Krom.X	451,21	15070

Verilen bu pik alan değerleri Coffalyser programına aktarıldıktan sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.6.B de gösterilmiştir. Bu tabloda 47,XX,+21 ile uyumlu 7 hastanın sonucu yer almaktadır. İlk sütunda yer alan hasta, yukarıda pik görüntüleri ve pik alan değerleri verilen hastadır. Bu tabloda dikkat edilmesi gereken nokta, 21. kromozom üzerinde yer alan prob bölgelerinde görülen amplifikasyonlara ilaveten, X kromozomu üzerinde yer alan prob bölgelerinde de amplifikasyon görülmesi, ayrıca Y kromozomu üzerinde yer alan prob bölgelerinde de delesyon görülmesidir. (Delesyonlar Coffalyser programı tarafından yeşil renk ile gösterilmektedir: ≤ 0.7) Bu değişikliklerin nedeni sonuçların erkek kontroller üzerinden değerlendirilmesidir. Bu nedenle hastalar dişi karyotipi ile uyumlu olduğu için, X kromozomunda amplifikasyon ve Y kromozomunda delesyon görülecektir.

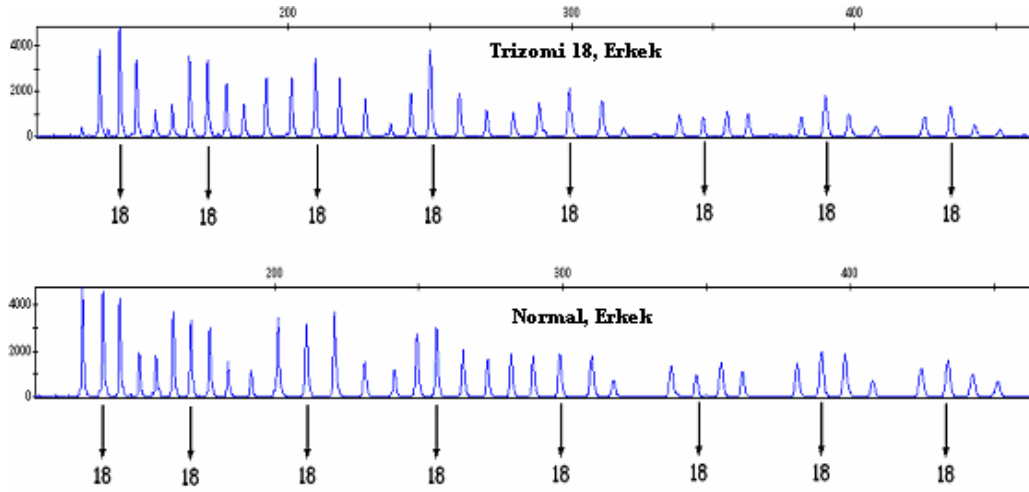
Çizelge 4.2.6.B.: Trizomi 21, Kadın örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204				s-1014	s-1316	s-1358	s-1367	s-1527	s-1670	s-1888
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,500	1,400	1,420	1,560	1,500	1,400	1,360
MADH4	18q21.1	142	18	1,000	1,010	1,200	1,100	1,000	1,240	1,100
ABCC4	13q32	148	13	1,030	0,990	1,000	1,050	1,050	0,990	1,190
AR	Xq11.2	154	X	1,580	1,930	1,670	1,700	1,670	1,430	1,340
SRY	Yp11.3	160	Y	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
NCAM2	21q21.1	166	21	1,64	1,33	1,59	1,54	1,39	1,46	1,32
PMAIP1	18q21	172	18	0,94	0,86	1,00	1,20	1,20	0,86	0,96
CCNA1	13q12.3	178	13	1,050	1,060	1,090	1,060	1,000	1,210	1,000
FACL4	Xq23	184	X	1,870	1,760	2,010	1,610	1,410	1,600	1,620
SRY	Yp11.3	193	Y	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
USP25	21q11.2	202	21	1,430	1,310	1,390	1,340	1,480	1,340	1,310
SS18	18q11.2	211	18	0,780	0,820	0,800	0,880	0,760	0,860	0,720
RB1	13q14.3	220	13	0,930	0,930	0,990	0,780	0,990	0,860	1,200
ARX	Xp22.1	229	X	1,590	2,060	1,600	1,460	1,400	1,660	1,600
UTY	Yq11	238	Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
STCH	21q11	247	21	1,310	1,360	1,420	1,480	1,210	1,340	1,320
NFATC1	18q23	256	18	0,960	1,000	1,180	1,000	1,000	1,000	1,000
DACH	13q21.3	265	13	1,01	1,00	1,05	1,05	1,05	1,24	1,00
TM4SF2	Xp11.4	274	X	1,640	1,790	1,740	1,400	1,740	1,420	1,790
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOD1	21q22.1	292	21	1,830	1,340	1,400	1,340	1,440	1,340	1,460
TYMS	18p11.3	301	18	0,760	0,910	0,790	0,900	0,790	0,710	0,800
P85SPR	13q34	310	13	0,880	0,940	0,910	0,810	0,800	0,940	0,840
L1CAM	Xq28	319	X	1,580	1,760	1,710	1,500	1,610	1,760	1,400
APP	21q21.3	337	21	1,620	1,340	1,600	1,260	1,360	1,400	1,380
SERPINB2	18q21.3	346	18	0,83	0,73	0,76	0,86	0,96	0,73	0,74
BRCA2	13q12.3	355	13	0,80	0,86	0,82	0,82	0,82	0,86	0,98
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	1,470	1,570	1,510	1,360	1,510	1,570	1,700
TFF1	21q22.3	382	21	1,410	1,480	1,450	1,380	1,400	1,480	1,380
SS18	18q11.2	391	18	0,800	0,770	0,700	0,700	1,000	0,770	0,800
DLEU1	13q14.3	400	13	0,81	0,72	0,75	0,85	0,75	0,72	0,76
PDCD8	Xq25	409	X	1,470	1,740	1,580	1,480	1,580	1,440	1,400
TIAM1	21q22.1	427	21	1,380	1,390	1,190	1,450	1,520	1,500	1,420
MC2R	18p11.2	436	18	0,73	0,81	0,78	0,80	0,80	0,80	0,81
ING1	13q34	445	13	0,920	0,830	0,700	0,740	0,700	0,830	0,940
DMD	Xp21.2	454	X	1,590	1,480	1,510	1,410	1,460	1,380	1,540

Trizomi 18, Erkek Örnekler:

Değerlendirilen hasta grubu içerisinde 2 hastada Trizomi 18, Erkek sonuçları ile uyumlu pik görüntüleri elde edildi. Yine bu pik alanları Gene Mapper programı kullanılarak Coffalyser programında değerlendirildi. Bu değerlendirme sonuçları Çizelge 4.2.7.B de verilmiştir. Kontrol hastalarının pik alanları ile karşılaştırıldığında Trizomi 18 ile uyumlu olduğu doğrulandı. Bu grup içerisinde 1 hastadan elde edilen pik görüntüleri ve kontrol hastası ile karşılaştırılması Şekil 4.2.7. de verilmiştir.

Şekil 4.2.7.: Trizomi 18, Erkek ve Normal Erkek Örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.7.A.: Trizomi 18, Erkek Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,28	28898	Krom.X	269,98	12464
Krom.18	140,39	38708	Krom.Y	279,46	14396
Krom.13	146,23	25527	Krom.21	288,58	19209
Krom.X	153,01	10520	Krom.18	299,23	28992
Krom.Y	158,86	13506	Krom.13	310,7	19314
Krom.21	164,89	31621	Krom.X	318,58	7745
Krom.18	171,39	34649	Krom.21	338,14	13286
Krom.13	178,04	19998	Krom.18	346,44	14714
Krom.X	184,3	14152	Krom.13	354,87	15582
Krom.Y	192,2	8975	Krom.X	362,28	13161
Krom.21	201,12	24216	Krom.21	381,22	13809
Krom.18	209,5	35679	Krom.18	389,77	31685
Krom.13	218,07	26645	Krom.13	398,01	16823
Krom.X	227,15	17490	Krom.X	407,46	7208
Krom.Y	236,14	9019	Krom.21	424,8	12250
Krom.21	243,2	21246	Krom.18	433,95	28144
Krom.18	250	38717	Krom.13	442,53	10942
Krom.13	260,4	24390	Krom.X	451,45	8839

Çizelge 4.2.7.B.: Trizomi 18, Erkek Örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204				s-1041	s-1640
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	0,940	0,980
MADH4	18q21.1	142	18	1,370	1,600
ABCC4	13q32	148	13	0,990	1,000
AR	Xq11.2	154	X	0,840	0,890
SRY	Yp11.3	160	Y	1,060	1,080
NCAM2	21q21.1	166	21	1,23	1,28
PMAIP1	18q21	172	18	1,47	1,38
CCNA1	13q12.3	178	13	0,930	0,970
FACL4	Xq23	184	X	1,180	1,260
SRY	Yp11.3	193	Y	0,990	0,750
USP25	21q11.2	202	21	0,880	0,930
SS18	18q11.2	211	18	1,410	1,360
RB1	13q14.3	220	13	0,890	0,960
ARX	Xp22.1	229	X	1,300	1,100
UTY	Yq11	238	Y	0,84	0,90
STCH	21q11	247	21	0,810	0,850
NFATC1	18q23	256	18	1,410	1,480
DACH	13q21.3	265	13	1,25	1,08
TM4SF2	Xp11.4	274	X	0,770	0,820
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,80	0,73
SOD1	21q22.1	292	21	1,110	1,150
TYMS	18p11.3	301	18	1,460	1,360
P85SPR	13q34	310	13	1,000	1,030
L1CAM	Xq28	319	X	0,960	0,740
APP	21q21.3	337	21	0,800	0,850
SERPINB2	18q21.3	346	18	1,36	1,40
BRCA2	13q12.3	355	13	0,87	0,90
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	1,040	1,060
TFF1	21q22.3	382	21	0,790	0,700
SS18	18q11.2	391	18	1,310	1,600
DLEU1	13q14.3	400	13	0,74	0,78
PDCD8	Xq25	409	X	0,830	0,890
TIAM1	21q22.1	427	21	0,770	0,820
MC2R	18p11.2	436	18	1,43	1,38
ING1	13q34	445	13	0,880	0,800
DMD	Xp21.2	454	X	0,890	0,960

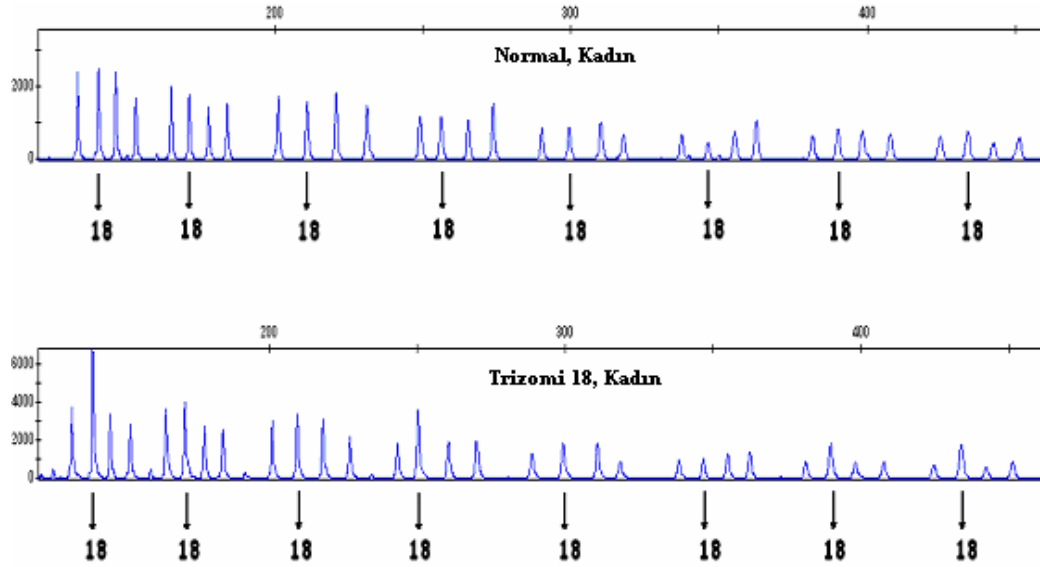
Bu tabloda 18. kromozom üzerinde yer alan prob bölgelerinin amplifikasyonları görülmektedir. Değerlendirmede erkek kontrol kullanıldığı için ve cinsiyet

kromozomları üzerindeki problemlerde herhangi bir delesyon veya amplifikasyon olmadığı için hastaların erkek karyotipi ile uyumlu olduğunu anlıyoruz.

Trizomi 18, Kadın Örnekler:

Yine çalışılan hasta grubu içerisinde 2 hastada Trizomi 18, Kadın sonucu ile uyumlu pik alanları elde edilmiştir. Elde edilen pik görüntüleri ve kontrol hastasının pikleri ile karşılaştırılması Şekil 4.2.8. de verilmiştir. Yine bu hastalardan birinin ölçülen pik alanları da Çizelge 4.2.8.A da verilmiştir. Bu hastaların pik alanlarının Coffalyser programında elde edilen sonuçları Çizelge 4.2.8.B de verilmiştir.

Şekil 4.2.8.: Trizomi 18, Kadın ve Normal, Kadın örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.8.A.: Trizomi 18, Kadın Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,32	34070	Krom.X	270,07	27738
Krom.18	140,36	56669	Krom.Y	283	0
Krom.13	146,19	26986	Krom.21	288,69	15989
Krom.X	152,97	23852	Krom.18	299,26	30302
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,86	21632
Krom.21	165,1	35713	Krom.X	318,56	12106
Krom.18	171,53	40600	Krom.21	338,42	18692
Krom.13	178,11	25436	Krom.18	346,69	17320
Krom.X	184,39	25877	Krom.13	354,9	17572
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,27	22384
Krom.21	201,09	29367	Krom.21	381,24	18406
Krom.18	209,5	38500	Krom.18	389,62	32240
Krom.13	218,1	31453	Krom.13	397,95	18758
Krom.X	227,21	23604	Krom.X	407,68	17517
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,54	13888
Krom.21	243,34	20692	Krom.18	433,75	28790
Krom.18	250,23	41626	Krom.13	442,28	11225
Krom.13	260,54	22209	Krom.X	451,06	12323

Çizelge 4.2.8.B.: Trizomi 18, Kadın Örneklerin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

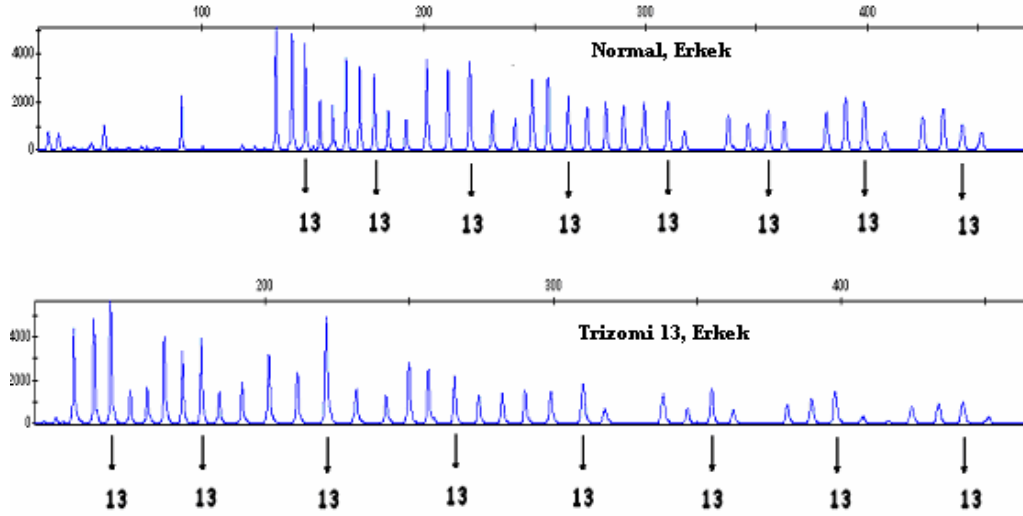
P095 MLPA mix lot 1204				s-1506	s-1631
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,000	0,980
MADH4	18q21.1	142	18	1,670	1,790
ABCC4	13q32	148	13	0,920	0,930
AR	Xq11.2	154	X	1,740	1,690
SRY	Yp11.3	160	Y	0,000	0,000
NCAM2	21q21.1	166	21	1,25	1,23
PMAIP1	18q21	172	18	1,50	1,53
CCNA1	13q12.3	178	13	1,070	1,050
FACL4	Xq23	184	X	2,000	1,920
SRY	Yp11.3	193	Y	0,000	0,000
USP25	21q11.2	202	21	0,980	0,950
SS18	18q11.2	211	18	1,400	1,350
RB1	13q14.3	220	13	0,980	0,940
ARX	Xp22.1	229	X	1,540	1,560
UTY	Yq11	238	Y	0,00	0,00
STCH	21q11	247	21	0,720	0,710
NFATC1	18q23	256	18	1,310	1,350
DACH	13q21.3	265	13	1,02	1,26
TM4SF2	Xp11.4	274	X	1,580	1,530
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,00	0,00
SOD1	21q22.1	292	21	0,830	0,820
TYMS	18p11.3	301	18	1,050	1,360
P85SPR	13q34	310	13	1,000	1,000
L1CAM	Xq28	319	X	1,400	1,340
APP	21q21.3	337	21	0,710	1,000
SERPINB2	18q21.3	346	18	1,32	1,43
BRCA2	13q12.3	355	13	0,88	0,88
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	1,390	1,570
TFF1	21q22.3	382	21	0,710	0,940
SS18	18q11.2	391	18	1,400	1,190
DLEU1	13q14.3	400	13	0,86	0,74
PDCD8	Xq25	409	X	1,400	1,800
TIAM1	21q22.1	427	21	0,720	0,780
MC2R	18p11.2	436	18	1,36	1,31
ING1	13q34	445	13	0,840	0,800
DMD	Xp21.2	454	X	1,180	1,110

Bu çizelgede 18. kromozom problemlerinin amplifikasyonu görülmektedir. Ayrıca X kromozom problemlerindeki amplifikasyonlar ve Y kromozom problemlerindeki delesyonlar bize kullanılan kontrolün erkek olmasından dolayı analiz edilen hastaların cinsiyetlerinin dışı olduğunu göstermektedir.

Trizomi 13, Erkek Örnek:

Çalışma grubunda ki hastalardan 1 tanesinde 47,XY,+13 karyotipi ile uyumlu pikler elde edilmiş, bu pik alanlarının Coffalyser programında analizinde de bu karyotip doğrulanmıştır. Elde ettiğimiz pik dizilimleri ve sağlıklı kontrol hastasının pik dizilimleri Şekil 4.2.9. da verilmiştir. Ayrıca hastadan elde edilen pik alanlarının değerleri de Çizelge 4.2.9.A da verilmiştir.

Şekil 4.2.9.: Trizomi 13, Erkek ve Normal, Erkek Örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.9.A.: Trizomi 13, Erkek Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,32	37132	Krom.X	274,12	15246
Krom.18	140,38	36559	Krom.Y	282,35	16009
Krom.13	146,15	48542	Krom.21	290,19	17895
Krom.X	153,01	12596	Krom.18	299,25	18333
Krom.Y	158,97	14959	Krom.13	310,33	32490
Krom.21	164,83	35392	Krom.X	318,01	9124
Krom.18	171,15	27212	Krom.21	338,2	17611
Krom.13	177,68	40660	Krom.18	346,65	9281
Krom.X	183,98	13788	Krom.13	355,14	30375
Krom.Y	191,88	11661	Krom.X	362,57	12546
Krom.21	201,2	29564	Krom.21	381,35	15471
Krom.18	211,16	22920	Krom.18	389,74	23249
Krom.13	221,11	55315	Krom.13	397,93	36554
Krom.X	231,65	18163	Krom.X	407,5	11170
Krom.Y	241,96	14153	Krom.21	424,66	13711
Krom.21	249,88	30009	Krom.18	433,97	18292
Krom.18	256,59	26179	Krom.13	442,46	25658
Krom.13	265,71	30609	Krom.X	451,19	10484

Çizelge 4.2.9.B.: Trizomi 13, Erkek Örnek Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204 s-1234

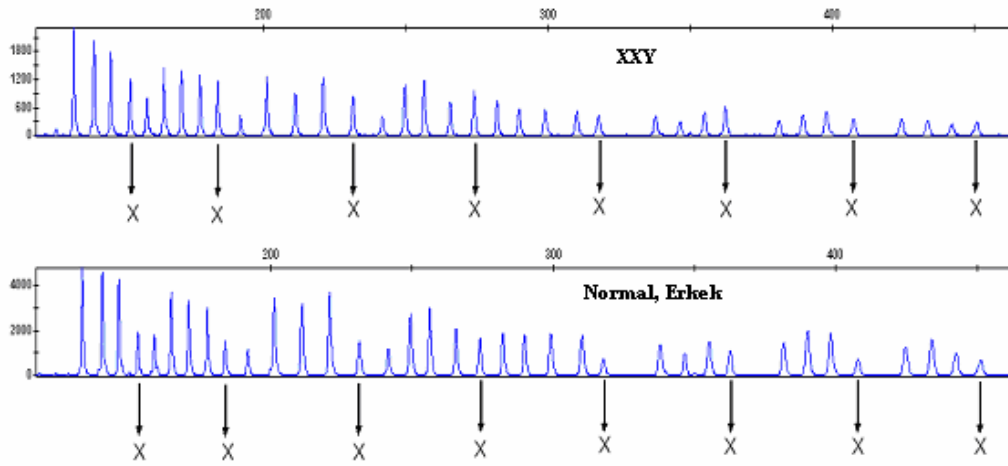
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,040
MADH4	18q21.1	142	18	1,120
ABCC4	13q32	148	13	1,620
AR	Xq11.2	154	X	0,870
SRY	Yp11.3	160	Y	1,010
NCAM2	21q21.1	166	21	1,19
PMAIP1	18q21	172	18	1,00
CCNA1	13q12.3	178	13	1,640
FACL4	Xq23	184	X	0,990
SRY	Yp11.3	193	Y	1,120
USP25	21q11.2	202	21	0,930
SS18	18q11.2	211	18	0,780
RB1	13q14.3	220	13	1,610
ARX	Xp22.1	229	X	1,170
UTY	Yq11	238	Y	1,14
STCH	21q11	247	21	1,000
NFATC1	18q23	256	18	0,830
DACH	13q21.3	265	13	1,36
TM4SF2	Xp11.4	274	X	0,820
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,77
SOD1	21q22.1	292	21	0,900
TYMS	18p11.3	301	18	0,800
P85SPR	13q34	310	13	1,460
L1CAM	Xq28	319	X	0,980
APP	21q21.3	337	21	0,920
SERPINB2	18q21.3	346	18	0,74
BRCA2	13q12.3	355	13	1,48
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	0,860
TFF1	21q22.3	382	21	0,770
SS18	18q11.2	391	18	0,830
DLEU1	13q14.3	400	13	1,40
PDCD8	Xq25	409	X	1,110
TIAM1	21q22.1	427	21	0,750
MC2R	18p11.2	436	18	0,81
ING1	13q34	445	13	1,780
DMD	Xp21.2	454	X	0,920

Bu tabloyu incelediğimiz zaman 13. kromozom bölgesine karşılık gelen prob bölgelerindeki amplifikasyonlar görülmektedir. Ayrıca hastanın cinsiyeti kontrollerle aynı olduğu için X ve Y kromozomundaki prob bölgelerinde herhangi değişim görülmemiştir.

XXY Örneği:

Çalışma grubundaki hastaların birinden elde edilen pikler, bu piklerin sayısal değerlerinin kontrol örneklerinin pik alanları ile karşılaştırılması sonucunda 47, XXY ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu elde edilen pik örnekleri, sağlıklı kontrol örneğinin pik görüntüleri Şekil 4.2.10 da gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen pik alan değerleri de Çizelge 4.2.10.A. da verilmiştir. Verilen bu pik alan değerlerinin Coffalyser programında elde edilen sonuçları da Çizelge 4.2.10.B de verilmiştir.

Şekil 4.2.10.: XXY ve Normal Erkek Örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.10.A.: XXY Örneğinin Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,31	13428	Krom.X	274,12	11807
Krom.18	140,34	12688	Krom.Y	282,1	7157
Krom.13	146,19	9678	Krom.21	290,02	6429
Krom.X	153,12	12705	Krom.18	299,1	6814
Krom.Y	159,06	4860	Krom.13	310,15	5855
Krom.21	164,89	9437	Krom.X	317,83	8164
Krom.18	171,12	10767	Krom.21	337,97	4851
Krom.13	177,67	10023	Krom.18	346,65	3536
Krom.X	183,89	14023	Krom.13	355,14	6115
Krom.Y	191,88	3624	Krom.X	362,47	10462
Krom.21	201,13	11126	Krom.21	381,47	5933
Krom.18	211,14	8055	Krom.18	389,76	7750
Krom.13	221,02	11493	Krom.13	398,19	6709
Krom.X	231,54	11923	Krom.X	407,63	9452
Krom.Y	241,83	4165	Krom.21	424,52	4543
Krom.21	249,75	10603	Krom.18	433,65	6140
Krom.18	256,48	11630	Krom.13	442,33	3234
Krom.13	265,73	7272	Krom.X	450,99	8188

Çizelge 4.2.10.B: XXY Örneğinin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,190
MADH4	18q21.1	142	18	1,230
ABCC4	13q32	148	13	1,020
AR	Xq11.2	154	X	1,770
SRY	Yp11.3	160	Y	1,040
NCAM2	21q21.1	166	21	1,00
PMAIP1	18q21	172	18	1,25
CCNA1	13q12.3	178	13	1,270
FACL4	Xq23	184	X	1,490
SRY	Yp11.3	193	Y	1,100
USP25	21q11.2	202	21	1,110
SS18	18q11.2	211	18	0,870
RB1	13q14.3	220	13	1,050
ARX	Xp22.1	229	X	1,430
UTY	Yq11	238	Y	1,06
STCH	21q11	247	21	1,110
NFATC1	18q23	256	18	1,160
DACH	13q21.3	265	13	1,02
TM4SF2	Xp11.4	274	X	2,000
ZFY	Yp11.3	283	Y	1,08
SOD1	21q22.1	292	21	1,020
TYMS	18p11.3	301	18	0,940
P85SPR	13q34	310	13	0,830
L1CAM	Xq28	319	X	1,760
APP	21q21.3	337	21	0,800
SERPINB2	18q21.3	346	18	0,89
BRCA2	13q12.3	355	13	0,94
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	1,350
TFF1	21q22.3	382	21	0,930
SS18	18q11.2	391	18	0,880
DLEU1	13q14.3	400	13	0,81
PDCD8	Xq25	409	X	1,970
TIAM1	21q22.1	427	21	0,780
MC2R	18p11.2	436	18	0,85
ING1	13q34	445	13	0,710
DMD	Xp21.2	454	X	1,360

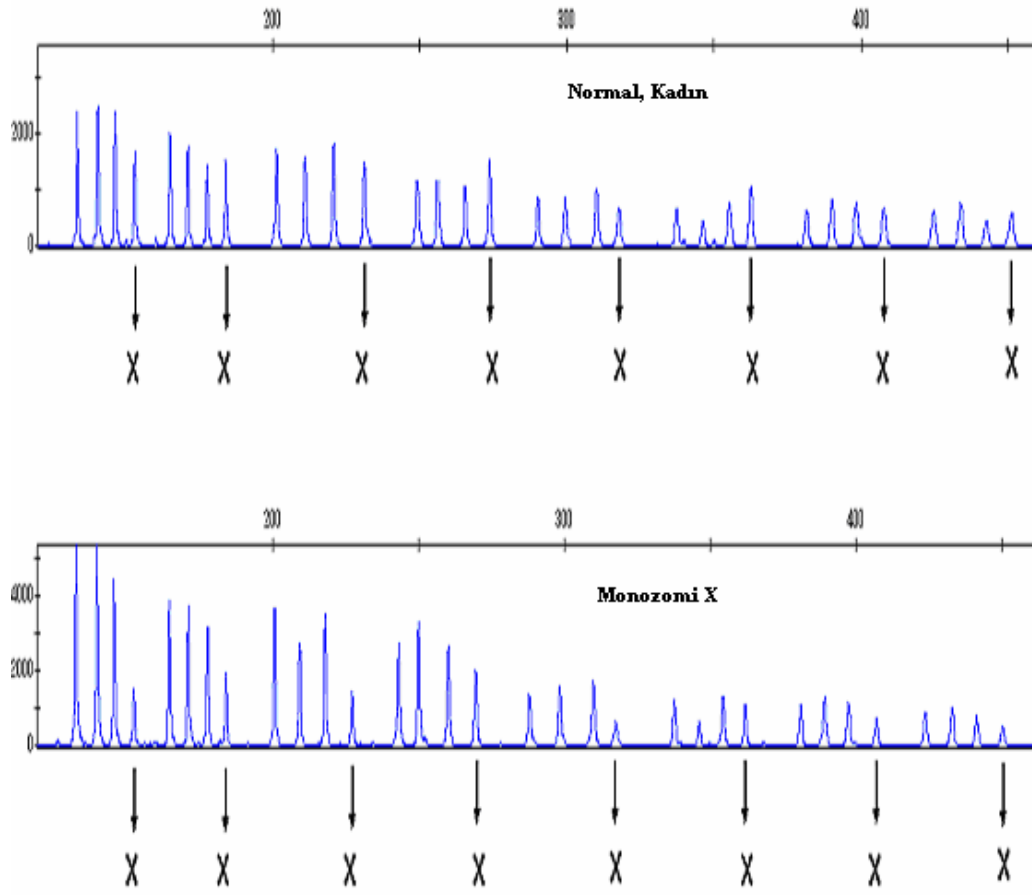
Bu tabloda dikkat edilecek nokta X kromozomu üzerinde yer alan prob bölgelerindeki amplifikasyonlardır. Bu hasta değerlendirilirken kontrol olarak erkek hasta kullanılmıştır. Buna göre kontrolle karşılaştırıldığında X kromozomundaki artış Coffalyser programında amplifikasyon olarak görülmektedir. Ayrıca Y kromozomunda herhangi bir delesyon veya amplifikasyon görülmemesi kontrolle aynı dozda Y

kromozomu taşıdığını göstermektedir. Buna göre MLPA yöntemi ile alınan sonuç 47, XXY ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Monozomi X Örneği:

Yine çalışma grubunda incelenen hastalardan bir tanesinde Monozomi X sonucu ile uyumlu pik görüntüleri elde edilmiştir. Bu hastanın elde edilen pik alan değerleri, Coffalyser programına aktarılarak kromozomal açıdan normal kontrol hastalarıyla karşılaştırılmış ve MLPA yöntemi ile alınan sonucun 45,X karyotipi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kromozomal açıdan normal olan erkek ve kadın örnekler eksternal kontrol olarak kullanılmak üzere test örnekleri ile birlikte çalışılmıştır. Bu hastadan elde edilen pik görüntüleri ve kullanılan kontrol hastasına ait pik görüntüsü Şekil 4.2.11 de gösterilmiştir. Yine aynı hastadan elde edilen pik alan değerleri de Çizelge 4.2.11.A da belirtilmiştir. Ayrıca bu pik alan değerlerinin Coffalyser programında analiziyle elde edilen değerleri Çizelge 4.2.11.B de verilmiştir.

Şekil4.2.11.: Monozomi X ve Normal, Kadın Örnek Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.11.A.: Monozomi X Örneğinin Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	132,42	40492	Krom.X	269,62	19921
Krom.18	139,57	35307	Krom.Y	283	0
Krom.13	145,38	33093	Krom.21	287,93	14828
Krom.X	152,18	12991	Krom.18	298,37	16709
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,03	19240
Krom.21	164,33	33063	Krom.X	317,58	8121
Krom.18	170,87	28663	Krom.21	337,75	13026
Krom.13	177,54	27459	Krom.18	346,36	10524
Krom.X	183,84	13132	Krom.13	354,46	15446
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,03	11213
Krom.21	200,5	33862	Krom.21	381,22	15656
Krom.18	209,13	25599	Krom.18	389,36	19454
Krom.13	217,86	31341	Krom.13	397,53	19831
Krom.X	227,12	13738	Krom.X	407,19	8172
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,1	14183
Krom.21	243,11	28363	Krom.18	433,22	14665
Krom.18	250	31436	Krom.13	441,51	9146
Krom.13	260,14	22697	Krom.X	450,49	9088

Çizelge 4.2.11.B.: Monozomi X Örneğinin Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204				s-1788
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,300
MADH4	18q21.1	142	18	1,240
ABCC4	13q32	148	13	1,270
AR	Xq11.2	154	X	1,030
SRY	Yp11.3	160	Y	0,000
NCAM2	21q21.1	166	21	1,27
PMAIP1	18q21	172	18	1,20
CCNA1	13q12.3	178	13	1,260
FACL4	Xq23	184	X	1,080
SRY	Yp11.3	193	Y	0,000
USP25	21q11.2	202	21	1,220
SS18	18q11.2	211	18	1,000
RB1	13q14.3	220	13	1,040
ARX	Xp22.1	229	X	1,010
UTY	Yq11	238	Y	0,00
STCH	21q11	247	21	1,080
NFATC1	18q23	256	18	1,140
DACH	13q21.3	265	13	1,15
TM4SF2	Xp11.4	274	X	1,230
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,00
SOD1	21q22.1	292	21	0,850
TYMS	18p11.3	301	18	0,830
P85SPR	13q34	310	13	0,990
L1CAM	Xq28	319	X	1,000
APP	21q21.3	337	21	0,780
SERPINB2	18q21.3	346	18	0,96
BRCA2	13q12.3	355	13	0,86
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	0,880
TFF1	21q22.3	382	21	0,890
SS18	18q11.2	391	18	0,800
DLEU1	13q14.3	400	13	0,87
PDCD8	Xq25	409	X	0,930
TIAM1	21q22.1	427	21	0,880
MC2R	18p11.2	436	18	0,74
ING1	13q34	445	13	0,730
DMD	Xp21.2	454	X	0,910

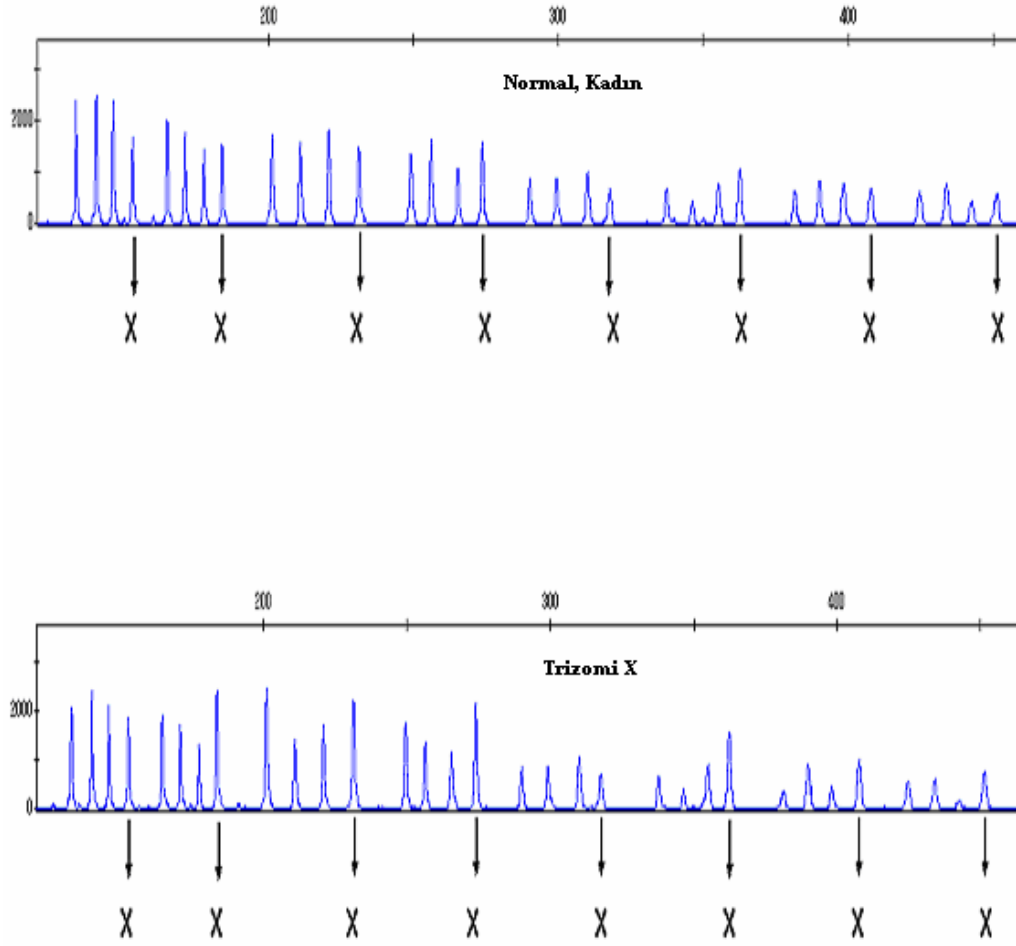
Tabloda verilen değerler incelendiğinde Y kromozomu üzerindeki prob bölgelerinde delesyonlar görülmektedir. Bu hastanın değerlendirmesinde kontrol olarak erkek hastalar kullanılmıştır. Buna göre değerlendirilen hastada Y kromozomu olmamakla birlikte, X kromozom dozunda duplikasyon görülmediğinden X kromozom

dozu kontrolle aynıdır. Yani hasta tek X kromozomuna sahiptir. Böylece örneğin MLPA yöntemi ile sonucu Monozomi X olarak belirlenmiştir.

Trizomi X Örneği:

Değerlendirilen hasta grubu içerisinde bir hastada Trizomi X sonucu ile uyumlu pik görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen bu piklerin alanları Coffalyser programına aktarılarak değerlendirilmiş ve bu karyotip ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu hastaya ait pik görüntüleri ve kromozomal yönden sağlıklı kontrol hastasına ait pik görüntüleri Şekil 4.2.12. de verilmiştir. Yine aynı hastaya ait pik alanlarının değerleri de Çizelge 4.2.12.A da belirtilmiştir. Ayrıca bu değerlerin Coffalyser programında elde edilen sonuçlarında Çizelge 4.2.12.B de verilmiştir.

Şekil 4.2.12.: Trizomi X ve Normal, Kadın Örneği Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.12.A.: Trizomi X Örneği Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	Area	Dye/Sample Peak	Size	Area
Krom.21	133,31	16592	Krom.X	274,05	23120
Krom.18	140,31	17423	Krom.Y	283	0
Krom.13	146,28	14331	Krom.21	290,14	9535
Krom.X	153,05	14453	Krom.18	299,23	10549
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,08	11502
Krom.21	164,81	16428	Krom.X	317,64	8671
Krom.18	171,04	13881	Krom.21	337,9	8462
Krom.13	177,7	9968	Krom.18	346,5	4396
Krom.X	183,92	20447	Krom.13	355	10845
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,5	19695
Krom.21	201,22	18332	Krom.21	381,24	8682
Krom.18	211,12	13054	Krom.18	389,78	11951
Krom.13	221,01	15430	Krom.13	398,11	9514
Krom.X	231,52	22057	Krom.X	407,73	13246
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,62	7866
Krom.21	249,63	17847	Krom.18	434,06	7882
Krom.18	256,46	13987	Krom.13	442,66	7527
Krom.13	265,62	13378	Krom.X	451,35	10855

Çizelge 4.2.12.B.: Trizomi X Örneği Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204				s-1003
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	1,000
MADH4	18q21.1	142	18	1,150
ABCC4	13q32	148	13	1,030
AR	Xq11.2	154	X	2,140
SRY	Yp11.3	160	Y	0,000
NCAM2	21q21.1	166	21	1,18
PMAIP1	18q21	172	18	1,09
CCNA1	13q12.3	178	13	0,860
FACL4	Xq23	184	X	3,170
SRY	Yp11.3	193	Y	0,000
USP25	21q11.2	202	21	1,240
SS18	18q11.2	211	18	0,960
RB1	13q14.3	220	13	0,960
ARX	Xp22.1	229	X	3,050
UTY	Yq11	238	Y	0,00
STCH	21q11	247	21	1,270
NFATC1	18q23	256	18	0,950
DACH	13q21.3	265	13	1,27
TM4SF2	Xp11.4	274	X	2,670
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,00
SOD1	21q22.1	292	21	1,030
TYMS	18p11.3	301	18	0,990
P85SPR	13q34	310	13	1,110
L1CAM	Xq28	319	X	2,000
APP	21q21.3	337	21	0,950
SERPINB2	18q21.3	346	18	0,76
BRCA2	13q12.3	355	13	1,13
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	2,890
TFF1	21q22.3	382	21	0,930
SS18	18q11.2	391	18	0,920
DLEU1	13q14.3	400	13	0,78
PDCD8	Xq25	409	X	2,840
TIAM1	21q22.1	427	21	0,920
MC2R	18p11.2	436	18	0,75
ING1	13q34	445	13	1,120
DMD	Xp21.2	454	X	2,040

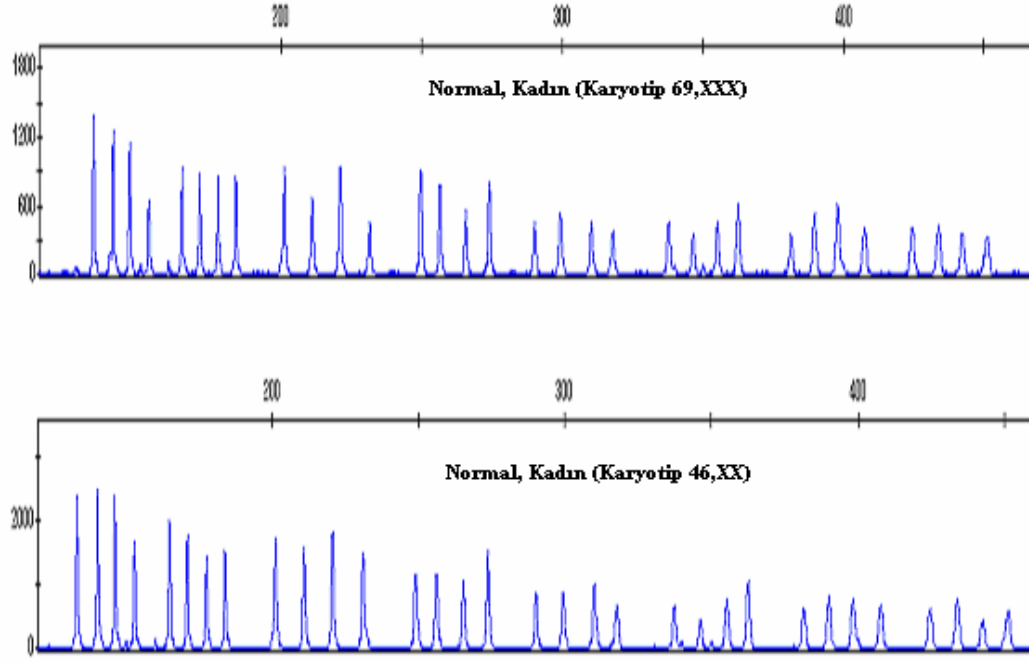
Çizelge incelendiğinde Y kromozomu üzerinde yer alan problarda delesyon olduğu, daha doğrusu hastanın Y kromozomu taşımadığı, X kromozomunda ise doz artışı olduğu görülmektedir. Değerlendirmelerde kontrol olarak öncelikle erkek hasta kullanılmıştır. Bu örnekte eksternal kontrol olarak normal kadın pik alan değerleri

kullanıldığında yine aynı şekilde X kromozomuna ait doz artışı görülmüştür. Bu sonuçlara göre hastanın MLPA yöntemi ile test sonucu Trizomi X olarak belirlenmiştir.

69, XXX Karyotipli Örneğin MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Sonucu:

Çalıştığımız amniyotik sıvı örneklerinde, 1 hastanın sitogenetik analizinde 69,XXX karyotipi görüldü. Çalışmamızda bu hastada elde ettiğimiz pik görüntüleri Şekil 4.2.13 de verilmiştir. Yine bu hastaya ait pik alan değerleride Çizelge 4.2.13.A da verilmiştir. Burada dikkat edilecek nokta, anöplodilerde görüldüğü gibi, bu öplodik vakada piklerin, kontrol pikleri ile görünür bir değişiminin olmamasıdır. Ayrıca bu pik alan değerlerinin Coffalyser programına aktarılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.13.B de verilmiştir.

Şekil 4.2.13.: 69,XXX Karyotipli Hastanın MLPA Yöntemi ile Pik Görüntüleri



Çizelge 4.2.13.A.: 69,XXX Karyotipli Hastanın MLPA Yöntemi İle Pik Alan Değerleri

Dye/Sample Peak	Size	s-1832	Dye/Sample Peak	Size	s-1832
Krom.21	133,32	14244	Krom.X	274,02	22632
Krom.18	140,38	14132	Krom.Y	283	0
Krom.13	146,16	19818	Krom.21	290,16	9034
Krom.X	152,98	13724	Krom.18	299,14	9723
Krom.Y	160	0	Krom.13	310,07	10731
Krom.21	164,81	16143	Krom.X	317,84	7118
Krom.18	171,01	13670	Krom.21	337,82	11526
Krom.13	177,64	8272	Krom.18	346,54	6675
Krom.X	183,84	14978	Krom.13	355,25	11392
Krom.Y	193	0	Krom.X	362,59	8503
Krom.21	201,2	16319	Krom.21	381,61	10611
Krom.18	211,01	10162	Krom.18	389,94	10348
Krom.13	221,05	14694	Krom.13	398,29	10237
Krom.X	231,56	17843	Krom.X	407,66	7651
Krom.Y	238	0	Krom.21	424,65	8777
Krom.21	249,76	12519	Krom.18	433,75	10242
Krom.18	256,52	14260	Krom.13	442,55	8331
Krom.13	265,57	11439	Krom.X	451,21	12180

Çizelge 4.2.13.B.: 69,XXX Karyotipli Hastanın MLPA Yöntemi İle Coffalyser Programında Elde Edilen Sonuçları

P095 MLPA mix lot 1204				s-1832
Probe name	Chr pos	Length PCR	MV35	Ratio
SIM2	21q22.2	136	21	0,840
MADH4	18q21.1	142	18	0,910
ABCC4	13q32	148	13	1,390
AR	Xq11.2	154	X	1,480
SRY	Yp11.3	160	Y	0,000
NCAM2	21q21.1	166	21	1,14
PMAIP1	18q21	172	18	1,05
CCNA1	13q12.3	178	13	0,700
FACL4	Xq23	184	X	1,660
SRY	Yp11.3	193	Y	0,000
USP25	21q11.2	202	21	1,080
SS18	18q11.2	211	18	0,730
RB1	13q14.3	220	13	0,890
ARX	Xp22.1	229	X	1,410
UTY	Yq11	238	Y	0,00
STCH	21q11	247	21	0,870
NFATC1	18q23	256	18	0,940
DACH	13q21.3	265	13	1,06
TM4SF2	Xp11.4	274	X	1,550
ZFY	Yp11.3	283	Y	0,00
SOD1	21q22.1	292	21	0,950
TYMS	18p11.3	301	18	0,890
P85SPR	13q34	310	13	1,010
L1CAM	Xq28	319	X	1,600
APP	21q21.3	337	21	1,260
SERPINB2	18q21.3	346	18	1,12
BRCA2	13q12.3	355	13	1,16
RPS6KA3	Xp22.2	364	X	1,210
TFF1	21q22.3	382	21	1,110
SS18	18q11.2	391	18	0,780
DLEU1	13q14.3	400	13	0,82
PDCD8	Xq25	409	X	1,600
TIAM1	21q22.1	427	21	1,000
MC2R	18p11.2	436	18	0,95
ING1	13q34	445	13	1,210
DMD	Xp21.2	454	X	1,530

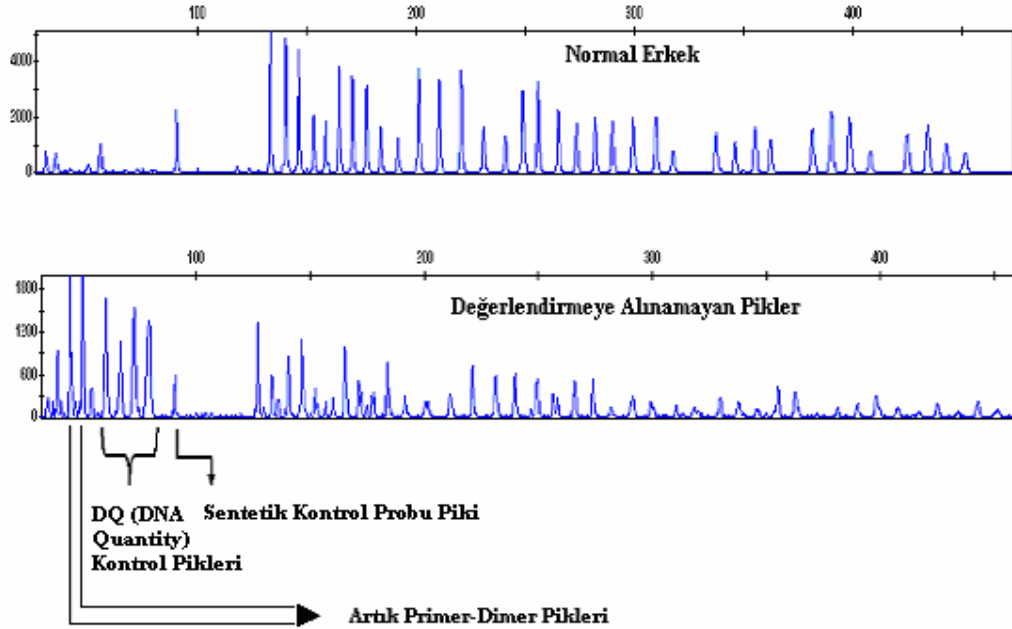
Tabloda verilen değerler incelendiğinde X kromozomu üzerindeki prob bölgelerindeki amplifikasyonlar ve Y kromozomu olmaması dikkati çekmektedir. Ayrıca X kromozomundaki amplifikasyonlar, hastanın kontrole göre fazla X kromozomu taşıdığını göstermektedir. Ek olarak Normal, Kadın pik alanları eksternal

kontrol olarak kullanıldığında da bu örneğin sonucu MLPA testi ile Normal, Kadın olarak bulunmuştur. Yapılan sitogenetik incelemelerde hastanın karyotipi 69, XXX olarak saptanmıştır. Bu nedenle MLPA testinin öploidik değişimlerde doğru sonuç vermeyeceği görülmüştür.

47,XX,+13 Karyotipli Örnekte MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Pik Görüntüleri:

Çalıştığımız hasta grubu içinde 47,XX,+13 karyotipine sahip hastanın MLPA yöntemi ile elde edilen sonucu Şekil 4.2.14 de gösterilmiştir. 46,XY karyotipine sahip bir örneğin MLPA pik görüntüleri karşılaştırma amaçlı olarak aynı şekilde gösterilmiştir.

Şekil 4.2.14.: Normal Erkek Örnekten ve Değerlendirmeye Alınamayan 47,XX,+13 Karyotipli Hastadan MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Pik Görüntüleri



Bu örnekle birlikte toplam 20 amniyotik sıvı örneğinde de Gene Mapper programında yetersiz gözüken DNA miktarları sebebi ile sonuç alınamamıştır. Sonuç elde edemediğimiz bu 20 amniyotik sıvı örneği ile bu örneklerin gebelik haftaları ile korelasyon bulunmamıştır.

4.3. MLPA Analiz Sonuçlarının Rutin Test Sonuçları İle Karşılaştırılması Ve Yöntemin Güvenilirliğinin Hesaplanması

500 örneklilik testin tamamlanmasından sonra “Medikal Tanı Testlerinin Güvenilirliği” ile ilgili olarak testin sensitivite ve spesifitesinin belirlenmesi için aşağıdaki istatistik metodu uygulanmıştır (Çizelge 4.3.1.). Sensitivite ve spesifite hesaplamalarına sadece sonuç alınan test sonuçları dahil edilebildiğinden, sonuç alınamayan vakalar bu hesaplama katılmamıştır.

Çizelge 4.3.1: Medikal Testin Gerçek Durumu Yansıtması

		Gerçek Durum (Referans)		
		H +	H -	Toplam
Medikal Test Sonucu	H +	Gerçek Pozitif (GP=a)	Yalancı Pozitif (YP=b)	T(T+)
	H -	Yalancı Negatif (YN=c)	Gerçek Negatif (GN=d)	T(T-)
Toplam		G(H+)=a+c	G(H-)=b+d	Toplam

Duyarlılık (Sensitivite, hassasiyet) Oranı: $P(D)=a/(a+c)=GP/(GP+YN)$

Özgüllük (Specifite) Oranı: $P(Ö)=d/(b+d)=GN/(YP+GN)$ (Kaynak 33)

Çizelge 4.3.2.: Bulgularımızın Referans Sonuçları İle Karşılaştırılması

		Gerçek Durum (Referans)		
		H+	H-	
Medikal Test Sonucu	H+	26	0	
	H-	0	453	
Toplam		26	453	479

Duyarlılık (Sensitivite, hassasiyet) Oranı= $26 / (26+0) = 1$ (%100)

Özgüllük (Specifite, seçicilik) Oranı= $453 / (453+0) = 1$ (%100)

Yanlış negatiflik oranı= 1 — Duyarlılık = %0

Yanlış pozitiflik oranı= 1 — Özgüllük= %0

Elde ettiğimiz test sonuçlarımızda, yanlış negatif ve/ veya yanlış pozitif sonuç saptanmamıştır. Yani referans sonuçları ile karşılaştırıldığında MLPA P095 anöploid kiti ile bütün hastalar “hasta”, bütün normaller de “normal” olarak tanımlanmıştır.

Yöntemin başarı oranı=%96 dır. MLPA tekniği ile sonuç elde edilemeyen vaka sayısı “başarısızlık oranı”nı belirlemiştir. Yöntemin Başarısızlık Oranı= Toplam 500 vakanın 20 sinde (%4) MLPA yöntemi ile sonuç elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamıza prenatal tanı amacıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2000-2006 yılları arasında başvuran hastalardan alınmış 500 amniyosentez sıvısı dahil edilmiştir.

MLPA yöntemi ile anöploidi tayini yaptığımız örneklerden elde edilen sonuçlar konu ile ilgili yapılmış sınırlı sayıdaki çalışma sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

5.1. MLPA Yönteminin Sensitivitesi

Slater ve arkadaşları, Gerdes ve arkadaşları ve Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında anöploidi taramasında MLPA yönteminin sensitivitesi %100 olarak bulunmuştur (19, 22, 40).

Çalışmamızda da MLPA yönteminin sensitivitesi %100 olarak saptanmış ve diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Çizelge 4.3.2.).

5.2. MLPA Yönteminin Spesifitesi

Slater ve arkadaşları ile Gerdes ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarda MLPA yönteminin spesifitesini %100 olarak saptamışlardır. Hochstenbach ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarında MLPA yönteminin spesifitesini %99.8 olarak bulmuşlardır (19, 22, 40).

Bizim çalışmamızda MLPA yönteminin spesifitesi %100 olarak saptanmış olup, diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (Çizelge 4.3.2.).

5.3. MLPA Yönteminin Başarısızlık Oranı

Slater ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda MLPA yönteminin başarısızlık oranı %0 olarak bildirilmiştir (40).

Gerdes ve arkadaşlarının çalışmalarında yöntemin başarısızlık oranı %3.2 olarak bulunmuş, sonuca gerekçe olarak; pratik uygulamadaki ve MLPA verilerinin analizindeki deneyimsizlik gösterilmiştir (19).

Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında yöntemin başarısızlık oranı %1.9 olarak bulunmuş ve bu sonuca gerekçe olarak sonuç alınamayan örneklerdeki DNA miktarının yetersizliği gösterilmiştir (22).

Çalışmamızda yöntemin başarısızlık oranı %4 olarak saptanmıştır. Oranımız diğer çalışmalardakinden daha yüksektir.

Slater ve arkadaşları ile Hochstenbach ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MLPA yönteminde DNA kaynağı olarak fetal örneklerden elde ettikleri hücre lizatını kullanmışlar ve yönteme ait daha düşük başarısızlık oranları elde etmişlerdir. Gerdes ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ve bizim çalışmamızda MLPA yönteminde kullanılmak üzere fetal örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır ve daha yüksek düzeyde başarısızlık oranı elde edilmiştir (19, 22, 40).

Uygulanan yöntemin basamakları ve başarısızlık oranları topluca değerlendirildiğinde; DNA kaynağı olarak kültüre edilmemiş fetal materyalden MLPA prob miksi ile hibridizasyon aşamasından önceki aşamada hücre lizatı kullanılan çalışmalarda testin başarısızlık oranı düşük bulunurken, DNA izolasyonu ile saf DNA elde edilerek çalışılan yöntemlerde testin başarısızlık oranının daha yüksek bulunduğu görülmüştür. Biz de çalışmamızda DNA izolasyonu ile saf DNA elde ederek uygulamada bulunduğumuz için başarısızlık oranımız diğer çalışmalardan yüksek olarak saptanmıştır.

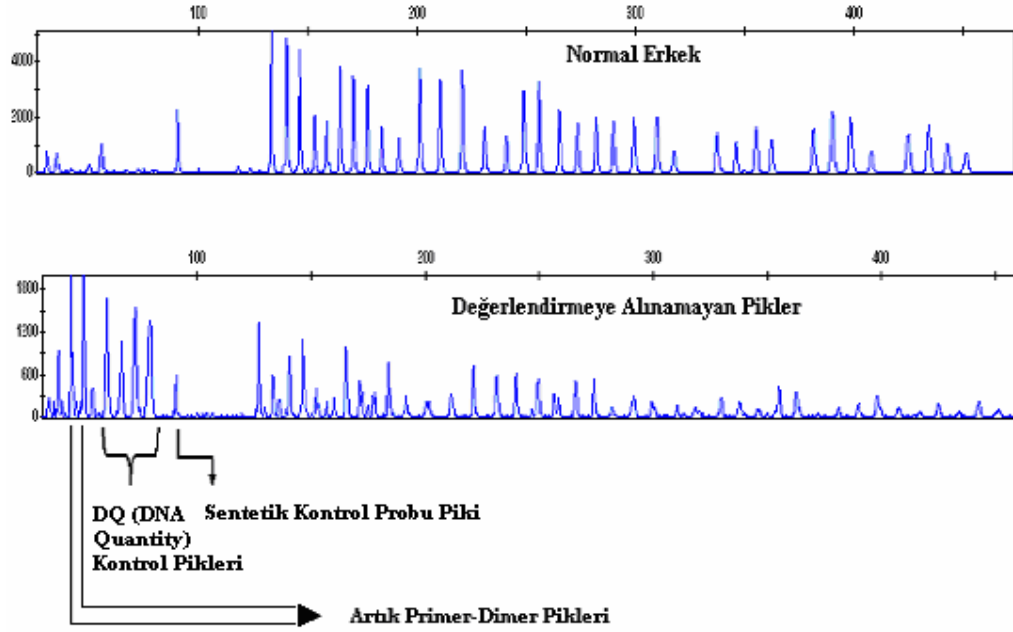
Hücre lizati kullanılarak yapılan çalışmalarda, MLPA problemlerinin genomik DNA ile hibridizasyonunun ve/veya ligaz reaksiyonunun daha efektif şekilde gerçekleşebileceği düşünülmüştür.

Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında; amniyotik sıvı içindeki fetal hücrelerin %80 inden fazlasının ölü ya da ölmekte olduğu ve bu hücrelerden, DNaz ın da dahil olduğu çeşitli enzimlerin salındığı belirtilmektedir. DNA degradasyonu ile MLPA sonuçlarının etkilenmeyeceği ifade edilse bile çalışmamızda kullandığımız amniyon sıvısı örnekleri uzun süre -20 °C de saklanmıştır ve diğer çalışmalara göre daha yüksek test başarısızlık oranı elde etmemizin ikinci bir nedeninin; çalışmamızda kullandığımız amniyotik sıvı örneklerinin saklanma koşulları olabileceği düşünülmüştür ve Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur (22).

Çalışmamızda sonuç elde edemediğimiz 20 amniyotik sıvı örneğinde, yöntem başarısızlığı ile bu örneklerin gebelik haftaları arasında korelasyon saptanmamıştır.

Çalışmamızda sonuç elde edemediğimiz örneklerin tipik pik görüntüsü ve karşılaştırma amacıyla verilen sonuç elde edilmiş normal erkek örneğe ait pik görüntüsü Şekil 4.2.14 de gösterilmiştir.

Şekil 4.2.14.: Normal Erkek Örnekten ve Değerlendirmeye Alınamayan 47,XX,+13 Karyotipli Hastadan MLPA Yöntemi İle Elde Edilen Pik Görüntüleri



Kontrol grubu sonucu olarak 47,XX,+13 karyotipine sahip hastanın MLPA ile analizinde elde edilen pik görüntüleri yöntemin uygulama ve değerlendirme prosedürüne uygun şekilde incelendiğinde; sentetik kontrol probu pikinin varlığı prob hibridizasyon işleminden sonra ligasyon ve PCR işlemlerinin gerçekleştirildiğine işaret etmektedir. Ligasyon işleminden bağımsız şekilde PCR ile amplifiye olan DQ kontrolleri bu örnekte gözle görülür şekilde test pikleri ile aynı boyda ya da daha uzundurlar. Normalde bu durum prosedüre göre kullanılan DNA miktarının yetersiz olduğunu göstermektedir ve elde edilen pik alan değerleri değerlendirilemeyecek şekilde kalitesizdirler. Oysa tüm diğer örneklerimizde olduğu gibi (20-500 ng olan gerekli DNA miktarını karşılamak üzere) bu örnekte de 45-150 ng olacak şekilde yeterli miktarda DNA kullanılmıştır. Genelde 55 baz uzunluğu bölgesinde görülen uzun pikler artık primer-dimer pikleridir ve normalde efektif bir PCR sonunda primerlerin tama yakın miktarı kullanılmış olacağından daha düşük seviyelerde görülürler. Bu durum PCR reaksiyonuna giren ligate olmuş prob miktarının mevcut olduğunu ancak miktarının yetersiz olduğunu işaret etmektedir. MLPA yönteminde pikleri değerlendirme aşamasında prosedüre göre bu durum; yetersiz ligasyon işlemi şeklinde açıklanmıştır. Çalışmamızda bu duruma yol açabilecek gerekçenin; izole DNA ile prob hibridizasyonunun, hücre lizatındaki hibridizasyona göre daha az efektif olabileceği düşünülmüştür.

Yaptığımız çalışmada MLPA yönteminde elde edilecek pik alan değerlerinin tanı için yeterli kalitede olmasının temel olarak; fetal DNA miktarı, hibridizasyon/ligasyon etkinliği ve PCR döngü sayısı ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Elde ettiğimiz %4 lük yöntem başarısızlığının, yöntemde fetal hücrelerden elde edilecek hücre lizatı ile çalışılması halinde daha aşağı seviyelere çekilebileceği düşünülmüştür.

5.4. Anöploidi Tanısında Kullanılan Analiz Yöntemlerinin Karşılaştırılması

MLPA yöntemin, prenatal anöploidi tayininde rutinde kullanılabilirliği ile ilgili olarak rutinde kullanılan mevcut yöntemlere göre avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmıştır.

5.4.1. Klasik Kromozom Analizi İle Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması

FISH, QF PCR ve MLPA yöntemlerinin (moleküler yöntemler) 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının dozlarının tayininde kullanılmak üzere dizayn edilmiş biçimleri ile ilgili olarak bu yöntemler sık görülen anöploidilerin saptanmasında kullanılabilirler. Bu nedenle klasik kromozom analizi ile saptanabilen fakat anöploidi tanısında rutinde kullanılan moleküler yöntemler ile (anöploidi taraması için hazırlandıklarından) saptanamayan dengeli/dengesiz kromozomal yeniden düzenlenmeler bu tartışmanın dışında tutulmuştur.

Grimshaw ve arkadaşlarının çalışmalarına göre; klasik kromozom analizinde örneğin karyotipi belirlenebilirken, moleküler yöntemler ile adı geçen kromozomların sadece doz tayini yapılabilmektedir (21).

Hulten ve arkadaşlarının raporlarında da belirtildiği gibi; moleküler analiz yöntemleri ile incelenecek fetal hücrelerin hücre yaşam siklusunun bölünme aşamasında olmaları şartı bulunmamaktadır. Bu yüzden karyotiplemeye göre daha kısa zamanda analiz sonuçları elde edilebilmektedir (25).

Hulten ve arkadaşlarının raporlarında belirtildiği gibi; moleküler yöntemlerle çalışmak için karyotiplemeye oranla daha az miktarda fetal materyal yeterli olabilmektedir (25).

Persutte ve arkadaşları ile Reid ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; anöploidi saptanan örneklerin normal karyotipe sahip örneklere göre kültürde üreme başarısızlıklarının yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kültürde üremenin olmadığı bu örneklerde moleküler yöntemler ile başarılı sonuçlar alınabilecektir (35, 37).

Hook ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; kültüre edilmiş amniyon hücrelerinden anormal fetal karyotip saptanan vakaların %60-80 ininde 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarına ait anöploidilerin varlığını göstermiştir. Anomali saptanan toplam vaka sayısının %60-80 lik kısmında moleküler yöntemler kullanılarak güvenilir sonuçlar alınabilecektir (24).

Cirigliano ve arkadaşları, Grimshaw ve arkadaşları ile Waters ve arkadaşlarının çalışmalarında bildirdikleri gibi; klasik kromozom analizine göre süre açısından avantajları nedeni ile özellikle anormal ultrason bulgusu olan vakalarda moleküler yöntemler ile erken sonuç almak anlamlı olabilecektir (11, 21, 48).

Grimshaw ve arkadaşları ile Slater ve arkadaşlarının çalışmalarında; bazı dezavantajlarının olması ile birlikte klasik kromozom analizinin (karyotipleme) prenatal takipte "Altın Standart" olarak kabul gördüğü ve moleküler yöntemler ile elde edilen sonuçların karyotipleme ile onaylanması gerekliliği ifade edilmektedir (21, 40).

Çalışmamızda MLPA anöploidi kiti ile tanınamayan bir triploidik vakamız bulunmaktadır. Çalışma grubumuzda %4 vakada bu yöntemle sonuç elde edilememiştir. Olası mozaik tip anöploidik vakalarda MLPA yöntemi ile kesin sonuç elde edilemeyebilecektir. Bu gerekçeler nedeni ile MLPA ile elde edilen sonuçların klasik kromozom analizi ile doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.

5.4.2. MLPA Yönteminin Diğer Moleküler Analiz Yöntemleri İle Karşılaştırılması

Çalışmamızda prenatal tanı amaçlı olarak kullandığımız MLPA yönteminin rutinde kullanılabilirliğinin sınanması ile ilgili, rutinde kullanılan diğer yöntemlerin (FISH ve QF-PCR) başlıca özellikleri karşılaştırılmıştır.

1. Genomik hedef DNA dizilerinde polimorfizm varlığı:

Adinolfi ve arkadaşları ile Slater ve arkadaşlarının çalışmalarında bildirdikleri gibi; polimorfik özellik gösteren STRs markerleri kullanılan QF-PCR yöntemi ile prenatal tanıda, sonucun güvenilirliği ırktan ırka, kişiden kişiye değişebilmektedir (1, 40).

Tepperberg ve arkadaşları, Thilaganathan ve arkadaşları ile Verlinsky ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; FISH yöntemi ile anöploidi tayininde; hedef bölgenin polimorfizm gösterebilmesine ve alfa satellit tekrar sayılarındaki azalma nedeni ile problemlerin hedef diziyeye hibridizasyon yetersizliğine bağlı olarak zayıf floresans sinyaller ve yanlış negatif, yanlış pozitif sonuçlar mümkün olabilmektedir (43, 44, 46).

Çalışmamızda; hedef DNA dizileri polimorfik olmayan, kromozoma spesifik stabil bölgelerden seçilmişlerdir ve test sonuçları polimorfizmden etkilenmemektedir. Bu özelliği ile MLPA yöntemi diğer yöntemlere göre avantajlıdır.

2. Kromozomlara spesifik olarak kullanılan marker sayıları:

Bryndorf ve arkadaşları, Grimshaw ve arkadaşları, Mann ve arkadaşları ile Tepperberg ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; 13., 18., ve 21. kromozomlar için; QF-PCR yönteminde 3-4 er marker, FISH yönteminde 1 er marker kullanılmaktadır (7, 21, 28, 44).

Adı geçen kromozomlar için MLPA yöntemi ile yaptığımız çalışmamızda 8 er farklı marker kullanılmıştır.

Bryndorf ve arkadaşları, Grimshaw ve arkadaşları, Mann ve arkadaşları ile Tepperberg ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; X ve Y kromozomları için QF-PCR ve FISH yöntemlerinde 1 er marker kullanılmaktadır (7, 21, 28, 44).

Çalışmamızda X kromozomu için 8, Y kromozomu için 4 marker kullanılmıştır

Bölümümüzde FISH yönteminde kullandığımız AneuVysion Prob Set (Vysis) ile 18., X ve Y kromozomlarına sentromer spesifik, 13. ve 21. kromozomlara lokus spesifik olmakzere 5 ayrı prop ile bakılarak doz tayini yapılmaktadır.

Her rnek için toplam genomik hedef sayısı; QF-PCR yönteminde 13, FISH yönteminde 5 ve MLPA yönteminde 36 dır.

MLPA yöntemi ile 45 ayrı genomik bölgeye tek çalışmada bakılabilmesi, MLPA Salsa 095 Anöploidi kitinde toplam 36 genomik blgezzerinden adı geçen kromozomlar için doz tayini yapılabilmesi avantajı sağlamaktadır.

3. İformatif marker gerekliliği:

Bryndorf ve arkadaşları ve Grimshaw ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; QF-PCR yönteminde kromozoma ait doz tayini yapılabilmesi için kromozomdaki allel bölgelerde STRs dizi uzunluklarının birbirinden farklı (informatif) olması şartı mevcuttur. FISH ve MLPA yöntemlerinde kromozomların dozajlarını belirlemek için kullanılan markerlerin informatif olması gerekmemektedir ve bu özellik açısından QF-PCR yöntemine göre avantajlıdırlar (7, 21).

4. Tek seferde çalışılabilecek test sayısı ve otomasyona uygunluk:

Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; FISH yönteminde tek seferde yaklaşık 10 örnek çalışılabilirken, kapiller elektrofez cihazının kapasitesine bağılı olarak QF-PCR ve MLPA yönteminde 96 şar örnek aynı anda çalışılabilmektedir. FISH dışında diğeri iki yöntem otomatize edilmişlerdir (22).

Çalışmamızda kapiller elektrofez cihazımızın kapasitesine bağılı olarak 48 amniyotik sıvı örneği aynı anda çalışılabilmektedir.

5. Sonuç vermek için gereken süre:

Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; QF-PCR ve FISH yöntemleri kullanılarak 24 saatten kısa sürede sonuç vermek mümkündür (22).

Kliniğimizde FISH ile anöploidi tayini; bir gecelik hibridizasyon süresi ile birlikte 24 saatten kısa zamanda yapılabilmektedir.

Çalışmamızda MLPA prosedürüne uygun olarak uyguladığımız 16 saatlik prob hibridizasyon süresi, 90 dakikalık PCR aşaması ve kapiller elektrofezde her örnek için 25 dakikalık uygulama süreleri sebebi ile MLPA yönteminde 24 saatten az zamanda sonuç vermek mümkün olmuştur.

Yöntemlerin sonuç vermek için gereken süre açısından birbirlerine göre avantajları yoktur.

6. Yöntemlerin güvenilirlikleri:

QF-PCR:

Cirigliano ve arkadaşları çalışmalarında; QF-PCR yöntemi için sensitivite ve spesifite oranlarını sırası ile %95 ve %100 olarak bildirilmişlerdir. Test başarısızlık oranı <%1 olarak bildirilmiştir (11).

FISH:

Hochstenbach ve arkadaşları moleküler yöntemler içinde üzerinde en çok çalışılmış olan FISH yönteminin prenatal tanıdaki güvenilirliği ile ilgili sensitivitesinin %99.7, spesifitesinin %97.6 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada test başarısızlık oranının %7 ye kadar değişen oranlarda olabileceği bildirilmiştir (22).

Tepperberg ve arkadaşlarının AneuVysion Prob Set (Vysis) kullanarak yaptıkları çalışmada; FISH yöntemin sensitivitesinin %99.6, spesifitesinin %99.98 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada test başarısızlık oranı <% 2.8 olarak bildirilmiştir (44).

Çalışmamızda MLPA yönteminin prenatal tanı amaçlı kullanılması ile ilgili, yöntemin sensitivitesi ve spesifitesinin %100 olduğu hesaplanmıştır. Test başarısızlık oranı %4 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak kullandığımız karyotip ve FISH yöntemi sonuçları, çalışmamızın amaçlarına yönelik olarak seçilmiş örneklere ait olduğundan FISH yönteminin güvenilirliğinin saptanmasında kullanılamamışlardır. Bu sebeple FISH yönteminin güvenilirliği ile ilgili karşılaştırmada literatür bilgilerinden yararlanılmıştır (22, 44, 51).

7. Anne kanı kontaminasyonu:

Gerdes ve arkadaşları ile Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; amniyotik sıvının anne kanı ile kontaminasyonu MLPA yöntemi için belirgin bir dezavantajdır ve bu örneklerde MLPA ile güvenilir sonuç alınamayabilecektir (20, 22).

Grimshaw ve arkadaşları ile Hochstenbach ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi; QF-PCR yöntemi anne kanı kontaminasyonunu belirlemede başarılı bir yöntemdir. FISH yönteminde ise fetus erkek ise anne kanı kontaminasyonu belirlenebilmektedir (21, 22).

8. Hücre kalitesi:

Grimshaw ve arkadaşları, Hulten ve arkadaşları ile Rooney ve arkadaşlarının çalışmalarında belirtildiği gibi; fetal materyalde hücre bütünlüğünün bozulduğu ve/veya hücre sayısının yetersiz olduğu durumlarda karyotipleme ve FISH yöntemi dezavantajlı olabilirken QF-PCR ve MLPA yöntemleri ile analiz mümkün olabilmektedir (21, 25, 38).

5.5. MLPA Yönteminin Uygulamadaki Basamakları

Bu konuda fazla çalışma bulunmadığı ve MLPA yöntemindeki basamaklarla ilgili detaylar değerlendirilemediği için çalışmamız, Salsa P095 anöploidi kiti protokolü verileri ile karşılaştırılmış ve sonuçlarımız değerlendirilmiştir.

1. Denaturasyon / Hibridizasyon Reaksiyonu Basamakları

Kit protokolüne göre; problemlerin hedeflerine hibridizasyonunun hemen hemen 12 saatten sonra tamamlandığı ve hibridizasyon periyodunun 12 ile 24 saat arasında herhangi bir sürede olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda, 16 saat hibridizasyon süresi uygulanmıştır ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Kit protokolüne göre; ilk kullanımdan önce kit ile sağlanan tüplerin (DNA polimeraz ve ligaz hariç) bir kaç saniye süre ile vortekslenmesi tavsiye edilmektedir. MLPA tamponunun tuz ve diğer bileşenlerden oluşan yüksek bir konsantrasyona sahip olduğuna dikkat edilmelidir. MLPA tamponu genellikle -20°C de donacaktır, bazen sıvı olarak da kalabilmektedir. Çalışmamızda bu tavsiyeye uyulmuş ve başarılı sonuç alınmıştır.

2. Ligasyon Reaksiyonu Basamağı

Protokole göre, 98°C ligaz inaktivasyon işleminden sonra, örnekler 4°C de bir haftaya kadar saklanabilir. Daha uzun süreler için -20°C de saklanması tavsiye edilmektedir. Çalışmamızda ligasyon ürünleri ile ilgili bu tavsiyelere uyulmuş ve sonuç elde edemediğimiz örneklere ait ürünler PCR aşaması için tekrar kullanılmıştır. Fakat değerlendirilebilir sonuç elde edilememiştir.

3. PCR Basamağı

Kit protokolüne göre, MLPA PCR rnlerinde kullanılmış mikropipetler MLPA reaksiyonlarının uygulanmasında hiç bir zaman kullanılmamalıdır. PCR dan sonra, tüpler termal cyclerin yakınında aılmamalıdır. Çalışmamızda kontaminasyonu önlemek amacı ile bu tavsiyelere uyulmuş ve örneklerimizin hiçbirinde kontaminasyon görülmemiştir.

Protokolde; ligasyon ürününe polimeraz miksini ilave edilmesinden sonra mümkün olan en kısa zamanda PCR ın başlatılmaması önerilmiştir. Bu tavsiyeye uymak üzere çalışmamızda; uygulama kolaylığı ve zaman kazanma açısından avantaj sağlaması amacı ile örnek sayısına yeterli gelecek şekilde su, PCR tamponu ve polimeraz miksinden oluşan solüsyon hazırlanarak, bu tüm tüplere dağıtılmış ve sonra ligasyon ürünlerini ilave edilerek PCR reaksiyonu kısa sürede başlatılabilmif ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız üzere; PCR döngülerinin protokolde tavsiye edilen sayısı 35 tir. Ancak yine protokole göre çoğu kullanıcı için 33 döngü yeterli olabilmektedir ve bir çok kullanıcı döngü sayısını 30 a düşürebilir. Sadece 10-20 ng insan DNA sı içeren DNA rnekleri, PCR döngü sayısının 37 ye çıkarılmasını gerektirebilir. Çalışmamızda PCR için örneklerimizde 35 döngü uygulanmış ve %96 örneklerde başarılı sonuçlar alınmıştır.

Kit protokolüne göre; PCR rnleri 4°C de en az bir hafta süresince saklanabilir. Kullanılan floresan etiketleri işığa duyarlı oldukları için PCR rnleri karanlık bir kutuda saklanmalı veya alüminyum folyoya sarılmalıdır.

Kit protokolüne göre; bütün kitler için tek çift primer kullanıldığından MLPA tekniği, PCR bulaşma problemlerine sıradan PCR reaksiyonlarına göre daha fazla hassastır. Çalışmamızda DNA ekstraksiyonu, prob hibridizasyon işlemi ve PCR farklı odalarda yapılmıştır ve pipet sterilizasyonuna azami dikkat gösterilmiştir. Çalışmamızda kontaminasyon problemine rastlanmamıştır.

4. Kapiller Elektroföreze Yükleme

Kit prosedürüne göre; PCR ürününden 0.75 µl alınıp, üzerine 0.75 µl distile su ilave edilerek kapiller elektroförez cihazına yüklenmesi önerilmektedir. Çalışmamızda elde edilecek pik kalitesini artırmak amacı ile 2 µl PCR ürünü (su ilavesi olmadan) kullanılarak kapiller elektroföreze yükleme yapılmıştır ve önerilen protokole göre daha kaliteli pik görüntüleri elde edilmiştir.

5. Data Analizi

Kit protokolüne göre; Gene Mapper yazılımında örnek piklerinin baz uzunlukları beklenen uzunluklarından 2 baz kısa ya da uzun şekilde görülebildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda pik uzunluklarının bazı örneklerde 2 baz kısa yada uzun olabildiği görülmüştür. Test sonucunun bu değişiklikten etkilenmediği görülmüştür.

Protokole göre, hem MLPA ürünleri hem de boyut standardının çok düşük pikleri kapillere enjeksiyonun başarısız olduğunu gösterebilmektedir. Çalışmamızda böyle bir problem ile karşılaşılmamıştır.

6. Sorun Giderme

1. Hiç bir bant görünmüyorsa; molekül ağırlığı işaretleyicisinin (size standart) reaksiyona eklendiğinden emin olunması, kapiller ve elektroförez şartlarını kontrol edilmesi tavsiye edilmiştir. Çalışmamızda böyle bir problemle karşılaşılmamıştır.

2. Kit prosedüründe belirtildiği gibi; dört kontrol fragmanının görünür halde olduğunu kontrol edilmelidir. Her SALSA araştırması (prob) miksi, ligasyon yapılmaya bile 64, 70, 76 ve 82 nt fragmanlarını amplifiye edeceği bildirilmiştir. Bu bantlar, MLPA için 50 ng dan fazla insan DNA sı kullanıldığı zaman küçük olacaktır. Protokolde, bu bantlar beklenen MLPA amplifikasyon ürünlerinden daha güçlü ise, ya ligasyon reaksiyonunun başarısız olduğu ya da örnek DNA miktarının tavsiye edilen

minimum miktar olan 20 ng den çok daha az olabileceği bildirilmiştir. Her iki durumda da elde edilen sonuçlar güvenilir olmayabilecektir. Protokolde bildirildiği üzere ligasyona bağlı olan kontrol miksi tarafından 94 nt lik bir beşinci bant (sentetik kontrol probu piki) üretilmektedir. Bu, insan IL1B genine özel bir sentetik MLPA probunun amplifikasyon ürünüdür. Bu bant, beklenen MLPA amplifikasyon ürünlerinin çoğuyla benzer pik alanlarına sahip olmalıdır. Çalışmamızda her örnekte yeterli miktarda DNA kullanılmasına rağmen 20 örnekte tartışmanın önceki bölümlerinde detaylı şekilde açıklandığı üzere sonuç alınamamıştır. Bu yüzden bu sonuca çalışmamızdaki gerekçenin yetersiz DNA miktarı değil, ligasyon reaksiyonunun ya da hibridisasyon reaksiyonu yetersizliğinin sebep olduğu düşünülmüştür.

3. Protokole göre primer pikleri mevcut, fakat kontrol fragmanı ve prob amplifikasyon ürünleri yok ise; PCR reaksiyonunun başarısız olarak yorumlanması gerektiği bildirilmiştir. Bu durumda aynı ligasyon reaksiyon ürünü kullanarak, örneğin farklı bir termal cyclus kullanımıyla, PCR reaksiyonunun tekrarlanması tavsiye edilir. Çalışmamızda böyle bir problem ile karşılaşmamıştır.

Bantlar görünüyor, fakat sinyaller zayıf ise (pik alanları düşük ise); protokole göre, PCR reaksiyonunun tüpleri bir başka 4 döngü için termal döndürücüye yerleştirilebilir veya aynı ligasyon reaksiyonlarını kullanan (fakat 36-40 döngü ile) yeni bir PCR yardım edebilir. Çalışmamızda sonuç elde edemediğimiz örneklerde; örneğe ait arta kalan ligasyon reaksiyon ürünleri PCR döngüleri 40 a kadar artırılarak yeniden çalışılmış fakat yine sonuç elde edilememiştir.

Protokolde bildirildiğine göre; farklı örnekler arasında göreceli pik alanlarında büyük farklar varsa; bu DNA hazırlıklarındaki bozukluklardan kaynaklanabilir. Daha az miktarda örnek kullanılması problemi sıklıkla çözmektedir. Bu duruma başka bir sebep ise, kapiller elektroforezde floresan tespit aygıtının doyması ile sonuçlanan kapillerin fazla yüklenmesidir. Elektroforez sırasında tamamlanmamış denatürasyon tarafından geniş piklere (özellikle daha uzun fragmanların pikleri) neden olabilir. Çalışmamızda böyle bir problemle karşılaşmamıştır.

Protokole göre; elektroforez sırasında tamamlanmamış denatürasyon, ekstra piklere ve geniş piklere (özellikle daha uzun fragmanların pikleri) neden olabilmektedir. Elektroforez çalışma sıcaklığında bir artış bu problemi çözmek için yeterli olabilecektir. Çalışmamızda böyle bir problem ile karşılaşılmamıştır.

Protokolde bildirildiğine göre; daha uzun problarda kısa olanlara göre daha düşük pik alanlarının görülmesinin bir çok nedeni olabilir. DNA örneğinin hacmi + prob miksi + MLPA tamponu (buffer) 8 µl dır. 16 saat hibridasyon reaksiyonu süresince buharlaşma, ısıtılmış kapak (lid) nedeniyle düşüktür. Genel olarak, bu 16 saat inkübasyondan sonra tüpün dibinde 6-6.5 µl den daha fazla sıvı kalır. Eğer hacim, örneğin tüplerin kötü kapatılmasından, yanlış ısıtılmış kapak sıcaklığı vb. nedenlerden dolayı, 5 µl den düşük ise, amplifikasyon ürününün arttırılmış uzunluğu ile birlikte pik yüksekliklerinin kaybolması meydana gelebilir. Çalışmamızda, bazı tüplerdeki sıvının tamamının buharlaştığı görüldüğünden, hibridizasyon aşamasında buharlaşma nedeni ile meydana gelebilecek kayıpları önlemek için tüplere mineral yağ eklenmiştir ve bu sebeple doğabilecek problemler önlenmiştir.

SONUÇ

Çalışmamıza prenatal tanı amacıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı na 2000-2006 yılları arasında başvuran hastalardan alınmış olan 500 amniyosentez sıvısı dahil edilmiş ve şu sonuçlar alınmıştır;

1. Yöntemin anöploidi taramasında sensitivitesi ve spesifitesi %100 olarak bulunmuştur.

2. Yöntemin başarı oranı %96 olarak bulunmuştur.

3. Yöntem için kullanılacak fetal DNA kaynağının, ekstrakte edilmiş saf DNA yerine 2 ml amniyotik sıvıdan elde edilecek hücre lizatından sağlanmasının yöntem başarısını artıracığı saptanmıştır.

4. MLPA yöntemi ile kültüre edilmemiş amniyotik sıvıdan fetal 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarına ait doz tayini 24 saate yakın sürede yapılmıştır.

5. 48 örnek eş zamanlı olarak çalışılmıştır ve yöntemin otomasyona uygun olduğu saptanmıştır.

6. MLPA yöntemi ile 1 olguda triploidi tanısı yapılamamıştır.

MLPA tekniğinin prenatal tanıda sık görülen anöploidilerin taranmasında, pratik, hızlı, güvenilir, düşük maliyetli, rutinde kullanılabilir bir test olduğu görülmüştür. Ancak sonuçların klasik kromozom analizi ile konfirme edilmesi gerekliliği ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

- 1 Adinolfi M, Pertl B and Sherlock J., 1997, Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 17,1299–1311.
- 2 American College of Medical Genetics. Technical and Clinical Assessment of Fluorescence In Situ Hybridization: policy statement, 2000, *Gen in Med*, 2(6):356-361.
- 3 Artan, S., 1996, Rutin FISH uygulamaları, “Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon”, (Ed. Başaran, N.), ETAM, Eskişehir, sh: 51-59.
- 4 Aydınlı K., 1992, Prenatal Tanı Ve Tedavi, 1. baskı, Perspektiv Yayın ve Reklam Hizmetleri, İstanbul.
- 5 Bianchi, D. W., Simpson, J. L., Jackson, L. G., Elias S., Holzgreve, W., Evans, M. I., Dukes, K. A., Sullivan, L.M., Klinger, K. W., Bischoff, F. Z., Hahn, S., Johnson, K. L., Lewis, D., Wapner, R. J. and de la Cruz, F., 2002, Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I. Data. *Prenat. Diagn.* 22, 609-615.
- 6 Brock, D. J. H., Rodeck, C. H., Ferguson-Smith, M. A., 1992, Prenatal Diagnosis And Screening, Longman Group UK Limited.
- 7 Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Brocks V, Philip J., 1997, Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat Diagn* 17: 333–341.

- 8 Bussani, C., Cioni, R., Scarselli, B., Barciulli, F., Bucciantini, S., Simi, P., Fogli, A., Scarselli, G., 2002, Strategies for the isolation and detection of fetal cells in transcervical samples. *Prenat. Diagn.* 22, 1098-1101.
- 9 Caferler, J.S., 1996, Endoservikal örneklerde fetal hücrelerin tespiti, Doktora tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı na bağlı Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskişehir.
- 10 Cioni, R., Bussani, C., Scarselli, B., Bucciantini, S., Barciulli, F., Scarselli, G., 2003, Fetal cells in cervical mucus in the first trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 23, 168-171.
- 11 Cirigliano, V., Voglino, G., Marongiu, A. et al., 2006, Rapid Prenatal Diagnosis by QF-PCR: Evaluation of 30,000 Consecutive Clinical Samples and Future Applications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1075: 288–298.
- 12 Connor, J. M., Ferguson-Smith, M.A., 1993, *Essential Medical Genetics*. Forth Edition, Four Dragons, Black-Well Scientific Publications.
- 13 Cucke, H. S., van Lith, J. M. M., 1999, Appropriate biochemical parameters in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 19, 505-512.
- 14 Durak, B., 1998, Normal Ve Translokasyon Taşıyıcısı Erkeklerin Spermiumlarında FISH İle Kromozom Analizi, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji A.B.D. na Bağlı Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskişehir.
- 15 Elejalde R. B., Elejalde M. M., Acuna M. J., Thelen D., Trujillo C, Karmann M, 1990, Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation. *Am. J. Med. Gen.* 35: 188.

- 16** Fejgin, M. D., Diukman, R., Cotton, Y., Weinstein, G., Amiel, A., 2001, Fetal cells in the uterine cervix: a source for early non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* 21, 619-621.
- 17** Findlay, I., Matthews, P. L., Mulcahy, B. K., Mitchelson, K., 2001, Using MF-PCR to diagnose multiple defects from single cells: implications for PGD. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183 (Suppl. 1), S5-S12.
- 18** Gardner, R. J. M., Sutherland, G. R., 2004, *Chromosome Abnormalities And Genetic Counselling*, Third ed., Oxford University Press, New York.
- 19** Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M and Lundsteen C., 2004, Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* 13,171–175.
- 20** Gerdes T. et al., 2005, Automatic analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification products (exemplified by a commercial kit for prenatal aneuploidy detection). *Electrophoresis.* 2005;26(22):4327-32
- 21** Grimshaw GM, Szczepura A, Hultén M, et al., 2003, Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess* 7(10): 1–146.
- 22** Hochstenbach R. et al., 2005, Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat. Diagn.* 2005 Nov; 25 (11): 1032-9.
- 23** Holzgreve W, Miny P, Başaran S, 1987, Teşhis ve tedavi için prenatal müdahaleler, *Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi* 2: 105.

- 24** Hook EB., 1992, Prevalence, risks and recurrence. In Prenatal Diagnosis and Screening, Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson- Smith MA (eds). Churchill Livingstone: Edinburgh; 351–392.
- 25** Hulten M, Dhanjal S, Pertl B., 2003, Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 2003; 126: 279– 297.
- 26** Lichter, P., Creme, T., 1992, Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization in “Human Cytogenetic A Practical Approach.” Vol. 1 (Rooney, D. E., Cherpulkowski, B. H.: edited) Oxford Univ. Pres, pp: 157-192.
- 27** Lubin MB, Elashoff JD, Wang SJ, Rotter JI and Toyoda H., 1991, Precise gene dosage determination by polymerase chain reaction: theory, methodology, and statistical approach *Molecular and Cellular Probes* 5 307–317.
- 28** Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM., 2004, Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet* 12: 907–915.
- 29** Mohr J., 1968, Foetal genetic diagnosis: Development of techniques for early sampling of fetal cells. *Acta Pathos Microbiol Scand* 73:73.
- 30** Morris, A et al., 1999, Two years’ prospective experience using fluorescence in situ hybridization on uncultured amniotic fluid cells for rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies. *Prenat. Diagn.* 19, 546-551.
- 31** Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F.: Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6.baskı, Saunders, (Türkçe Çevirisi, Güneş Kitabevi, 2005)

- 32** Oudejans, C. B. M., Tjoa, M. L., Westerman, B. A., Mulders, M. A. M., Van Wijk, I. J., Van Vugt, ;. M. G., 2003, Circulating trophoblast in maternal blood. *Prent. Diag.* 23, 111-116.
- 33** Özdamar, K., 2001, SPSS ile Biyoistatistik. 5. Baskı. Kaan Kitabevi. Eskişehir.
- 34** Passarge, E., 1995, Color Atlas of Genetics, George-Thieme Verlag, Stuttgart.
- 35** Persutte, W. H. And Lenke, R.R., 1995, Failure of amniotic-fluid-cell growth: is it related to fetal aneuploidy? *Lancet* 345, 96-97.
- 36** QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook, 2003.
- 37** Reid, R., Sepulveda, W., Kyle, P. M. And Davies, G., 1996, Amniotic fluid culture failure: clinical significance and association with aneuploidy. *Obstet. Gynecol.* 87, 588-592.
- 38** Rooney, D. E., 2001, Human Cytogenetics: Constitutional Analys, A Practical Approach, Third edition, Oxford University Pres.
- 39** Schouten, J.P., McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G., 2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30: e57.
- 40** Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KHA, 2003, Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet*; 40: 907– 912.

- 41** Spencer, K., Souter, V., Tul, N., Snijders, R., Nicolaides, K. H., 1999, A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 13, 231-237.
- 42** Steele M. W., Breg W. R., 1966, Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* I: 383.
- 43** Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al., 2001., Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn* 21: 293–301.
- 44** Thilaganathan B, Sairam S, Ballard T, Peterson C and Meredith R., 2000, Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolor fluorescent in situ hybridisation *BJOG*.107 262–266.
- 45** Verma, R. S., 1995, Babu, A.: *Human Chromosomes*, (Pennington, J. E.; Sheinis, L. A.; edited), McGraw-Hill, Inc., USA.
- 46** Verlinsky Y, Ginsberg N, Chmura M, Freidline M, White M, Strom C and Kuliev A, 1995, Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA probe to chromosome 22 in the prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH *Prenatal Diagnosis* 15 831–834.
- 47** Wachtel, S.S., Shulman, L. P. And Sammons, D., 2001, Fetal cells in maternal blood. *Clin. Genet.* 59, 74-79.
- 48** Waters, J. J. and Waters, K.S., 1999, Trends in cytogenetic prenatal diagnosis in the UK: results from UKNEQAS external audit, 1987-1998. *Prenat. Diagn.* 19, 1023-1026.

- 49** Winsor E.J., Silver M.P., Theve R., Wright M and Ward B. E., 1996, Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. *Prenatal Diagnosis* 16, 49-54.
- 50** www.mlpa.com
- 51** www.vysis.com
- 52** Yamamoto M, Fujimori R, Takashi I, Kamimura K, Watanabe G, 1975, Chromosome studies in 500 induced abortions. *Hum Genet* 29: 9.
- 53** Young, I. A., 2005, *Medical Genetics*, 1. Baski, Oxford University Pres, New York.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Hüseyin Yurdakul
Doğum tarihi ve yeri : 1974 Konya
Uyruğu : T.C
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : Küçük İhsaniye Mh. Akifağa sk. No:16/2 Selçuklu/Konya
: mdyurdakul@yahoo.com
: 0 542 347 37 58

Eğitim durumu

İlkokul :Konya Şeker İlkokulu (1985)
Ortaokul :Konya Anadolu Ticaret Lisesi (1989)
Lise :İstanbul Atatürk Fen Lisesi (1992)
Üniversite :İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (1998)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Avrupa Sitogenetikçiler Birliği (ECA)

